

Identifizierung neuer Gene für autosomal rezessive  
Mentale Retardierung

*Humangenetisches Institut*

Der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Alexander-Universität  
Erlangen-Nürnberg  
zur  
Erlangung des Doktorgrades Dr. med  
vorgelegt von  
Judith Bauer  
aus Rotthalmünster

Als Dissertation genehmigt  
von der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

**Vorsitzender des Promotionsorgans:** Prof. Dr. Dr. h.c. J. Schüttler

**Gutachter:** PD Dr. R. A. Jamra

**Gutachter:** Prof. Dr. A. Wiesmann da  
Silva Reis

**Tag der mündlichen Prüfung:** **04. Februar 2015**

## **Inhaltsverzeichnis**

|                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------|----|
| 1 Zusammenfassung / Abstract .....                             |    |
| 2 Einleitung .....                                             | 1  |
| 2.1 Mentale Retardierung .....                                 | 1  |
| 2.1.1 Definition und klinisches Bild .....                     | 1  |
| 2.1.2 Ursachen Mentaler Retardierung .....                     | 2  |
| 2.1.2.2 X-chromosomale Veränderungen .....                     | 3  |
| 2.1.2.3 Autosomale Formen .....                                | 3  |
| 2.1.2.3.1 Autosomal dominante Mentale Retardierung .....       | 4  |
| 2.1.2.3.2 Autosomal rezessive Mentale Retardierung .....       | 4  |
| 2.1.3 Relevanz der Identifizierung von MR-Genen .....          | 5  |
| 2.2 Vorgehensweise zur Identifizierung von MR-Genen .....      | 7  |
| 2.2.1 Homozygotie-Kartierung .....                             | 7  |
| 2.2.1.1 Homozygotie-Kartierung bei konsanguinen Familien ..... | 8  |
| 2.2.1.2 Homozygotie-Kartierung bei sporadischen Fällen .....   | 9  |
| 2.2.2 Benennung der Kandidatengene .....                       | 11 |
| 2.3 Ziel der Arbeit .....                                      | 11 |
| 3 Untersuchungskollektiv, Material und Methoden .....          | 12 |
| 3.1 Untersuchungskollektiv .....                               | 12 |
| 3.1.1 Konsanguines Familienkollektiv .....                     | 12 |
| 3.1.2 Sporadische Fälle .....                                  | 13 |
| 3.2 Material .....                                             | 14 |
| 3.2.1 Verbrauchsmaterialien .....                              | 14 |
| 3.2.2 Chemikalien und Lösungen .....                           | 14 |
| 3.2.2.1 Chemikalien .....                                      | 14 |
| 3.2.2.2 Lösungen und Puffer .....                              | 15 |
| 3.2.3 Enzyme, Kits und Molekulargewichte .....                 | 15 |
| 3.2.4 Geräte .....                                             | 15 |
| 3.2.5 Internetprogramme, Datenbanken und Software .....        | 16 |

|                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.3 Methoden.....                                                                        | 17 |
| 3.3.1 Festlegung der Kandidatenregionen .....                                            | 17 |
| 3.3.1.1 HomozygosityMapper .....                                                         | 17 |
| 3.3.1.2 PLINK.....                                                                       | 17 |
| 3.3.1.3 <i>Custom Track</i> von <i>UCSC</i> .....                                        | 17 |
| 3.3.2 Festlegung der Kandidatengene .....                                                | 17 |
| 3.3.3 Patienten-DNA .....                                                                | 18 |
| 3.3.3.1 Konzentrationsbestimmung von DNA .....                                           | 18 |
| 3.3.3.2 Amplifikation von DNA.....                                                       | 18 |
| 3.3.4 Primerdesign und Etablierung .....                                                 | 19 |
| 3.3.4.1 <i>ExonPrimer</i> .....                                                          | 19 |
| 3.3.4.2 Manuelle Primersuche .....                                                       | 19 |
| 3.3.4.3 Etablierung der Amplifikationsreaktion .....                                     | 20 |
| 3.3.5 Sequenzierung der Kandidatengene .....                                             | 20 |
| 3.3.5.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....                                            | 20 |
| 3.3.5.2 Gelelektrophorese .....                                                          | 21 |
| 3.3.5.3 PCR-Aufreinigung .....                                                           | 21 |
| 3.3.5.5 Sequenzieraufreinigung .....                                                     | 23 |
| 3.3.5.6 Automatische Sequenzierung .....                                                 | 23 |
| 3.3.5.7 Sequenzanalyse.....                                                              | 23 |
| 3.3.6 Analyse der gefundenen Varianten anhand Computerprogrammen zur<br>Prädiktion ..... | 23 |
| 3.3.6.1 MutationTaster .....                                                             | 23 |
| 3.3.6.2 SIFT .....                                                                       | 24 |
| 3.3.6.3 PolyPhen.....                                                                    | 24 |
| 3.3.7 Filterung identifizierter Varianten mittels Kontrollplatten.....                   | 24 |
| 4 Ergebnisse .....                                                                       | 26 |
| 4.1 Homozygotie-Kartierung .....                                                         | 26 |

|                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.2 Kandidatenregionen.....                                                                 | 27 |
| 4.3 Kandidatengene.....                                                                     | 30 |
| 4.3.1 Überblick über die Kandidatengene.....                                                | 30 |
| 4.4 Ergebnisse der Sequenzierung .....                                                      | 37 |
| 4.4.1 Annotierte Varianten.....                                                             | 37 |
| 4.4.2 Nicht-annotierte Varianten.....                                                       | 37 |
| 4.4.2.1 <i>PCLO</i> : g.28688_28689insTT.....                                               | 37 |
| 4.4.2.2 <i>PCLO</i> : g.245993G>A .....                                                     | 38 |
| 4.4.2.3 <i>PCLO</i> : c.12137A>G .....                                                      | 38 |
| 4.4.2.3.1 <i>In silico</i> -Analyse .....                                                   | 38 |
| 4.4.2.3.2 Kontrollkollektiv .....                                                           | 39 |
| 4.4.2.3.3 Bioinformatische Analyse.....                                                     | 39 |
| 5 Diskussion.....                                                                           | 41 |
| 5.1 Sequenzierungsergebnisse der Kandidatengene .....                                       | 41 |
| 5.1.1 Falsche Auswahl der Gene oder Familie.....                                            | 41 |
| 5.1.2 Mutationen in nicht sequenzierten Abschnitten des Gens .....                          | 41 |
| 5.1.3 Keine autosomal rezessive Mentale Retardierung aufgrund<br>homozygoter Mutation ..... | 42 |
| 5.2 Analyse der Variante <i>PCLO</i> : c.12137A>G.....                                      | 42 |
| 5.2.1 Funktion des kodierten Proteins piccolo .....                                         | 42 |
| 5.2.2 Phänotyp des Patienten 65110 mit der Variante <i>PCLO</i> : c.12137A>G<br>.....       | 45 |
| 5.2.3 Weiteres Vorgehen.....                                                                | 46 |
| 5.2.3.1 Identifizierung von weiteren Mutationen in <i>PCLO</i> .....                        | 46 |
| 5.2.3.2 Funktionelle Analysen .....                                                         | 46 |
| 5.3 Ausblick .....                                                                          | 48 |
| 5.3.1 Identifizierung von MR-Genen anhand Homozygotie-Kartierung .....                      | 48 |
| 5.3.2 Verifikation von <i>PCLO</i> : c.12137A>G .....                                       | 48 |
| 6 Literaturverzeichnis.....                                                                 | 49 |

|                                                                      |     |
|----------------------------------------------------------------------|-----|
| 7 Abkürzungsverzeichnis .....                                        | 62  |
| 8 Anhang .....                                                       | 64  |
| 8.1 Verwendete Primer .....                                          | 64  |
| 8.2 Protokolle der PCR-Reaktion.....                                 | 70  |
| 8.2.1 <i>WinTaq</i> -PCR .....                                       | 70  |
| 8.2.2 <i>Invitro Taq</i> -PCR.....                                   | 71  |
| 8.2.3 <i>Gold Taq</i> -PCR.....                                      | 71  |
| 8.2.4 <i>GC-rich Kit</i> .....                                       | 72  |
| 8.3 Protokoll der Sequenzierreaktion.....                            | 73  |
| 8.4 Screenshots der Kandidatenregionen (Stand: September 2012) ..... | 74  |
| 8.5 Priorisierung aller Gene in den Kandidatenregionen .....         | 84  |
| 8.6 Tabelle aller Varianten.....                                     | 114 |
| 9 Danksagung.....                                                    | 121 |
| 10 Lebenslauf .....                                                  | 122 |

## 1 Zusammenfassung

### Hintergrund und Ziele

Mentale Retardierung ist mit einer Prävalenz von 2 - 3 % ein bedeutendes Problem im Gesundheitswesen. Die Mehrzahl der Fälle sind wahrscheinlich genetisch bedingt, in über der Hälfte bleiben die Ursachen jedoch unbekannt. Wahrscheinlich handelt es sich um autosomal rezessive oder dominante Formen mit Punktmutationen. Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Identifizierung neuer Gene für die autosomal rezessive Mentale Retardierung.

### Methoden

Ein Kollektiv aus 106 konsanguinen Familien syrischer Herkunft mit Verdacht auf autosomal rezessiver Mentaler Retardierung wurde mittels Autozygotie-Kartierung untersucht. Im Rahmen dieser Doktorarbeit ermittelte ich 21 Kandidatenregionen, die in fünf oder mehr Familien Überlappung zeigten. In zehn dieser Kandidatenregionen priorisierte ich anhand des Expressionsmusters, der Funktion und der Assoziation mit anderen neurologischen Krankheitsbildern die dort lokalisierten Gene hinsichtlich derer Relevanz zu Mentaler Retardierung. Ich sequenzierte 16 ausgewählte Gene in den Indexpatienten der jeweiligen Familien sowie in weiteren sporadischen Patienten, welche am Genlokus einen *Run of Homozygosity* zeigten. Anschließend folgte die Filterung der identifizierten Varianten durch unterschiedliche Computerprogramme zur Prädiktion und durch Untersuchungen in Kontrollkollektiven.

### Ergebnisse und Beobachtungen

Neben zahlreichen bekannten Varianten konnte ich drei nicht annotierte Varianten identifizieren. Nach Analyse anhand Computerprogrammen zur Prädiktion und anhand Genotypisierung in einem gesunden syrischen Kontrollkollektiv wurden zwei der Varianten als ursächliche Mutation ausgeschlossen. Es blieb als potentiell krankheitsverursachend eine Variante bei einem Indexpatienten in *PCLO*: c.12137A>G, p.Tyr4046Cys. *PCLO* kodiert für piccolo, ein Zytomatrixprotein der Aktiven Zone der Synapse und moduliert über Interaktion mit anderen Proteinen den Kreislauf synaptischer Vesikel. Die molekulare Modellierung zeigt in der Region der Mutation ein konserviertes Motiv, welches vermutlich mit den SH2-Domänen zweier möglicher

Interaktionspartner bindet. Diese Interaktion wird durch den Austausch von Tyrosin zu Cystein gestört.

#### Praktische Schlussfolgerungen

Die identifizierte Variante in *PCLO* ist ein guter Kandidat für die Ursache von Mentaler Retardierung in den untersuchten Familien. Im Anhang an die Doktorarbeit wurde die Genregion um diese Variante einkloniert und wird in Kooperation mit Professor E. Gundelfinger in Magdeburg durch funktionelle Analysen weiter verfolgt. Die Nicht-Identifizierung von weiteren Kandidatenmutationen, deutet auf die extreme Heterogenität in Mentaler Retardierung. In Zukunft kann die Suche nach Kandidatenmutationen effektiver und schneller mittels *next generation sequencing* erfolgen.

## 1 Abstract

### Background

Intellectual disability represents with a prevalence of 2-3 % a leading problem in health care. The cause of intellectual disability is in more than half of the cases not known. It is likely, however, that a significant part of the cases can be explained by an autosomal dominant or recessive inheritance pattern. The objective of this thesis is to identify new genes for autosomal recessive intellectual disability.

### Cohorts and methods

A sample of 106 consanguineous families of Syrian descent with suspected autosomal recessive intellectual disability was studied by using autozygosity mapping. Twenty-one candidate regions were of particular interest, because they showed an overlap in more than five families. Based on expression, function, and results of association studies of neurological phenotypes, I prioritized the genes localized in ten of those candidate regions in regards to their relevance to intellectual disability. The most promising 16 genes were sequenced in the index patients. In addition, those genes were also sequenced in sporadic patients, who showed Runs of Homozygosity at the accordant loci. Afterwards I did further screening of the previously identified variations by in silico analysis and examinations of healthy control samples.

### Results

Besides numerous known variants, I identified three not annotated variants. After using in silico analysis and genotyping in a healthy Syrian control sample, two variants could be excluded. The variant in *PCLO*; c.12137A>G, p.Tyr4046Cys remained as a potential cause of intellectual disability. *PCLO* encodes piccolo, a cytomatrix protein of the active zone in synapses that modulates the circuit of synaptic vesicles through interaction with other proteins. Using molecular modeling we could show that the mutation is located in a conserved motif which probably binds to SH2 domains of two possible interaction partners. This interaction is disrupted by the exchange of amino acids from tyrosine to cysteine.

## Conclusion

The identified variant in PCLO is a good candidate for the cause of intellectual disability in the group of the examined families. After finishing the experimental part of this doctoral thesis, the region around the mutation was cloned and is going to be further studied functionally in cooperation with Professor E. Gundelfinger in Magdeburg.

The fact, that no further candidate mutation was identified, points to extreme heterogeneity in intellectual disability. Future research and studies of candidate mutations could benefit greatly from next generation sequencing.

## 2 Einleitung

### 2.1 Mentale Retardierung

#### 2.1.1 Definition und klinisches Bild

Mentale Retardierung ist mit einer Prävalenz von 2 - 3 % ein bedeutendes Gesundheitsproblem, da sie therapeutisch wenig beeinflussbar ist und Patienten und deren Familien lebenslang beeinträchtigt werden (Leonard und Wen, 2002). Unter Mentaler Retardierung versteht man nach ICD-10 einen „Zustand von verzögerter oder unvollständiger Entwicklung der geistigen Fähigkeiten; besonders beeinträchtigt sind Fertigkeiten, die sich in der Entwicklungsperiode manifestieren und die zum Intelligenzniveau beitragen, wie Kognition, Sprache, motorische und soziale Fähigkeiten“.

Zum Diagnostizieren und Klassifizieren werden standardisierte Intelligenztests, wie zum Beispiel der *Wechsler Adult Intelligence Scales* (WAIS) oder der *Wechsler Intelligence Scales for Children* (WISC) verwendet (Salvador-Carulla und Bertelli, 2008). Dabei wird zwischen einer milden (IQ-Bereich von 50-69), mittelgradigen (IQ-Bereich von 35-49) und schweren (IQ-Bereich unter 35) Mentalen Retardierung unterschieden. Daneben gibt es die Einteilung in syndromale und nicht-syndromale bzw. nicht-spezifische Formen. Syndromale Formen zeichnen sich durch das Auftreten von weiteren Symptomen wie Dysmorphien, Organfehlbildungen und radiologische und laborchemische Befunde aus. So sind diese Formen aufgrund charakteristischer Symptom-Kombinationen wiedererkennbar. Bei nicht-syndromalen Formen ist die Mentale Retardierung die einzige Manifestation. Da jedoch Epilepsie, Ataxie, milde Mikrozephalie, Verhaltensauffälligkeiten und weitere unspezifische Symptome oft zusätzlich auftreten, findet der Begriff „nicht-spezifische Mentale Retardierung“ in aktueller Literatur häufig Verwendung. Das heterogene Erscheinungsbild mit wenig Wiedererkennungswert und ein fließender Übergang der Formen ineinander erschwert die klinische Diagnostik und lässt vermuten, dass manche der nicht-spezifischen Formen bei genauerer Betrachtung eigentlich syndromaler Art sind. Die nicht-spezifischen Formen liegen also in einer Grauzone zwischen nicht-syndromaler und syndromaler Mentaler Retardierung (Abou Jamra *et al.*, 2011b; Chelly *et al.*, 2006).

### 2.1.2 Ursachen Mentaler Retardierung

Mildere Formen von Mentale Retardierung, die mit einer Prävalenz von etwa 1,5 % auftreten, weisen oft komplexe Ursachen mit einem Zusammenspiel von Umwelt und Genetik auf (Drews *et al.*, 1995; Leonard und Wen, 2002; Roeleveld *et al.*, 1997). Zu den nicht-genetischen Ätiologien zählen Infektionen und Intoxikation während der Schwangerschaft, Geburtskomplikationen, postnatale Infektionen, Mangelernährung und Traumata (Chelly *et al.*, 2006). Durch präventive Maßnahmen wie Schwangerschaftsvorsorge und verbesserte Geburtshilfe konnten die exogenen Ursachen in Industrieländern reduziert werden (Ropers, 2010). Der häufigste Grund für Mentale Retardierung in diesen Ländern ist das Fetale Alkoholsyndrom, das durch exzessiven Alkoholkonsum der Mutter in der Schwangerschaft auftritt (Niccols, 2007).

Mittelgradige und schwere Formen von Mentaler Retardierung entstehen weitgehend aufgrund genetischer Ursachen, größtenteils durch schwerwiegende genetische Veränderungen wie Chromosomenaberrationen. Doch insgesamt ist bei mehr als der Hälfte der Patienten der genaue ursächliche Defekt unbekannt (Caliskan *et al.*, 2011; McLaren und Bryson, 1987; Rauch *et al.*, 2006). Die prozentuale Verteilung der unterschiedlichen genetischen Veränderungen zeigt Abbildung 1.

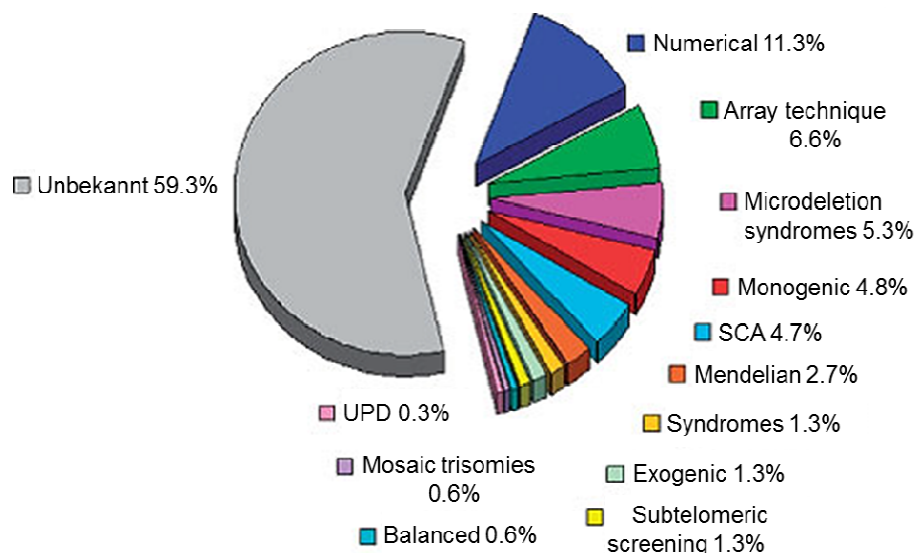


Abbildung 1: Genetische Ursachen Mentaler Retardierung (Rauch *et al.*, 2006)

### 2.1.2.1 Chromosomale Aberrationen

Außer Veränderungen der Geschlechtschromosomen führen fast alle lichtmikroskopisch erkennbaren unbalancierten Chromosomenaberrationen zu kognitiven Beeinträchtigungen (Tzschach und Ropers, 2007). Mit einer Prävalenz von 1/750 bis 1/800 ist die Trisomie 21 am häufigsten, seltener sind mikroskopisch erkennbare chromosomale Deletionen wie zum Beispiel das Cri-du-chat-Syndrom und das Wolf-Hirschhorn-Syndrom (Ropers, 2010).

Submikroskopische Chromosomenaberrationen sind eine weitere wichtige Ursache für Mentale Retardierung. Mittels der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), Array-CGH (*array* = Raster, *comparative genomic hybridization*) SNP Arrays oder MLPA (= *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) lassen sich kleinere Deletionen und Duplikation ab 100 kb identifizieren und somit Mikrodeletionssyndrome wie zum Beispiel das Williams-Beuren-Syndrom (Deletionen in Chromosom 7q11), Chromosom 22q11-Deletionssyndrom, Chromosom 1p36-Deletionssyndrom oder Smith-Magenis-Syndrom (Deletionen in Chromosom 17p11) diagnostizieren (Carpenter, 2001; Pinkel *et al.*, 1998; Solinas-Toldo *et al.*, 1997; Tzschach und Ropers, 2007). Insgesamt sind chromosomale Aberrationen in 25 % der Fälle die häufigste bekannte genetisch Ursache (Rauch *et al.*, 2006).

### 2.1.2.2 X-chromosomale Veränderungen

Bisher wurden über 100 Gene auf dem X-Chromosom detektiert, die durch eine Mutation Mentale Retardierung auslösen können (Ropers, 2006; Schuurs-Hoeijmakers *et al.*, 2011). Die am häufigsten auftretende Form ist das Fragile X-Syndrom, verursacht durch eine Mutation im Gen *FMR1*. Veränderungen auf dem X-Chromosom sind für etwa 10 % der Fälle von Mentaler Retardierung verantwortlich (Kleefstra und Hamel, 2005; Mandel und Chelly, 2004; Ropers und Hamel, 2005).

### 2.1.2.3 Autosomale Formen

Es ist derzeit davon auszugehen, dass bei den meisten noch nicht geklärten Fällen von Mentaler Retardierung autosomale Mutationen ursächlich sind (Bartley und Hall, 1978; Kuss *et al.*, 2011; Najmabadi *et al.*, 2007; Priest *et al.*, 1961; Rauch *et al.*, 2012; Ropers, 2010). Dennoch steht die Forschung auf dem Gebiet der autosomalen Formen noch am Anfang. Gründe hierfür sind zum einen die erschwerte Identifizierung von Genen durch extrem hohe genetische

Heterogenität und zum anderen der Mangel an großen und somit informativen Stammbäumen mit betroffenen Familienmitgliedern (Abou Jamra *et al.*, 2011a).

#### **2.1.2.3.1 Autosomal dominante Mentale Retardierung**

Über die Rolle von autosomal dominanten Erbgängen bei Mentaler Retardierung ist bisher noch nicht viel bekannt, da schwere Formen häufig sporadisch auftreten. Nur in Ausnahmefällen pflanzen sich Betroffene fort, weshalb keine großen Stammbäume für Kopplungsanalysen existieren (Rafiq *et al.*, 2010a; Ropers, 2010). Erst der Einsatz von modernen Methoden, wie *next generation sequencing*, brachte neue Ergebnisse: Ein signifikanter Anteil sporadischer Fälle in der europäischen Bevölkerung könnte auf autosomal dominante de-novo-Mutationen zurückzuführen sein (de Ligt *et al.*, 2012; Hamdan *et al.*, 2011; Rauch *et al.*, 2012; Vissers *et al.*, 2010). Dies wurde durch die Arbeit von MRNET weiterhin verifiziert; Rauch *et al.* identifizierten mittels Exom-Sequenzierung bei über der Hälfte der Patienten der untersuchten Patienten mit schwerer Mentaler Retardierung de-novo-Mutationen. (Rauch *et al.*, 2012).

#### **2.1.2.3.2 Autosomal rezessive Mentale Retardierung**

Bei den autosomal rezessiv vererbten Formen sind Stoffwechseldefekte am besten untersucht. In Deutschland ist die Phenylketonurie (PKU) die häufigste angeborene Stoffwechselerkrankung. Durch das Neugeborenencreening gelingt es, fast alle PKU-Patienten früh zu diagnostizieren und durch eine phenylalaninarme Ernährung eine normale psychische Entwicklung zu ermöglichen. So ist die PKU eine der wenigen erfolgreich therapierbaren monogenen Erkrankungen (Kahler und Fahey, 2003).

Die Gendefekte für einige autosomal rezessive Mentaler Retardierungs - Syndrome, wie zum Beispiel das Cohen Syndrom, konnten in den letzten Jahren aufgeklärt werden (Kolehmainen *et al.*, 2003). Doch für nicht-spezifische Mentale Retardierung sind nur wenige Gene bekannt. Dies ist darauf zurückzuführen, dass in den Industrieländern, wo vermehrt Forschung stattfindet, die meisten Patienten als sporadische Fälle von nicht-verwandten Eltern auftreten, sodass klassische genetische Kartierungsansätze wegen extremer Heterogenität versagen und keine Aussage über den Genlokus erlauben (Abou Jamra *et al.*, 2011a; Kuss *et al.*, 2011). Anders in vielen Kulturen des Nahen Ostens, dem sogenannten Konsanguinitätsgürtel, dort wird

die Identifikation von Mentaler Retardierungs - Genen (MR-Gene) durch große konsanguine Familien mit mehreren Betroffenen erleichtert. Bei diesen Familien kann der autosomal rezessive Erbgang gut nachvollzogen werden und eine Korrelation zwischen höherer Prävalenz von Mentaler Retardierung und Konsanguinität wurde dokumentiert (Bittles, 2001). Hier ist Homozygotie-Kartierung die Methode der Wahl zur Lokalisierung von ursächlichen Gendefekten (Bittles, 2008). Die Kombination aus Kopplungsanalysen mit *next generation sequencing* (NGS) zeigt sich als eine kostengünstige und sehr effektive Strategie zur Identifizierung neuer Gene für Mentale Retardierung (Najmabadi *et al.*, 2011).

Ropers argumentierte 2010, dass aufgrund der Annahme, dass über 90 Gene für lediglich geschätzt 40 % der Fälle von X-chromosomaler Mentaler Retardierung verantwortlich sind, dürften hunderte von Genen für autosomal rezessive Mentale Retardierung existieren (Ropers, 2010). Außerdem wird mittels empirischer Daten und funktioneller Überlegungen angenommen, dass 25 % aller nicht-spezifischen Formen rezessiv vererbt werden (Bartley und Hall, 1978; Kuss *et al.*, 2011; Priest *et al.*, 1961; Ropers, 2010; Wright *et al.*, 1959). Andere Arbeiten argumentieren, dass die Mehrheit der Fälle eher durch autosomal dominante de-novo-Mutationen entstanden ist (Rauch *et al.*, 2012).

Bislang sind rund 60 Gene und etliche Genorte beschrieben, die mit nicht-spezifischer autosomal rezessiver Mentaler Retardierung in Zusammenhang stehen. Die Funktionen der Proteine, die von den bisher gefundenen Genen kodiert werden, sind unterschiedlich: Ein Teil ist involviert in fundamentale Zellprozesse wie Transkription und Translation, Zell-Zyklus-Kontrolle oder Fettsäure-Synthese, ein anderer Teil beeinflusst direkt Strukturen im Gehirn wie die Transmitterfreisetzung oder die Aktivität von Synapsen (Abbasi-Moheb *et al.*, 2012; Caliskan *et al.*, 2011; Chelly *et al.*, 2006; Garshasbi *et al.*, 2008; Higgins *et al.*, 2004; Mir *et al.*, 2009; Mochida *et al.*, 2009; Molinari *et al.*, 2008; Molinari *et al.*, 2002; Motazacker *et al.*, 2007; Najmabadi *et al.*, 2011; Philippe *et al.*, 2009; Ropers, 2010; Vermeer *et al.*, 2007).

### **2.1.3 Relevanz der Identifizierung von MR-Genen**

Bei etwa der Hälfte der Fälle von Mentaler Retardierung kann bis heute keine Ursache gefunden werden, was für Eltern mit betroffenem Kind oft eine emotionale Belastung bedeutet und die Verarbeitung der Krankheit erschwert.

Die Aufklärung der genauen Ätiologie hilft den Eltern bei der Verarbeitung der Behinderung des Kindes (Jamison, 1965; Lenhard *et al.*, 2005). Des Weiteren erleichtert eine eindeutige Diagnose eine Prognose über den Verlauf zu stellen und durch rechtzeitige Fördermaßnahmen und Vorsorge können Komplikationen vermindert werden. Beim Prader-Willi-Syndrom zum Beispiel, bei dem die zuerst vorliegende Trinkschwäche mit ungenügender Gewichtszunahme im späteren Säuglingsalter zu Hyperphagie umschlägt, ermöglicht die Kenntnis des zu erwartenden Krankheitsverlaufs aktuell vorhandene Symptome adäquat zu behandeln. Längerfristig können sich durch die Aufklärung der molekularen Ursachen neue therapeutische Ansatzpunkte ergeben, wie zum Beispiel eine medikamentöse Therapie bei Fragilen X-Syndrom.

Der Nachweis des Gendefektes ist außerdem relevant für die Familienplanung. Anhand einer Stammbaumanalyse kann eine genauere Angabe des Erkrankungsrisikos für weitere Kinder in der Familie gemacht werden. Zudem ist eine pränatale Diagnostik nur dann möglich, wenn der Defekt beim Indexpatienten einer Familie nachgewiesen wurde (Rauch, 2010). Schließlich leistet die Erforschung der Ursachen für Mentale Retardierung einen wichtigen Beitrag für das allgemeine Verständnis von menschlichem Bewusstsein und Intellekt sowie einen Einblick in die Entwicklung des Gehirns mit einzelnen Signalwegen (Modell und Darr, 2002).

## 2.2 Vorgehensweise zur Identifizierung von MR-Genen

Das folgende Schema zeigt die am Institut für Humangenetik in Erlangen angewandte Vorgehensweise bei der Suche nach autosomal rezessiven Genen für Mentale Retardierung.

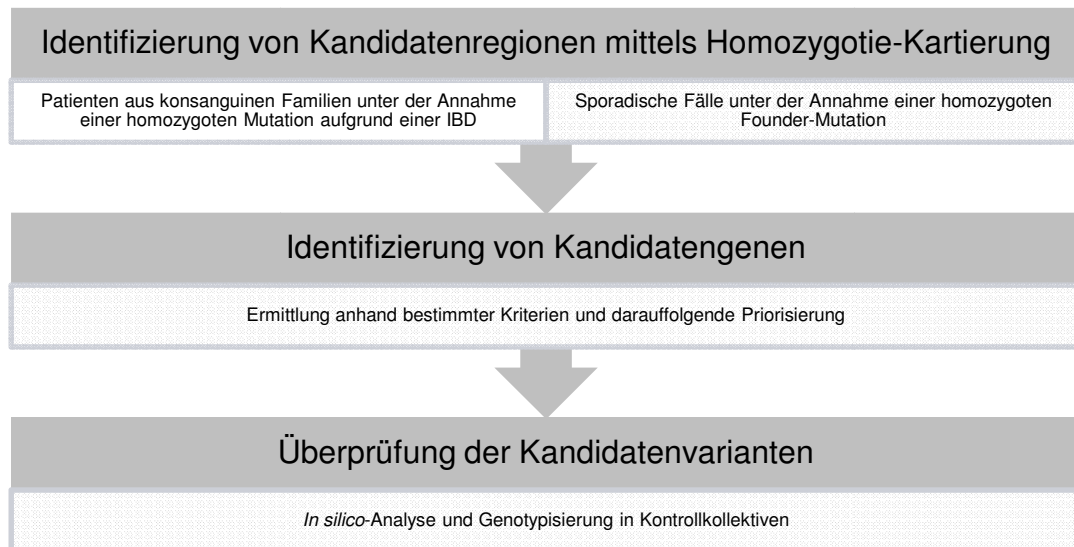


Abbildung 2: Flussdiagramm über Vorgehensweise zur Identifizierung von MR-Genen  
IBD: *identical by descent*

### 2.2.1 Homozygotie-Kartierung

Bei einer autosomal rezessiven Vererbung tritt die Krankheit dann auf, wenn zwei Mutationen in den paarig angelegten Genkopien gleichzeitig vorkommen. Dabei kann es sich sowohl um die gleiche Mutation (Homozygotie) als auch um verschiedene Mutationen handeln (Compound Heterozygotie). Bei einer homozygoten Mutation geht man in der Regel davon aus, dass diese Mutation einmal in der menschlichen Evolution entstanden ist. Obwohl diese Mutation weitervererbt wird, kommt es bei keinem der Nachkommen zu einer Erkrankung, wenn nur ein Allel betroffen ist. Doch für Nachkommen von Eltern, die gesund sind, aber beide Anlageträger der Krankheit sind, besteht ein 25 %-iges Risiko, dass ein Kind jeweils ein mutiertes Allel vererbt bekommt und erkrankt.

Es kann angenommen werden, dass beide Mutationen bei einem Betroffenen von einem Vorfahren abstammen. Mit dem mutierten Gen werden dann auch intragene und flankierende DNA-Marker vererbt, so dass homozygote Haplotypen vorliegen. Um diese homozygoten Bereiche zu detektieren und somit Kandidatenregionen zu ermitteln, werden genomweit zahlreiche genetische Marker mittels Mikrochips genotypisiert und anschließend

bioinformatisch analysiert. Der Begriff Marker beschreibt in der Genetik ein polymorphes, mendelndes Merkmal, mit dem ein chromosomaler Abschnitt in einem Stammbaum verfolgt werden kann (siehe Abbildung 3). Dies ist möglich, da der Marker sich in der Meiose aufgrund der räumlichen Nähe in der Regel nicht von der Mutation löst. Dieses Phänomen nennt man Kopplungsungleichgewicht. Derzeit sind SNPs (*single nucleotide polymorphism*) aufgrund der hohen Dichte und der einfachen Nachweismethode, die am häufigsten verwendeten Marker. Regionen, die bei Betroffenen homozygot und bei gesunden heterozygot vorliegen, sind nach oben genannter Hypothese potentielle Träger der gesuchten Mutation.

#### **2.2.1.1 Homozygotie-Kartierung bei konsanguinen Familien**

Es ist anzunehmen, dass bei den meisten Fällen von autosomal rezessiver Mentaler Retardierung seltene beziehungsweise familienspezifische Mutationen verantwortlich sind. Aufgrund unterschiedlicher Mutationen in verschiedenen Genen entsteht ein eher unspezifischer Phänotyp, welches die Zusammenlegung mehrerer Familien für eine Kartierung erschwert. Unter diesem Aspekt sind große konsanguine Familien für die Homozygotie-Kartierung besonders günstig.

Konsanguinität bedeutet die Heirat verwandter Individuen und ist vor allem im Mittleren Osten und Asien verbreitet (Hussain und Bittles, 2000; Najmabadi *et al.*, 2007). Die Rekrutierung geeigneter Familien findet aufgrund der hohen Prävalenz konsanguiner Ehen, kombiniert mit dem Leben in Großfamilien, verstärkt in Ländern wie Iran, Pakistan, Syrien und Türkei statt (Abou Jamra *et al.*, 2011b; Kuss *et al.*, 2010; Najmabadi *et al.*, 2007; Nolan *et al.*, 2008; Rafiq *et al.*, 2010b; Uyguner *et al.*, 2007). Beispielsweise liegt in Syrien das Vorkommen von Ehen zwischen Cousin und Cousine ersten Grades oder enger in bis zu 50 % der Fälle vor. (Tadmouri *et al.*, 2009). Konsanguine Ehen besitzen ein erhöhtes Risiko für Mentale Retardierung und kongenitale Fehlbildungen. Der signifikante Exzess von Nachkommen mit Mentaler Retardierung verwandter Eltern wurde schon mehrmals dokumentiert (al-Ansari, 1993; Bittles, 2001; Durkin *et al.*, 1998; Yaqoob *et al.*, 1995). In diesen Familien kann es vermehrt vorkommen, dass eine seltene Variante von einem gemeinsamen Vorfahren sowohl durch die väterliche als auch durch die mütterliche Linie auf den Nachwuchs übertragen wird. Das bezeichnet man auch als Autozygotie oder

*identical-by-descent* (IBD). Basierend auf diesem Prinzip werden durch Kopplungsanalysen und Homozygotie-Kartierung in großen konsanguinen Familien selektiv die Regionen im Genom betrachtet, welche *identical-by-descent* von einem gemeinsamen Vorfahren stammen. Durch die parallele Untersuchung mehrerer Betroffener, deren Eltern sowie gesunder Verwandter kann die Kandidatenregion eingeschränkt werden.

Die Homozygotie-Kartierung wird mit den Computerprogrammen HomozygosityMapper und Plink durchgeführt (siehe 3.3.1.1 und 3.3.1.2).

#### **2.2.1.2 Homozygotie-Kartierung bei sporadischen Fällen**

Die oben beschriebene Vorgehensweise basiert auf Analysen in Familien mit bekannter Verwandtschaft der Eltern. Um autosomal homozygote Regionen in Individuen aus nicht-konsanguinen Familien zu finden, wurde von Friedhelm Hildebrandt diese Methode weiterentwickelt und kann damit homozygote Bereiche eines Genoms über Marker analysieren. Diese Homozygotie ist erklärbar durch *identical by state*. Das heißt, dass keine Rückschlüsse auf die Herkunft möglich sind, doch in der Regel davon ausgegangen wird, dass es sich um eine weit entfernte Verwandtschaft der Eltern handelt (*identical by descent*). Diese Vorgehensweise beruht auf der Annahme eines Auftretens von Founder-Mutationen. Diese Mutationen sind oft jeweils einmalig und rezessiv in einer Population aufgetreten. Ein bekanntes Beispiel ist die  $\Delta F508$ -Mutation bei Cystischer Fibrose, die bei 70 % der Betroffenen in Europa ursächlich für die Erkrankung ist. Diese Mutation stammt höchstwahrscheinlich aus dem europäischen Raum und entstand vor 54.000 Jahren (Morral *et al.*, 1994).

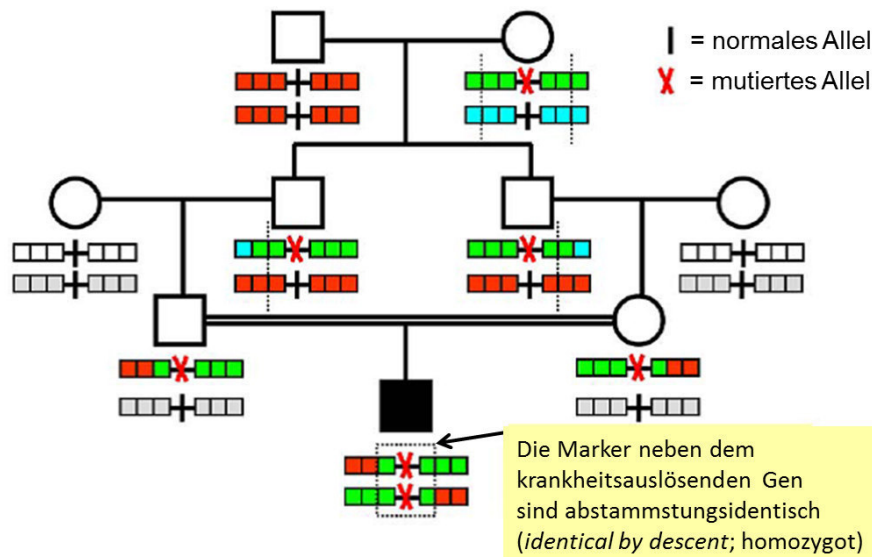


Abbildung 3: Vererbung eines krankheitsverursachenden Gens innerhalb einer Familie  
 Das mutierte Allel trat einmalig bei der Großmutter dieser Familie auf. Sie vererbte die Mutation an beide Söhne weiter, allerdings wurde durch Crossing-Over in der Meiose der Locus verkleinert. Das krankheitsverursachende Allel erscheint nun beim Urenkel homozygot. Auf Grund weiterer Meiosen hat sich der Locus noch weiter verkleinert und lässt sich durch Marker in den flankierenden Regionen weiter einkreisen (Kopplungsungleichgewicht) (Hildebrandt *et al.*, 2009).

Aufgrund von flankierenden homozygoten Markern ist es möglich, die homozygoten Stellen in sporadisch Betroffenen ausfindig zu machen. Diese Marker haben sich über Generationen hinweg, aufgrund des Kopplungsungleichgewichtes, nicht von der krankheitsverursachenden Mutation getrennt. Allerdings ist bekannt, dass es innerhalb der Bevölkerung unbedenkliche homozygote Bereiche gibt. Diese weitläufigen *Runs of Homozygosity* (ROH) wurden durch großangelegte Studien analysiert und sie zeigen, dass die Länge und die Häufigkeit der ROHs vom geographischen Umfeld und vom Verwandtschaftsgrad abhängig sind (Hildebrandt *et al.*, 2009; Kirin *et al.*, 2010). ROHs, die sehr früh in der Entwicklung des Menschen entstanden sind, sind aufgrund der zahlreichen Meiosen in immer kleinere chromosomale Abschnitte aufgeteilt worden. Längere ROHs könnten durch ein Kopplungsungleichgewicht erhalten geblieben sein. In nicht-konsanguinen Familien muss man davon ausgehen, dass diese homozygoten Bereiche *identical by state* in einem Einzelindividuum vorliegen.

Die Homozygotie-Kartierung der sporadischen Fälle wird mit dem Programm PLINK durchgeführt. Das Programm ist in der Lage, große Datensätze zu verarbeiten, wobei der Schwerpunkt auf der Genotyp-Analyse liegt. PLINK

schafft 100.000 genetische Marker in Tausenden von Individuen zu analysieren und somit homozygote Bereiche im Genom zu detektieren (Purcell *et al.*, 2007).

### **2.2.2 Benennung der Kandidatengene**

Nach Festlegung der Kandidatenregionen erfolgte die Bestimmung der Kandidatengene. Mit Hilfe verschiedener genetischer und genomischer Datenbanken wurde nach Funktion der Gene in den jeweiligen Kandidatenregionen recherchiert. Bei der Auswahl fungierten funktionelle Studien und Informationen über bereits bekannte MR-Gene als Vorlage. So wurden Gene bevorzugt, die für Proteine kodieren, die eine Rolle in der neuronalen Differenzierung, der synaptischen Plastizität, im Zyklus synaptischer Vesikel, in der Regulation der Genexpression und weiterer Funktionen im Gehirn spielen (Chelly *et al.*, 2006; Garshasbi *et al.*, 2006). Zudem wurde für die Einordnung der Gene die Interaktion mit bekannten MR-Genen oder die Assoziation zu anderen Erkrankungen des Gehirns wie Epilepsie, Demenz oder Autismus betrachtet. Ein weiteres Kriterium war die Expression im Gehirn beziehungsweise im zentralen Nervensystem. So wurde mit Einbeziehung aller genannten Merkmale eine Priorisierung durchgeführt.

### **2.3 Ziel der Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Identifizierung neuer Gene für nicht-spezifische autosomal rezessive Mentale Retardierung. Die Durchführung erfolgt mittels Homozygotie-Kartierung konsanguiner Familien aus Syrien mit mehreren Betroffenen zur Identifizierung der Kandidatenregionen. Nach Ermittlung geeigneter Kandidatengene aus den jeweiligen Regionen werden noch passende sporadische Fälle von Mentaler Retardierung (aus der Datenbank MRNET) hinzugenommen. Die Auswahl der Kandidatengene erfolgt hinsichtlich Expressionsmuster, Funktion und Assoziation mit anderen neurologischen Krankheitsbildern. Nach Sequenzierung der Kandidatengene werden gefundene Varianten durch Computerprogramme zur Prädiktion und Untersuchungen in Kontrollkollektiven gefiltert und nach ihrer Relevanz für Mentale Retardierung klassifiziert. Besonders interessante Gene können funktionellen Analysen unterzogen werden.

### 3 Untersuchungskollektiv, Material und Methoden

#### 3.1 Untersuchungskollektiv

##### 3.1.1 Konsanguines Familienkollektiv

Das Untersuchungskollektiv wurde durch den Humangenetiker PD Dr. med. Rami Abou Jamra in Zusammenarbeit mit Pädiatern in Syrien rekrutiert. Insgesamt konnten 128 syrische konsanguine Kernfamilien mit Kindern mit mittlerer bis schwerer Mentaler Retardierung und mit Verdacht auf eine autosomal rezessive Vererbung klinisch untersucht werden. Bei allen Familien wurden Stammbaum und Anamnese erhoben und der klinische Phänotyp anhand Bilder dokumentiert. Um die häufigsten genetischen Ursachen von Mentaler Retardierung abzuklären, wurden eine Chromosomenanalyse und molekulargenetische Tests durchgeführt um zum Beispiel Fragiles-X-Syndrom auszuschließen. Ebenso wurde das X-Inaktivierungsmuster bei Müttern von männlichen Indexpatienten untersucht, um einen X-chromosomalen Erbgang unwahrscheinlich zu machen. Nach Ausschluss einiger Familien wegen nicht eindeutigen Phänotyps, ungeklärter Verdachtsdiagnosen und möglicher de-novo-Ereignisse, blieben 83 Kernfamilien übrig. Von diesen konnten neun Familien in bis zu drei Kernfamilien weiter unterteilt werden und zu den syrischen Familien konnten noch 13 konsanguine Fälle aus dem MRNET – Kollektiv hinzugefügt werden.

So wurden insgesamt 96 Familien mit *Illumina CytoSNP* und *Affymetrix 6.0* genotypisiert und genomweiten Kopplungsanalysen unterzogen.

Wie schon unter 2.1 beschrieben, ist die eindeutige Trennung der Formen von spezifischer und nicht-spezifischer Mentaler Retardierung durch die Variabilität der Phänotypen und der fließende Übergang ineinander schwierig. Auch nach erneuter Auswertung der Befunde und Abwägung anderer Differentialdiagnosen konnte nicht immer eine spezifische Form von Mentaler Retardierung ausgeschlossen werden.

Von den 96 Kernfamilien wurden Individuen von 17 Familien auf Mutationen in bis zu 13 Genen untersucht (siehe Tabelle 3). Eine Übersicht über die bearbeiteten konsanguinen Familien gibt Tabelle 1.

| Familie      | Verwandtschafts-<br>koeffizient | Anzahl<br>Kinder | Betroffene<br>(Geschlecht)  | Anzahl<br>genotypisierter<br>Proben<br>inklusive<br>Eltern | Anzahl<br>ROHs | Gesamtlänge<br>Homozygotie |
|--------------|---------------------------------|------------------|-----------------------------|------------------------------------------------------------|----------------|----------------------------|
| <b>MR07</b>  | 0,0078                          | 5                | 2 (♀)                       | 1                                                          | 15             | 149                        |
| <b>MR13b</b> | 0,0156                          | 4                | 1 (♀)                       | 2                                                          | 10             | 98                         |
| <b>MR16</b>  | 0,0313                          | 4                | 2 (♀♂)                      | 4                                                          | 2              | 39                         |
| <b>MR22b</b> | 0,1133                          | 2                | 2 (♀)                       | 4                                                          | 12             | 165                        |
| <b>MR31</b>  | 0,0312                          | 4                | 2 (♀)                       | 2                                                          | 3              | 26                         |
| <b>MR38</b>  | 0,0781                          | 3                | 2 (♀)                       | 4                                                          | 14             | 157                        |
| <b>MR39</b>  | 0,0039                          | 3                | 3 (♂♀)                      | 3                                                          | 2              | 40                         |
| <b>MR46</b>  | 0,0625                          | 2                | 2 (♂)                       | 2                                                          | 4              | 108                        |
| <b>MR48</b>  | 0,0625                          | 5                | 2 (♂)<br>Eineiige Zwillinge | 1                                                          | 14             | 195                        |
| <b>MR53</b>  | 0,0625                          | 2                | 2(♀)                        | 2                                                          | 4              | 43                         |
| <b>MR57</b>  | 0,0781                          | 4                | 1 (♂)                       | 1                                                          | 19             | 231                        |
| <b>MR70</b>  | 0,0938                          | 4                | 2 (♂)                       | 6                                                          | 7              | 148                        |
| <b>MR71a</b> | 0,125                           | 5                | 1 (♀)                       | 1                                                          | 10             | 76                         |
| <b>MR77</b>  | Unbekannt                       | 3                | 1 (♀)                       | 0                                                          | 15             | 164                        |
| <b>MR79</b>  | Unbekannt                       | 3                | 2 (♂♀)                      | 0                                                          | 6              | 64                         |
| <b>MR93</b>  | Unbekannt                       | 4                | 1-4* (♂♀)                   | 0                                                          | 5              | 13                         |
| <b>MR106</b> | Unbekannt                       | 1                | 1 (♂)                       | 0                                                          | 22             | 135                        |

Tabelle 1: Übersicht über bearbeitete konsanguine Familien

MR#: Familiennummer; a/b: komplexe Familienstruktur, ROH: *Runs of Homozygosity*

\*: teilweise unklarer Erkrankungszustand

### 3.1.2 Sporadische Fälle

Die DNA-Proben der sporadischen Fälle von Mentaler Retardierung wurden im Rahmen des Forschungsprojektes *German Mental Retardation Network* (MRNET) am Humangenetischen Institut in Erlangen gewonnen. Durch Karyotypisierung und molekulargenetische Tests konnten im Vorfeld bekannte Ursachen für Mentale Retardierung bei den Patienten ausgeschlossen werden. In dieser Arbeit wurden insgesamt 24 Patienten sporadischer Fälle auf Mutationen untersucht. Die Patienten präsentieren Mentale Retardierung

unterschiedlicher Ausprägung und mit teilweise unterschiedlichen Begleitsymptomen. Nach Auswahl der Kandidatenregionen anhand der syrischen konsanguinen Familien wurden die sporadischen Fälle hinzugefügt.

### 3.2 Material

#### 3.2.1 Verbrauchsmaterialien

|                                         |                                                                                                                           |
|-----------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Desinfektionsspray                      | Tana-Chemie GmbH, Mainz                                                                                                   |
| Falcon (15 ml, 50 ml)                   | Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen                                                                                       |
| Handschuhe<br>Flexam<br>Digitil® N      | Semperit Technische Produkte GmbH,<br>Frickenhausen<br>Hartmann, Heidenheim                                               |
| Microseal B Adhesive Seal               | Biozym Scientific GmbH, Oldendorf                                                                                         |
| PCR 96 Well Microplate SealingTape      | Costar Corning Inc.                                                                                                       |
| Pipettenspitzen                         | Biozym Scientific GmbH, Oldendorf,<br>Eppendorf, Hamburg, Greiner Bio-One<br>GmbH, Frickenhausen, Sarstedt,<br>Nürnbrecht |
| Reaktionsgefäß 0,2 ml                   | PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen                                                                                      |
| Reaktionsgefäß 1,5 ml, 2 ml             | Josef Peske GmbH, Aindling                                                                                                |
| Sequenzierreaktion-Aufreinigungsplatten | Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen                                                                                       |
| Thermowell 96-Well Platte               | Costar Corning Inc., Bodenheim                                                                                            |

#### 3.2.2 Chemikalien und Lösungen

##### 3.2.2.1 Chemikalien

|                                                       |                                               |
|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Agarose                                               | Roth, Karlsruhe                               |
| AMPure                                                | Agencourt Bioscience Corporation,<br>Bernried |
| Betain 5M                                             | Sigma-Aldrich, Taufkirchen                    |
| Big Dye Terminator v1.1, v3.1 5x Sequencing<br>Buffer | Applied Biosystems, Foster City               |
| Cleanseq                                              | Agencourt Bioscience Corporation,<br>Bernried |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)                               | Merck, Darmstadt                              |
| dNTP Mix (2,5 mM)                                     | Invitrogen, Karlsruhe                         |
| Ethanol                                               | Roth, Karlsruhe                               |

|                        |                                  |
|------------------------|----------------------------------|
| Ethidiumbromid         | Roth, Karlsruhe                  |
| Ladepuffer (6x):       |                                  |
| 30 ml 100 % Glycerin   | Roth, Karlsruhe                  |
| 0,25 g Bromphenolblau  | Sigma Chemicals, Perth           |
| 0,25 g Xylencyanol     | Serva Feinbiochemica, Heidelberg |
| 70 ml H <sub>2</sub> O |                                  |

### 3.2.2.2 Lösungen und Puffer

|                   |                                                               |
|-------------------|---------------------------------------------------------------|
| 10x WinTaq-Puffer | 500mM KCl<br>10mM Tris-HCl (pH 8,3)<br>15mM MgCl <sub>2</sub> |
| 10x TBE-Puffer    | 1,0M Tris<br>0,83M Borat<br>10mM EDTA                         |

### 3.2.3 Enzyme, Kits und Molekulargewichte

|                                                |                                                                      |
|------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| AmpliTaq Gold mit 10 x PCR-Puffer              | Applied Biosystems, Wilmington                                       |
| Big DyeTerminator v3.1 5x Cycle Sequencing Kit | Applied Biosystems, Foster City                                      |
| Designte Primer                                | siehe Anhang 8.1                                                     |
| GC-Rich PCR System                             | Roche, Basel                                                         |
| GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit             | GE Healthcare, Chalfont St Giles                                     |
| pUC Mix Marker 8                               | Fermentas, St. Leon-Rot                                              |
| Taq DNA Polymerase                             | Invitrogen, Karlsruhe                                                |
| WinTaq DNA Polymerase                          | Arbeitsgruppe Andreas Winter-pacht<br>(eigene Herstellung, Erlangen) |

### 3.2.4 Geräte

|                                      |                                         |
|--------------------------------------|-----------------------------------------|
| Eismaschine                          | Ziegra, Isernhagen                      |
| Elektrophoresekammern                | MWG Biotech, Ebersberg                  |
| Geldokumentationsanlage              | Biometra GmbH, Göttingen                |
| Gelkämme für Agarose                 | Peqlab Biotechnologie GmbH,<br>Erlangen |
| Kühl-und Gefrierschränke und Truhen: |                                         |
| (4 und -20 °C) Electronic comfort    | Siemens                                 |
| (-20 °C) Comfort                     | Liebherr                                |
| (-80 °C) Legaci™                     | Revco                                   |
| Laborwaage MC1                       | Sartorius AG, Göttingen                 |

|                                               |                                                                            |
|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| Mikrowelle                                    | Panasonic, Osaka                                                           |
| Monochromator Infinite 300 Nano Quant         | Tecan Group LTD., Männedorf                                                |
| Pipetten                                      | Dunn Labortechnik GmbH,<br>Asbach, Eppendorf, Hamburg,<br>Gilson Middleton |
| Pipettierroboter Biomek®NX                    | Beckman Coulter, Krefeld                                                   |
| Sequenzierer ABI 3730                         | Applied Biosystems, Santa Clara                                            |
| Spannungsgeber für Agarosegel-Elektrophorese: |                                                                            |
| Power pac 300                                 | Bio-Rad, Kalifornien                                                       |
| Powersupply PPs 200-1d                        | MWG Biotech                                                                |
| Thermocycler:                                 |                                                                            |
| MBS SATELLITE 0.2G Thermal Cycler             | Thermo Fisher Scientific, Waltham                                          |
| Mastercycler® pro vapo protect                | Eppendorf, Hamburg                                                         |
| Thermomixer                                   | Eppendorf, Hamburg                                                         |
| Vortex                                        | Janke & Kunkel GmbH, Breisgau                                              |
| Wasseraufbereitungsanlage Purelab plus        | USF-Elga, Paris                                                            |
| Zentrifugen:                                  |                                                                            |
| miniSpin                                      | Eppendorf, Hamburg                                                         |
| Centrifuge 5415 D                             | Eppendorf, Hamburg                                                         |
| Centrifuge 5810                               | Eppendorf, Hamburg                                                         |

### 3.2.5 Internetprogramme, Datenbanken und Software

|                                         |                                                                                                                     |
|-----------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Ensembl Variant Effect Predictor</i> | <a href="http://www.ensembl.org/tools.html">http://www.ensembl.org/tools.html</a>                                   |
| ExonPrimer                              | <a href="http://ihg.gsf.de/ihg/ExonPrimer.html">http://ihg.gsf.de/ihg/ExonPrimer.html</a>                           |
| GeneDistiller                           | <a href="http://www.genedistiller.org/">http://www.genedistiller.org/</a>                                           |
| HomozygosityMapper                      | <a href="http://www.homozygositymapper.org/">http://www.homozygositymapper.org/</a>                                 |
| MutationTaster                          | <a href="http://www.mutationtaster.org/">http://www.mutationtaster.org/</a>                                         |
| NCBI                                    | <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>                                             |
| OMIM                                    | <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim</a>                                     |
| PLINK                                   | <a href="http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/">http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/</a>               |
| PolyPhen                                | <a href="http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/">http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/</a>                             |
| <i>PubMed</i>                           | <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=PubMed">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=PubMed</a> |
| <i>SeqManII</i>                         | DNA Star Inc.                                                                                                       |
| <i>Sequencing Analysis 5.1.1</i>        | Applied Biosystems                                                                                                  |
| SIFT                                    | <a href="http://sift.jcvi.org/">http://sift.jcvi.org/</a>                                                           |
| <i>UCSC</i>                             | <a href="http://genome.ucsc.edu/">http://genome.ucsc.edu/</a>                                                       |

### 3.3 Methoden

#### 3.3.1 Festlegung der Kandidatenregionen

##### 3.3.1.1 HomozygosityMapper

Die Festlegung der Kandidatenregionen der konsanguinen Familien wurde mit dem Programm HomozygosityMapper durchgeführt. Mit diesem Programm können homozygote Bereiche detektiert werden. Das Ergebnis der Analyse wird als Balkendiagramm angezeigt, Homozygotie-Scores von mehr als 80 % des Maximum-Scores heben sich als rote Balken hervor. Zudem kann die Maximallänge der ROHs ausgewählt und begrenzt werden. In dieser Arbeit wurden aus allen konsanguinen Familien diejenigen ausgewählt, die maximal 15 ROHs aufweisen, da diese eine engere Wahl an Kandidatengenomen bieten und somit höhere Chancen, ein ursächliches MR-Gen zu identifizieren, bestehen (Seelow *et al.*, 2009).

##### 3.3.1.2 PLINK

Um ROHs für die nicht-konsanguinen Fälle zu detektieren, wurde das Programm PLINK verwendet (Purcell *et al.*, 2007). Für dieses Kollektiv lagen die Daten schon vor.

##### 3.3.1.3 Custom Track von UCSC

Die Internetseite *UCSC Genome Browser* (<https://genome.ucsc.edu>) bietet durch die *Custom Track* -Funktion die Möglichkeit, die durch die Anzahl der ROHs ausgewählten Daten hochzuladen und über *Genome Graphs* weiter zu bearbeiten. Die ROHs können so, abhängig von der Anzahl der Homozygotien, durch unterschiedliche Abstufung der Farben graphisch dargestellt werden. So konnten die Regionen, in denen mindestens fünf Familien Homozygotie aufweisen, leichter identifiziert werden.

#### 3.3.2 Festlegung der Kandidatengene

Nach Eingrenzung der Kandidatenregionen wurden geeignete Kandidatengene ermittelt. Mit Hilfe von *UCSC Genome Browser* konnte ein guter Überblick über die einzelnen Gene und deren Expression im Gewebe gewonnen werden. Ein Kriterium bei der Einordnung des Gens war die erhöhte Expression im Gehirn beziehungsweise im zentralen Nervensystem (ZNS). So wurden Gene bevorzugt, die für Proteine kodieren, die eine Rolle in der neuronalen Differenzierung, der synaptischen Plastizität, im Zyklus synaptischer Vesikel, in

der Regulation der Genexpression und weiterer Funktionen im Gehirn spielen. Dafür wurden die Datenbanken von OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*) und *Pubmed* herangezogen. Außerdem wurde auf mögliche Assoziationen zu neurologischen Erkrankungen oder auf Interaktion mit bereits bekannten MR-Genen geachtet. Es folgte eine Priorisierung der in der Kopplungsregion befindlichen Gene. Unter Einbeziehung der zuvor ermittelten Informationen wurden die Gene nach ihrer potentiellen Relevanz für Mentale Retardierung kategorisiert und die kodierenden Abschnitte anschließend sequenziert. Eine Tabelle mit Priorisierung aller Gene in den Kandidatenregionen befindet sich im Anhang unter Punkt 8.5.

### **3.3.3 Patienten-DNA**

#### **3.3.3.1 Konzentrationsbestimmung von DNA**

Die photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA wurde mit dem *Infinite® 200 NanoQuant* von Tecan durchgeführt. DNA und RNA absorbieren ultraviolettes Licht bei einem Absorptionsmaximum von 260nm. Eine Lösung, die 50 µg/mL reine doppelsträngige DNA enthält, hat einen Absorptionswert von 1,0. Mit Hilfe des gemessenen OD-Wertes kann die Konzentration einer Lösung berechnet werden.

Je 1 - 2 µL der zu messenden Proben werden auf die einzelnen Positionen der NanoQuant Mikroplatte aufgetragen und diese anschließend mit ultraviolettem Licht von 260nm Wellenlänge belichtet. Ein Fotodetektor ermittelt die transmittierte Strahlung, wodurch dann die Konzentration der Probe bestimmt werden kann.

#### **3.3.3.2 Amplifikation von DNA**

Die in geringer Menge vorliegende Patienten-DNA wurde für die weiteren laborchemischen Methoden mit Hilfe von *illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit* von GE Healthcare LifeScience amplifiziert. Im ersten Schritt wird zu 1 - 2 µl Ausgangs-DNA 9 µl *Sample Buffer*, der unspezifische Primer enthält, zugegeben und kurzzeitig bei 95°C 3 Minuten hitzedenaturiert. Anschließend wird der Ansatz heruntergekühlt, sodass die Primer unspezifisch an die DNA binden können. Nach Zugabe des Mastermixes (1 µl Enzymmix und 9 µl *Reaction Buffer*, welcher weitere Primer und dNTPs enthält) läuft die isothermale Amplifikation bei 30 °C für 1 Stunde 45 Minuten ab. Anschließend

wird die Reaktion mittels Hitzeinaktivierung des Enzyms bei einer Temperatur von 65 °C beendet. Das auf diesem Weg erhaltene Produkt wird 1 : 25 mit USF-Wasser verdünnt und mit validierten Primern in einer PCR getestet.

### **3.3.4 Primerdesign und Etablierung**

#### **3.3.4.1 *ExonPrimer***

Für die Sequenzierung der Kandidatengene wurden Primer (Oligonukleotide) generiert, die die kodierende Sequenz sowie die Exon-Intron-Übergänge abdecken. Das Primerdesign wurde anhand dem Programm Primer 3 (Rozen und Skaletsky, 2000) über die Benutzeroberfläche *ExonPrimer* (Strom) durchgeführt. Nach Einlesen der genomischen Sequenz des Gens und dessen cDNA-Sequenz liefert die Software diverse Primer-Vorschläge für jedes Exon. Dem Programm können verschiedene Konditionen der Primer vorgegeben werden: Für die minimale Distanz zwischen Primer und Exon wurden 50 bp ausgewählt, damit Spleißstellen, die sich direkt vor und direkt nach dem Exon befinden, mit erfasst werden. Des Weiteren wurde die gewünschte Primergröße zwischen 17 bis 27 bp eingestellt und die Temperatur der Primerhybridisierung bei 61 °C angegeben. Mit der Funktion *In Silico PCR* von *UCSC Genome Browser* wurden die gefundenen Primer-Vorschläge überprüft, wie zum Beispiel die korrekte Lage der Primer auf dem entsprechenden Chromosom und dem Plus- bzw. Minusstrang der DNA und das Vorhandensein von Repeatregionen oder SNPs im Bereich der Primersequenz.

#### **3.3.4.2 Manuelle Primersuche**

Trotz der Möglichkeit des Programms, gewisse Konditionen für das Design der Primer zu berücksichtigen, kann der Fall auftreten, dass keine geeigneten Primer durch *ExonPrimer* gefunden werden oder dass die von *ExonPrimer* ausgesuchten Primer zu keiner erfolgreichen Amplifikation führen. Die Primersequenz muss dann manuell ausgewählt werden. *UCSC Genome Browser* bietet hierfür die Möglichkeit, die komplette Sequenz eines Gens anzuzeigen und außerdem die Exon- und Intronbereiche sowie SNPs durch alternierende Groß- und Kleinbuchstaben und unterschiedliche Farben zu differenzieren. Durch die Funktion *PCR* kann die Einzigartigkeit der Primer im Genom, die Schmelztemperatur und die Länge des daraus resultierenden PCR-Produktes ermittelt werden. Auf folgende Kriterien wurde bei der manuellen Auswahl geachtet:

Die Schmelztemperatur sollte zwischen 58 °C und 63 °C mit einem Optimum bei 61 °C liegen. Die Primer sollten so gewählt werden, dass diese zwischen 15 und 23 Basenpaaren lang sind und mindestens 30 Basenpaare Abstand zum Exonbeginn beziehungsweise Exonende aufweisen. Der Primer sollte nach Möglichkeit mit einem A oder T (5' – Ende) beginnen, mit einem G oder C (3' – Ende) enden und durch das Vermeiden repetitiver Bereiche oder SNPs im Bereich der Primersequenz spezifisch binden. Das Verhältnis von GC zu AT sollte in etwa 1 zu 1 betragen.

### **3.3.4.3 Etablierung der Amplifikationsreaktion**

Die lyophilisierten Primer der Firma *Thermo Scientific* wurden zur Herstellung einer Stammlösung der Konzentration 100 pmol/ µl mit USF-Wasser gelöst. Als Arbeitslösung wurde eine Verdünnung der Primer von 10 pmol/ µl verwendet und die Stammlösung wurde bei - 20°C eingelagert. Bevor die Primer bei der Sequenzierung mit Patienten-DNA eingesetzt werden konnten, wurde eine Test-PCR mit Kontroll-DNA durchgeführt. Anhand Gelelektrophorese wurde die Funktion der Primer überprüft. Eine Auflistung aller verwendeten Primer befindet sich im Anhang unter Punkt 8.1.

### **3.3.5 Sequenzierung der Kandidatengene**

#### **3.3.5.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR; *polymerase chain reaction*) ist ein selektives *in vitro* Verfahren zur exponentiellen Amplifikation einer bestimmten DNA-Sequenz in einer heterogenen Mischung genomischer DNA und kann somit zur Analyse von spezifischen DNA-Abschnitten verwendet werden (Saiki *et al.*, 1988).

Für die PCR werden Primer benötigt, die jeweils komplementär zu den beiden Strängen der Zielsequenz sind und den gewünschten Bereich flankieren. Die PCR besteht im Wesentlichen aus drei Schritten, jedoch gibt es zahlreiche Möglichkeiten zur Modifikation. Zunächst wird die doppelsträngige Ausgangs-DNA durch Erhitzen in zwei Einzelstränge aufgetrennt (Denaturierung). Durch Temperatursenkung im nächsten Schritt binden die Primer an die jeweiligen komplementären Sequenzen der einzelsträngigen *Template-DNA* (Annealing). Im finalen Schritt erfolgt die DNA-Synthese im Bereich zwischen den Primern durch eine sogenannte Taq-Polymerase, einer thermostabilen Polymerase aus

*Thermus aquaticus* (Elongation). Damit wird ein neuer DNA-Strang generiert, der komplementär zum Ziel-DNA-Strang ist. In jedem Einzelzyklus aus den Schritten Denaturierung, Annealing und Elongation wird die Menge an DNA verdoppelt, welche aus dem vorhergehenden Zyklus zur Verfügung stand. Bei einer Anzahl von  $n$  Zyklen führt dies zur Amplifikation von  $2^n$  DNA-Molekülen (Saiki *et al.*, 1988). Die Durchführung der PCR erfolgt in Thermocyclern, welche in der Lage sind, die Temperatur mit Vorgabe eines bestimmten Programms zyklisch zu variieren. Die verschiedenen PCR-Ansätze und Programme, die im Rahmen dieser Arbeit genutzt wurden, sind im Anhang unter Punkt 8.2 zusammengefasst.

### 3.3.5.2 Gelelektrophorese

Zur Darstellung der amplifizierten DNA-Abschnitte aus der Polymerasekettenreaktion wurde die Technik der nativen Agarose-Gelelektrophorese angewendet. Das Prinzip der Elektrophorese beruht darauf, dass durch Anlegen einer Spannung im elektrischen Feld negativ geladene Teilchen von der negativen Elektrode abgestoßen und von der positiven Elektrode angezogen werden. Aufgrund unterschiedliche Größe und Ladung wird eine Auftrennung der einzelnen Fragmente erreicht. Mit Hilfe eines Längenstandards kann den Fragmenten eine Basenpaarlänge zugeordnet und diese somit identifiziert werden.

Für die Gelelektrophorese wird 1,5 %-iges Agarosegel hergestellt, welches mit Ethidiumbromid versetzt wird, um die DNA-Fragmente nach Ablauf der Gelelektrophorese durch Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffes mit der DNA unter UV-Licht zu detektieren. Nach Füllen der Gelkammer werden die Gele mit 1xTBE überschichtet und die mit Ladepuffer (*loading dye*) versetzten DNA-Proben werden gemeinsam mit einem Längenstandard in die Geltaschen geladen. Nach Anlegen von Spannung (120 V, 400 mA) kann das Gel nach 30 Minuten unter UV-Licht betrachtet und fotografiert werden.

### 3.3.5.3 PCR-Aufreinigung

Im Anschluss an die Polymerasekettenreaktion erfolgte eine magnetische Aufreinigung der Produkte mit dem Pipettierroboter *Biomek®NX* (Beckman Coulter) und dem *AMPure® Kit* (Agencourt). Hierbei werden die in der PCR amplifizierten DNA-Abschnitte von anderen Komponenten, wie nicht

eingearbeiteten Primern, dNTPs, DNA-Polymerase und Salzen voneinander getrennt.

Die PCR-Amplikons binden an die in der *AMPure®*-Flüssigkeit enthaltenen magnetischen Kügelchen und können so durch einen Magneten von der umgebenden Flüssigkeit getrennt werden. Mithilfe von 70 % Ethanol werden Verunreinigungen durch Waschen entfernt. Im nächsten Schritt werden die PCR-Amplikons von den magnetischen Kügelchen eluiert und das aufgereinigte PCR-Produkt in eine neue Platte überführt (siehe Abbildung 4).

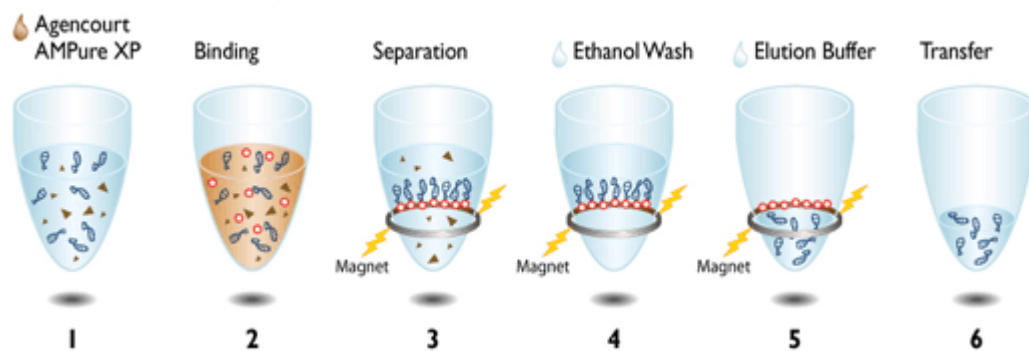


Abbildung 4: Schematischer Ablauf der Aufreinigung mit *magnetic beads*

1 PCR; 2 Bindung von PCR-Amplikons und *magnetic beads*; 3 Trennung der PCR-Amplikons von anderen Komponenten der PCR; 4 Waschen mit Ethanol; 5 Eluierung der PCR-Amplikons von den *magnetic beads*; 6 Transfer der PCR-Amplikons in neue *Tubes*

(Beckman Coulter, 2000-2013)

#### 3.3.5.4 Sequenzierreaktion

Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden mit Hilfe der Kettenabbruchmethode nach Sanger sequenziert. Dazu wurde das Kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100* von ABI verwendet. In diesem Kit sind neben normalen dNTPs auch fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (ddNTPs) enthalten, welche je nach Base auf unterschiedlichen Wellenlängen fluoreszieren.

Die DNA wird hierbei zunächst durch Hitze denaturiert und so in Einzelstränge aufgetrennt. An diese einzelsträngige Matrize lagert sich ein spezifischer Sequenzierungs-Primer an das 3'-Ende an. Nach dem Zufallsprinzip werden nun nach dem Primer dNTPs bzw. ddNTPs in den Strang eingebaut, was dazu führt, dass statistisch gesehen an jeder Stelle einmal ein fluoreszierendes ddNTP eingebaut wird und die Reaktion damit terminiert wird (Sanger *et al.*, 1977). Die entstandenen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge sind an ihrem Ende fluoreszenzmarkiert und können so durch Detektion der Farbstoffe

in die jeweilige DNA-Sequenz überführt werden. Das Protokoll für die Sequenzierreaktion befindet sich im Anhang unter Punkt 8.3.

#### **3.3.5.5 Sequenzieraufreinigung**

Die Aufreinigung der Sequenzierreaktion erfolgte analog zur Aufreinigung der Polymerasekettenreaktion nach dem Prinzip der magnetischen Aufreinigung. Dabei wurde das *CleanSeq®* System von Agencourt® genutzt, welches darauf beruht, dass die Produkte an magnetische Kügelchen gebunden werden, die wiederum an einen Magneten gebunden werden, während der restliche Ansatz verworfen wird. Nach einem Waschschriff mit 85 % Ethanol wird das Produkt mit Wasser eluiert.

#### **3.3.5.6 Automatische Sequenzierung**

Mittels automatischer Sequenzierung durch das Sequenziergerät ABI-3730 wurden die unterschiedlich langen und fluoreszenzmarkierten DNA-Abschnitte detektiert. Der Auftrennung der Produkte erfolgt in einer Kapillare mit denaturierendem Polymer. Die markierten ddNTPs werden mit einem Laser angeregt, Fluoreszenz auf einer bestimmten Wellenlänge zu emittieren, die je nach Base variiert. Diese Fluoreszenzsignale werden erkannt und im Computer zu einem Chromatogramm umgewandelt.

#### **3.3.5.7 Sequenzanalyse**

Die gewonnenen Rohdaten wurden mit Hilfe des Programms *SeqMan™* // *DNASTar Inc* ausgewertet und gegen eine Referenzsequenz aus *UCSC Hg19* verglichen. Bei Abweichung gegenüber der Referenzsequenz wurde mittels der *BLAT*-Funktion in *UCSC Genome Browser* geprüft, ob es sich dabei um einen bekannten SNP mit einer rs-Nummer handelt. Nicht-annotierte Veränderungen wurden mit verschiedenen *in silico*-Programmen genauer analysiert.

### **3.3.6 Analyse der gefundenen Varianten anhand Computerprogrammen zur Prädiktion**

#### **3.3.6.1 MutationTaster**

MutationTaster ist ein Programm zur Vorhersage der Folge von genetischen Varianten und kann anhand eines Bayes Klassifikators sowohl intronische als auch exonische Varianten analysieren (Seelow *et al.*, 2009). An einem Testsatz von über 40.000 pathogenen Varianten und über 500.000 Polymorphismen wurden die Folgen von genetischen Varianten getestet und analysiert. Bei

Angabe des betroffenen Gens und der Veränderung einschließlich der ca. 20 umgebenden Basen, kann durch die Art des Aminosäureaustausches und der Lokalisation eine gute Aussage gemacht werden, inwiefern eine Variante pathogen ist. Wichtige Aspekte sind der Grad der Konservierung und bei intronischen Varianten die Nähe zum Exon als mögliche Spleißstelle. Die Vorhersage wird mit einem p-Wert angegeben, der über die Sicherheit der Aussage Auskunft gibt.

### 3.3.6.2 SIFT

Ein weiteres Programm zur Vorhersage des Effekts eines Aminosäureaustausches ist SIFT (*Sorts Intolerant From Tolerant*). Die zu analysierende Variante wird mit homologen Sequenzen verglichen und der Konservierungsgrad wird miteinbezogen (Ng und Henikoff, 2003). SIFT kann nur Vorhersagen über exonisch gelegene Varianten treffen. Über das Programm *Variant Effect Predictor* des *Ensembl genome browser* können gefundene Varianten analysiert werden (McLaren *et al.*, 2010). Für eine Analyse mit SIFT müssen das betroffene Chromosom, Start- und Endkoordinaten der Variante, Strangbezeichnung sowie beide Allele (Wildtyp/Variante) angegeben werden.

### 3.3.6.3 PolyPhen

Wie SIFT beschränkt sich PolyPhen (*Polymorphism Phenotyping*) nur auf die Vorhersage exonischer Varianten. Hierbei berücksichtigt das Programm für seine Vorhersage sowohl den Konservierungsgrad als auch mögliche Effekte der Variante auf Funktion und Struktur des betroffenen Proteins (Ramensky *et al.*, 2002). Auch PolyPhen verwendet den *Variant Effect Predictor* des *Ensembl genome browser*. Die Daten von Ensembl basieren auf der aktuellen Version von *human genome assembly* von NCBI (McLaren *et al.*, 2010).

### 3.3.7 Filterung identifizierter Varianten mittels Kontrollplatten

Bei einer unbekannten Variante, die bei Analyse in vorher beschriebenen Programmen vermutlich als pathogen eingestuft wurde, folgte als nächster Schritt eine Untersuchung der Variante bei Gesunden. So wurden aus 95 DNA-Proben von einem Kontrollkollektiv gesunder Individuen aus der syrischen Bevölkerung das jeweilige Exon mittels PCR amplifiziert. Bei den Proben wurde bei Möglichkeit darauf geachtet, dass die geographische Herkunft der

Kontrollen und der Betroffenen mit Mutationen vergleichbar sind. So konnte die Variante durch Gelelektrophorese bei großen Insertionen oder Deletionen oder durch Sequenzierung bei Punktmutationen weiter validiert werden.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Homozygotie-Kartierung

Die Analyse homozygoter Regionen wurde anhand von 96 konsanguinen Familien durchgeführt (vergleiche 3.1.1 Konsanguines Familienkollektiv). Neun der Familien bestehen aus zwei oder drei Kernfamilien. Insgesamt konnten daher 106 Kernfamilien analysiert werden. Bei 10 Familien wurde lediglich eine Kandidatenregion ermittelt, bei 41 Familien wurden zwei, drei oder vier Kandidatenregionen ermittelt, bei 37 Familien zwischen 5 - 15 Kandidatenregionen und bei den restlichen 18 Familien wurden mehr als 15 Kandidatenregionen jeweils ermittelt (siehe Abbildung 5).

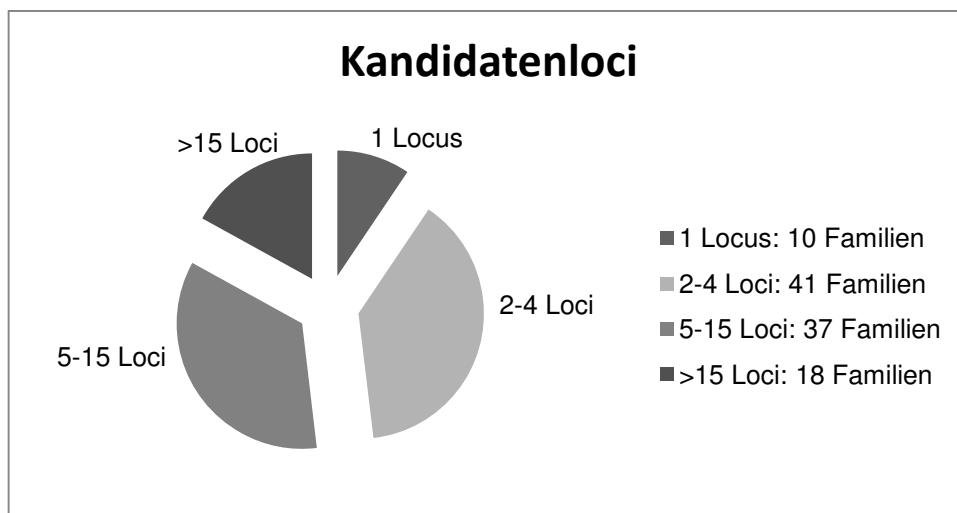


Abbildung 5: Verteilung der Kandidatenloci

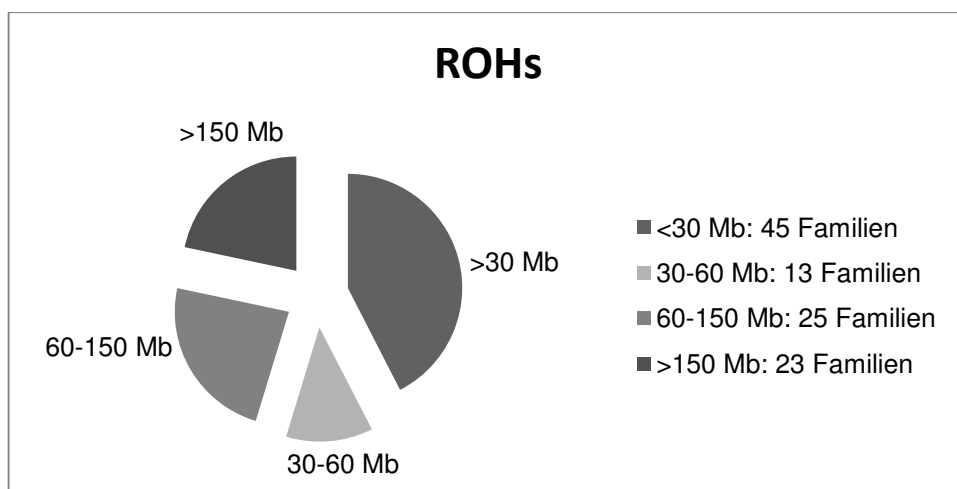


Abbildung 6: Verteilung der Gesamtlänge der ROHs

Bei 45 Familien war die Gesamtlänge der Kandidatenregionen kleiner als 30 Mb, bei 13 Familien war die Gesamtlänge der Kandidatenregionen 30-60 Mb und bei 25 Familien war die Gesamtlänge der Kandidatenregionen 60-150 Mb. Mehr als 150 Mb wurden bei 23 Familien ermittelt (Abbildung 7).

Im nächsten Schritt wurde anhand des Tools *Genome Graphs* der *UCSC*-Datenbank die Überlappungen der Kopplungsregionen der Familien, welche maximal 15 Kandidatenregionen zeigten, dargestellt. Dadurch konnten die Kandidatenregionen, in denen parallel mindestens fünf Familien Homozygotie aufweisen, herausgefiltert werden. So wurden insgesamt 21 Kandidatenregionen identifiziert (siehe Abbildung 7).

#### **4.2 Kandidatenregionen**

Zehn der 21 ermittelten Regionen werden in dieser Arbeit behandelt. Die restlichen elf Regionen werden in einer parallel angefertigten Arbeit von Karolin Eberlein untersucht. Insgesamt beinhalten die 21 Kandidatenregionen 606 Ref Seq Gene (*hg19*, freeze Februar 2009, *UCSC Genome Browser*, Stand von Juli 2012). Screenshots dieser Regionen mit Darstellung der darin lokalisierten Gene (erstellt mit *UCSC Genome Browser*, 07/2012) befinden sich im Anhang unter Punkt 8.4.

Abbildung 7 stellt die Verteilung der Kandidatenregionen über den Chromosomen dar, welche mit Hilfe von *Genome Graphs* ermittelt wurde. Die Kandidatenregionen, die in mindestens fünf Familien Homozygotie aufweisen, sind blau beziehungsweise grün markiert.

Tabelle 2 zeigt die Länge, die Lage auf dem jeweiligen Chromosom und die Anzahl der Gene in diesen Kandidatenregionen.

Nach Festlegung der Kandidatenregionen wurden dem bisherigen Patientenkollektiv sporadische Fälle aus dem *German Mental Retardation Network* (MRNET) hinzugefügt. So wurden insgesamt 24 Patienten sporadischer Fälle auf Mutationen untersucht.

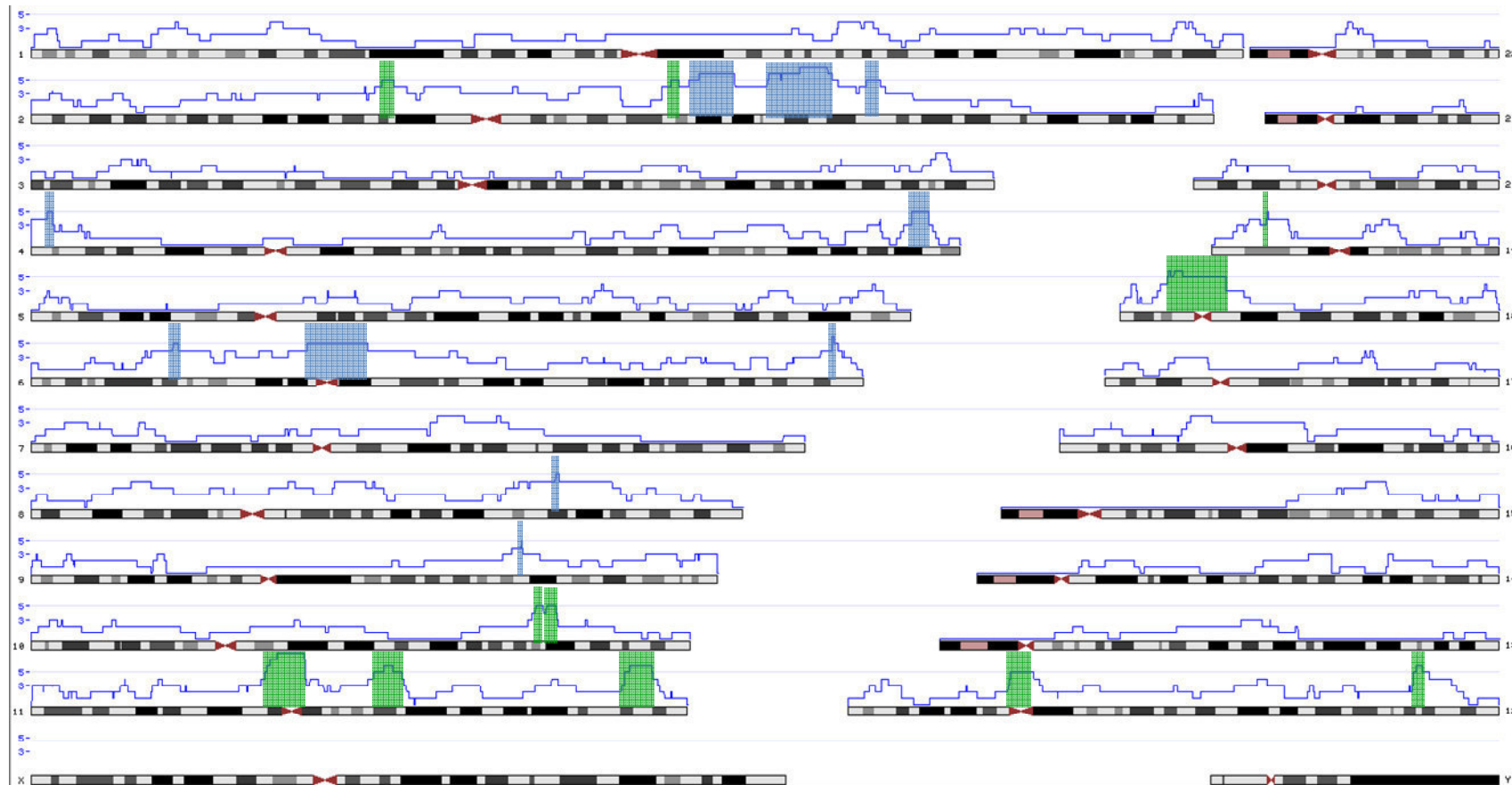


Abbildung 7: Graphische Darstellung der Kandidatenregionen mit ihrer Lage auf den Chromosomen

Die Chromosomen, dargestellt durch die grauen Balken, sind jeweils links von 1 bis 22 durchnummeriert, ebenso sind X- und Y-Chromosom gekennzeichnet. Die Kandidatenregionen werden durch die blaue Linie abgebildet, welche die Anzahl der Familien (jeweils links in blauen Ziffern angegeben auf der Skala von 3 bis 5) im jeweiligen Abschnitt des Chromosoms zeigt. Alle Regionen, bei denen mindestens fünf Familien Kandidatenregionen aufweisen, sind markiert. Blau markierte Regionen wurden in dieser Arbeit, grün markierte Regionen wurden in der Doktorarbeit von Karolin Eberlein untersucht.

| <b>Position in bp</b>               | <b>Chromosom</b>   | <b>Zahl der Gene</b> | <b>Länge</b> |
|-------------------------------------|--------------------|----------------------|--------------|
| <u>chr2:135,280,001-144,706,264</u> | chr2q21.3-q22.3    | 28                   | 9,4Mb        |
| <u>chr2:151,300,001-165,930,000</u> | chr2q23.3-q24.3    | 61                   | 14,6 Mb      |
| <u>chr2:171,740,001-174,640,000</u> | chr2q31.1          | 19                   | 2,9Mb        |
| <u>chr4:3,440,001-4,390,000</u>     | chr4p16.3          | 19                   | 0,96Mb       |
| <u>chr4:180,970,001-184,560,000</u> | chr4q34.3-q35.1    | 14                   | 3,6Mb        |
| <u>chr6:29,180,001-30,250,000</u>   | chr6p22.1          | 44                   | 1,1Mb        |
| <u>chr6:56,880,001-69,220,000</u>   | chr6p12.1-q12      | 23                   | 12,3Mb       |
| <u>chr6:164,570,001-165,860,000</u> | chr6q27            | 3                    | 1,3Mb        |
| <u>chr8:107,830,001-108,670,000</u> | chr8q23.1          | 1                    | 0,84Mb       |
| <u>chr9:100,800,001-100,920,000</u> | chr9q22.33         | 3                    | 0,12Mb       |
|                                     |                    |                      |              |
| chr2:72,160,001-74,560,000          | chr2p13.2-p13.1    | 28                   | 2,4Mb        |
| chr2:131,620,001-133,220,000        | chr2q21.1-q21.2    | 17                   | 1,6 Mb       |
| chr10:103,680,001-105,370,000       | chr10q24.32-q24.33 | 40                   | 1,7Mb        |
| chr10:105,960,001-108,030,000       | chr10q25.1         | 8                    | 2,1Mb        |
| chr11:48,090,001-56,496,368         | chr11q11.2-q12.1   | 63                   | 8,4Mb        |
| chr11:70,370,001-76,380,000         | chr11q13.3-q13.5   | 74                   | 6,0Mb        |
| chr11:122,070,001-127,750,000       | chr11q24.1-q24.2   | 69                   | 5,7Mb        |
| chr12:33,390,001-38,300,000         | chr12p11.1-q12     | 2                    | 4,9Mb        |
| chr12:116,170,001-119,590,000       | chr12q24.21-q24.23 | 21                   | 3,4Mb        |
| chr18:9,790,001-21,790,000          | chr18p11.22-q11.2  | 56                   | 12,0Mb       |
| chr19:11,460,001-11,700,000         | chr19p13.2         | 13                   | 0,24Mb       |

Tabelle 2: Übersicht über die 21 ermittelten Kandidatenregionen mit deren Lage, Länge und Anzahl der Gene. Unterstrichene Regionen wurden in dieser Arbeit behandelt.

### 4.3 Kandidatengene

#### 4.3.1 Überblick über die Kandidatengene

Die in den zehn Kandidatenregionen liegenden 216 Gene wurden nach intensiver Recherche der Literatur und der öffentlichen Datenbanken hinsichtlich Relevanz zu neurologischen Phänotypen priorisiert. Damit konnten 16 geeignete Kandidatengene ermittelt werden, welche in Tabelle 3 kurz charakterisiert werden.

| Gen             | Chr | Position            | Ex     | Am | Funktion                                                                                                                                        | Untersuchte Familien bzw. ID sporadischer Fälle                                       |
|-----------------|-----|---------------------|--------|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>TBR1</b>     | 2   | 162272620-162281573 | 6      | 8  | Regulation embryonaler Entwicklung des Gehirns                                                                                                  | MR13b, MR016, MR046, MR070, MR071a, MR077, ER50211, 40479, 50211, 53153               |
| <b>ERMN</b>     | 2   | 158175126-158184146 | 4      | 4  | Regulation Myelogenese und Entwicklung Gliazellen                                                                                               | MR13b, MR016, MR046, MR070, MR071a, MR077, ER50211, 12355, 53153, 59857               |
| <b>ACMSD</b>    | 2   | 135596186-135659600 | 1<br>0 | 10 | Assoziation mit verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen                                                                                   | MR016, MR046, MR077, ER65306, MR077, ER65306, 40479, 53926, 58951, 60412, 65306       |
| <b>NR4A2</b>    | 2   | 157180946-157189287 | 6      | 7  | Differenzierung dopaminergischer Neurone und Assoziation mit Parkinson; Mikrodeletion 2q23.3q24.1 bei MR beinhaltet unter anderem das Gen NR4A2 | MR016, MR046, MR070, MR070, MR071a, MR077, ER50211, 12355, 50211, 53153, 59857, 65110 |
| <b>DL492456</b> | 2   | 139044726-139046440 | 1      | 2  | Starke Ähnlichkeit zu <i>14-3-3 epsilon protein</i> ; Einfluss auf Entwicklung des Gehirns und neuronale Migration                              | MR016, MR046, MR070, MR077, ER65306, 40479, 56940, 58951, 60412, 65306                |
| <b>CXCR4</b>    | 2   | 136871920-136875725 | 2      | 4  | Einfluss auf Entwicklung des Gehirns                                                                                                            | MR016, MR046, MR070, MR077, ER65306, 40479, 56940, 58951, 60412, 65301                |
| <b>FMNL2</b>    | 2   | 153191751-153506346 | 2<br>6 | 25 | Mikrodeletion 2q23.3q24.1 bei MR beinhaltet unter anderem das Gen FMNL2. Regulator Rho-GTPasen                                                  | MR007, MR016, MR046, MR070, MR077, ER50211, 50211, 53153, 58432, 60412, 65110         |

|                |   |                         |        |    |                                                                                                                                                |                                                                                                                    |
|----------------|---|-------------------------|--------|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>PCLO</b>    | 7 | 82383321-<br>82792197   | 2<br>5 | 49 | Regulation Exozytose<br>Neurotransmitter und<br>Einfluss in synaptische<br>Plastizität                                                         | MR039, MR053,<br>MR057, MR079, ER<br>13171, ER54766,<br>51917, 55478,<br>63307, 65110,<br>80829                    |
| <b>DLX1</b>    | 2 | 172950208-<br>172954399 | 3      | 3  | Regulation<br>Differenzierung<br>Interneurone;<br>Assoziation mit<br>Epilepsie                                                                 | MR046, MR048,<br>MR057, MR070,<br>MR071a, MR079,<br>22771, 53152,<br>53425, 80258                                  |
| <b>TANC1</b>   | 2 | 159825146-<br>160089168 | 2<br>5 | 28 | Regulation Dendriten<br>und exzitatorische<br>Synapsen                                                                                         | MR013b, MR016,<br>MR046, MR070,<br>MR071a, MR077,<br>ER50211, 40479,<br>50211, 53153                               |
| <b>SLC4A10</b> | 2 | 162480845-<br>162841785 | 2<br>6 | 26 | Bicarbonattransporter,<br>der intrazellulären pH-<br>Wert der Neuronen und<br>Liquor reguliert                                                 | MR013b, MR016,<br>MR046, MR070,<br>MR071a, MR077,<br>ER50211, 40479,<br>50211, 53153                               |
| <b>UBXN4</b>   | 2 | 136499189-<br>136542632 | 1<br>3 | 13 | Regulation von<br>endoplasmatischer<br>Retikulum-assoziierte<br>Proteindegradierung;<br>Akkumulierung in<br>Neuronen bei<br>Alzheimerpatienten | MR016, MR046,<br>MR077, ER65306,<br>40479, 56940,<br>58951, 60412,<br>65306                                        |
| <b>RAPGEF4</b> | 2 | 173600525-<br>173917618 | 3<br>1 | 29 | Regulation Funktion und<br>Morphologie Dendriten<br>und Synapsen;<br>Assoziation mit<br>Autismus                                               | MR046, MR048,<br>MR057, MR070,<br>MR071a, MR079,<br>22771, 53152,<br>53425, 80258                                  |
| <b>NXP2</b>    | 2 | 139426729-<br>139537811 | 2      | 3  | Regulation<br>Differenzierung<br>neuropeptidähnlicher<br>Moleküle                                                                              | MR016, MR046,<br>MR070, MR077,<br>ER13171, ER65306,<br>56940, 58951,<br>60412, 65306                               |
| <b>MOG</b>     | 6 | 29624809-<br>29640147   | 8      | 6  | Regulierung<br>Myelogenese und Zell-<br>Zell-Kommunikation                                                                                     | MR22b, MR031,<br>MR038, MR093,<br>MR106, ER13171,<br>ER54766, 53926,<br>57712, 80528,<br>80718                     |
| <b>RNF39</b>   | 6 | 30038043-<br>30043628   | 4      | 5  | Einfluss in frühe Phase<br>synaptischer Plastizität                                                                                            | MR22b, MR031,<br>MR038, MR093,<br>MR106, ER13171,<br>ER54766, ER<br>59296, 53926,<br>57712, 60008,<br>80528, 80718 |

Tabelle 3: Übersicht über die Kandidatengene: Chr = Chromosom, Ex = Exon, Am = Amplicon

Eine Tabelle mit Priorisierung aller 216 Gene der untersuchten zehn Regionen ist im Anhang unter Punkt 8.5 aufgeführt.

#### **4.3.2 Funktionen der einzelnen Gene**

Im folgenden Abschnitt wird die Funktion und Expression der 16 ermittelten Kandidatengene mit weiteren Details dargestellt:

##### ***TBR1***

*TBR1*, welches für ein Mitglied der T-Box-Transkriptionsfaktoren-Familie kodiert, wird vor allem im Kortex in den Schichten V und VI exprimiert und reguliert die Entwicklung von kortikalen Projektionsneuronen (McKenna *et al.*, 2011). Bei Versuchen mit Mäusen führte der Knockdown von *TBR1* zu schwerer Mikrozephalie, einer defekten kortikalen Konnektivität und zudem einer Malformation des Vorderhirns aufgrund anormaler Dispersion von Neuronen im Cortex (Najm *et al.*, 2008). Außerdem reguliert *TBR1* die Expression des extrazellulären Matrixproteins Reelin, hauptverantwortlich für neuronale Migration und Lamination (D'Arcangelo und Curran, 1998).

##### ***ERMN***

*ERMN* wird ausschließlich von Oligodendrozyten exprimiert und erscheint in einem späten Stadium der Myelinisierung. Die Expression von *ERMN* ruft durch die Regulation des zytoskeletalen Umbaus die für die Myelogenese notwendigen morphologischen Veränderung von Oligodendrozyten hervor (Brockschneider *et al.*, 2006). Des Weiteren fanden Wang *et al.* eine geringere Konzentration des kodierten Proteins bei Epilepsiepatienten (Wang *et al.*, 2011).

##### ***ACMSD***

*ACMSD* reguliert die Homöostase von NAD, Picolinsäure und Chinolinsäure. Picolinsäure und Chinolinsäure sind Schlüsselenzyme für eine Anzahl physiologischer und pathologischer Vorgänge, die das zentrale Nervensystem betreffen (Garavaglia *et al.*, 2009). Die Erhöhung der Chinolinsäurekonzentration im Gehirn steht mit der Pathogenese verschiedener neurodegenerativen Erkrankungen im Zusammenhang (Fukuoka *et al.*, 2003). Außerdem vermuten Zimprich *et al.* aufgrund genomweiter Assoziationsstudien Varianten von *ACMSD* als Risikofaktor für Parkinson (Zimprich, 2011).

### **NR4A2**

*NR4A2* ist ein Transkriptionsfaktor, der Differenzierung, Reifung und das Überleben von dopaminergen Neuronen beeinflusst. Zudem spielt das Gen eine Rolle in der Expression von mehreren Proteinen, die für Synthese und Regulation von Dopamin notwendig sind. (Park *et al.*, 2006; Perlmann und Wallen-Mackenzie, 2004; Smits *et al.*, 2003; Wallen *et al.*, 2001). Mutationen sind assoziiert mit Erkrankungen, die mit dopaminergen Dysfunktionen einhergehen, wie Parkinson, Schizophrenie und bipolarer Störung (Chen *et al.*, 2001; DeLisi *et al.*, 2002; Le *et al.*, 2003; Lewis *et al.*, 2003). Lybaek *et al.* wiesen bei einer Patientin mit schwerer mentaler Retardierung die Mikrodeletion 2q23.3q24.1 nach. Diese Region beinhaltet sieben Gene, von denen aufgrund von Funktion und Ähnlichkeit zu bereits bekannten MR-Genen *NR4A2* und *FMNL2* (siehe unten) als Ursache für Mentale Retardierung am wahrscheinlichsten sind (Lybaek *et al.*, 2009).

### **DL492456**

*DL492456* zeigt eine hohe Ähnlichkeit zu *14-3-3 epsilon protein*, ein Phosphoserin/Threonin-Bindeprotein. Bei Mäusen, denen dieses Gen fehlt, wurden Störungen in Gehirnentwicklung und neuronaler Migration festgestellt. Zudem beinhaltet die beim Miller-Dieker-Syndrom auftretende Mikrodeletion 17p13.3 unter anderem das *14-3-3 epsilon protein*. Das Miller-Dieker-Syndrom geht mit Lissenzephalie und fazialen Dysmorphien einher (Toyo-oka *et al.*, 2003).

### **CXCR4**

*CXCR4* ist ein Chemokinrezeptor, welcher durch den Ligand SDF-1 aktiviert wird (Rossi und Zlotnik, 2000). Der Komplex SDF-1/*CXCR4* spielt eine Rolle bei der Entwicklung des Kleinhirns, Hippocampus, Neokortex und des Rückenmarks via Modulation von Zellmigration, Axonwachstum und Regulation von Zelltod- und Proliferation. Der Knockdown von *CXCR4* bei Mäusen führt zum Tod im Embryonalstadium aufgrund eines Mangels neuronaler Stammzellen (Lu *et al.*, 2002; Stumm *et al.*, 2003).

### **FMNL2**

*FMNL2* agiert als Effektor von Rho-abhängigen GTPasen und modulieren das Aktin- und Mikrotubuli Zytoskelett, wodurch die Morphologie dendritischer

Fortsätze beeinflusst wird (Young und Copeland, 2010). Newey et al. nehmen an, dass Defekte in Struktur und Funktion synaptischer Fortsätze in einigen Fällen von Mentaler Retardierung ursächlich sind (Newey et al., 2005).

Lybaek et al. vermuten bei einer Patientin mit Mentaler Retardierung mit der Mikrodeletion 2q23.3q24.1 neben *NR4A2* *FMNL2* aufgrund deren Funktionen im Gehirn als Ursache für die Erkrankungen (Lybaek et al., 2009).

### ***PCLO***

*PCLO* kodiert für ein Protein in der aktiven Zone in präsynaptischen Nervenendigungen, das während der frühen neuronalen Differenzierung exprimiert wird. *PCLO* beeinflusst die basale Erregungsübertragung zwischen Nervenzellen und die synaptische Plastizität. Die Neurotransmitterausschüttung wird über die Modulation synaptischer Vesikel reguliert. Das hoch konservierte Gen liegt in einer Linkage-Region, welche mit Autismus und dem Williams-Beuren-Syndrom assoziiert ist (Fenster und Garner, 2002; Ibi et al., 2010). In genomweiten Assoziationsstudien stellte Choi et. al eine Korrelation von Varianten von *PCLO* mit bipolaren Störungen fest (Choi et al., 2011).

### ***DLX1***

*DLX1*, das für ein Mitglied der Homeobox-Transkriptionsfaktoren-Familie kodiert, kontrolliert die kraniofaziale Entwicklung, die Differenzierung und das Überleben von Interneuronen im Vorderhirn. Der Knockdown von *DLX1* bei Mäusen führte zu einem Verlust von GABA-ergen Interneuronen und zu verminderter Inhibition, was Rhythmusstörungen der Gehirnströme auslöste. Veränderungen des Rhythmus kann neben Epilepsie, Veränderungen in der Entwicklung und der Funktion neuronaler Systeme wie Kognition und Gedächtnis hervorrufen (Cobos et al., 2005a; Cobos et al., 2005b).

### ***TANC1***

*TANC1* kodiert für Stützproteine, die an exzitatorischen Synapsen lokalisiert sind. Durch Interaktion mit anderen Proteinen und Komplexbildung werden dendritische Fortsätze und die Aktivität exzitatorischer Synapsen reguliert. Durch Knockdown von *TANC1* bei Mäusen verringerte sich die Dichte dendritischer Fortsätze und führte zu einer Beeinträchtigung des räumlichen Gedächtnisses (Han et al., 2010; Suzuki et al., 2005). Granot-Hershkovitz et al. dokumentierten bei einer Patientin mit Intelligenzminderung die Inversion

inv(2)(p15q24.2) mit Bruchstellen von drei Genen, welches auch *TANC1* miteinschließt (Granot-Hershkovitz *et al.*, 2011).

### ***SLC4A10***

*SLC4A10*, ein Mitglied der *SLC4*-Familie, kodiert für einen Na<sup>+</sup>-gekoppelten Bikarbonattransporter, der den intrazellulären pH-Wert der Neurone, die Sekretion von Bikarbonat durch den Plexus Choroideus und den extrazellulären pH-Wert des Liquors reguliert (Pushkin und Kurtz, 2006). Gurnett *et al.* wiesen bei einer Patientin mit partieller Epilepsie und Mentaler Retardierung die chromosomale Translokation t(2;13)(q24;q31) nach, die einen Bruch von *SLC4A10* nach sich zieht. Aufgrund des Verlusts der Regulation des pH-Wertes wird vermutet, dass die Expression von *SLC4A10* Einfluss auf kognitive Funktionen und neuronale Exzitabilität hat (Gurnett *et al.*, 2008).

### ***UBXN4***

*UBXN4* kodiert das im endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisierte Protein Erasin. Dieses Protein nimmt Einfluss auf die endoplasmatische Retikulum-assoziierte Proteindegradation. Erasin fördert die Proteindegradation und kann bei niedrigem Level die Proteindegradation senken, bei ER-Stress steigt dagegen das Proteinlevel. Bei Alzheimerpatienten akkumuliert das Protein bevorzugt in Neuronen mit neurofibrillärer Degeneration (Liang *et al.*, 2006).

### ***RAPGEF4***

*RAPGEF4* kodiert das Signalprotein EPAC2, welches in den synaptischen Dichten exprimiert wird (Jordan *et al.*, 2004). EPAC2 ist notwendig für verschiedene Funktionen der Neuronen wie Langzeitdepression (LTD), Depotenzierung, Langzeitpotenzierung (synaptische Plastizität) und räumliches Gedächtnis (Morozov *et al.*, 2003). Dies geschieht durch Modulation der dendritischen Fortsätze via Veränderung der Motilität. Neuropathologische Erkrankungen wie Autismusspektrumstörungen werden oft mit Veränderungen der Morphologie dendritischer Fortsätze in Verbindung gebracht (Penzes *et al.*, 2011; Woolfrey *et al.*, 2009).

### ***NXPH2***

*NXPH2* kodiert für Neurexophilin2, ein neuronales Glykoprotein. Es wird hauptsächlich im Gehirn exprimiert und wirkt als ein Signalmolekül, welches durch Bindung an  $\alpha$ -Neurexine agiert. Struktur und Charakteristika des Proteins

weisen eine große Ähnlichkeit mit Neuropeptiden auf (Missler *et al.*, 1998). Cukier *et al.* vermuten eine Assoziation von *NXPH2* mit Autismus (Cukier *et al.*, 2011).

### **MOG**

Das Produkt von *MOG* wird auf der Oberfläche von Oligodendrozyten und auf der äußersten Schicht der Myelinscheide exprimiert. *MOG* spielt eine Rolle im Abschluss der Entwicklung und der Erhaltung der Myelinscheiden und der Zell-Zell-Kommunikation (Pham-Dinh *et al.*, 1993). Pathologisch beeinflussen Antikörper von *MOG* immuninduzierte Demyelinisierung und Schmidt *et al.* identifizierten erhöhte Proteinlevel bei Patienten mit Adrenoleukodystrophie und Multipler Sklerose (Schmidt *et al.*, 2001).

### **RNF39**

*RNF39* kodiert für ein mRNA-bindendes Protein, welches vor allem in Purkinje-Zellen exprimiert wird. Neuronale RNA-bindende Proteine regulieren durch Transport und die Translation der dort befindlichen mRNAs die Proteinsynthese in postsynaptischen Zellen, welche essentiell für Lang-Zeit-Potenzierung (synaptische Plastizität, LTP) und Lang-Zeit-Depression (LTD) ist (Iijima *et al.*, 2005; Kang und Schuman, 1996). Das bekannteste mRNA-bindende Protein ist das Fragile X-Protein (FMRP). Der Verlust des Gens führt bei Fragilen X-Patienten zu neurologischen Defekten (Iijima *et al.*, 2007; Koekkoek *et al.*, 2005; Kooy, 2003). Iijima *et al.* beschrieben bei Knockout von *RNF39* schwerwiegende Einschränkungen in der motorischen Lernfähigkeit, was vermuten lässt, dass das Gen einen wichtigen Beitrag zur synaptischen Plastizität leistet (Iijima *et al.*, 2007).

## 4.4 Ergebnisse der Sequenzierung

### 4.4.1 Annotierte Varianten

Für die Kandidatengene wurden Primer etabliert und in jeweils durchschnittlich zehn betroffenen Personen sequenziert. Nach der Auswertung der Rohdaten und dem Vergleich mit einer Referenzsequenz aus *UCSC Hg19* wurden insgesamt 96 Varianten detektiert. 93 der Varianten sind bereits in dbSNP135 annotiert. Eine Tabelle mit allen annotierten Varianten ist im Anhang unter Punkt 8.6 aufgeführt.

### 4.4.2 Nicht-annotierte Varianten

Neben den eingetragenen Varianten konnten drei nicht-annotierte Varianten ermittelt werden, welche weiterverfolgt wurden.

| Veränderung auf DNA-Ebene | Position                    | Familie    | Gen         | AS-Austausch |
|---------------------------|-----------------------------|------------|-------------|--------------|
| g.28688_28689insTT        | chr7:82763558_82763559insAA | MR39, MR79 | <i>PCLO</i> |              |
| g.245993G>A               | chr7:82546254C>T            | MR53       | <i>PCLO</i> |              |
| c.12137A>G                | chr7:82545165T>C            | 65110      | <i>PCLO</i> | Y4046C       |

Tabelle 4: Übersicht über nicht-annotierte Varianten

AS = Aminosäure

#### 4.4.2.1 *PCLO*: g.28688\_28689insTT

Das *in silico*-Programm MutationTaster stuft die Variante *PCLO*: g.28688\_28689insTT als krankheitsverursachend ein. Der Wahrscheinlichkeitswert wird mit 1 angegeben. PolyPhen und SIFT behandeln diese Variante als *Splice-Site*-Variante und als Intron-Variante. Durch die Lage der Insertion wird die *Splice-Site* des Exons verändert, was zu potentiellen Funktionsänderungen des Proteins führen kann. Darauf wurde gesunde syrische Bevölkerung (95 Kontrollen) anhand PCR und Sequenzierung auf diese Insertion in *PCLO* gescreent. Drei von den 95 Kontrollen zeigten die zuvor gefundene Variante.

#### 4.4.2.2 *PCLO*: g.245993G>A

Bei Familie 53 wurde nach Sequenzierung des Gens *PCLO* ein im Intron gelegener Basenpaaraustausch von Guanin zu Adenin auf Chromosom 7 detektiert. Die Analyse ergab eine Veränderung der *Splice-Site* und der Wahrscheinlichkeitswert liegt bei 0,99. Die *in silico*-Programme MutationTaster, PolyPhen und SIFT stuften diese Veränderung als Polymorphismus ein und so wurde die Variante nicht weiterverfolgt.

#### 4.4.2.3 *PCLO*: c.12137A>G

##### 4.4.2.3.1 *In silico*-Analyse

Das Ergebnis der Analyse von *PCLO*: c.12137A>G durch MutationTaster ergibt, dass der gefundene Basenaustausch von Adenin zu Guanin im Exon 7 des Gens *PCLO* bei Patient 65110 potentiell krankheitsverursachend sein kann (siehe Abbildung 8). Im übrigen Untersuchungskollektiv wurde oben genannte Variante ausgeschlossen.



mutation t@sting

#### Prediction

disease causing Model: simple\_aae, prob: 0.999995111881474

##### Summary

- amino acid sequence changed

##### analysed issue

name of alteration  
alteration (phys. location)  
HGNC symbol  
Ensembl transcript ID  
UniProt peptide  
alteration type  
alteration region  
DNA changes

##### analysis result

no title  
chr7:82545165T>C  
[PCLO](#)  
[ENST00000423517](#)  
[Q9Y6V0](#)  
single base exchange  
CDS  
c.12137A>G  
cDNA.12475A>G  
g.247082A>G

##### AA changes

position(s) of altered AA  
if AA alteration in CDS

Y4046C Score: 194 [explain score\(s\)](#)  
4046

##### frameshift

dbSNP / TGP / HGMD(public) / ClinVar

no

no SNPs in altered region found

Abbildung 8: Screenshot der MutationTaster-Analyse von *PCLO*: c.12137A>G

In der weiteren *in silico*-Analyse stuften PolyPhen und SIFT mit einem Wahrscheinlichkeitswert von 0,994 die Punktmutation als wahrscheinlich

schädigend ein. Der Austausch von Guanin zu Adenin führt zu einem Aminosäureaustausch von Tyrosin zu Cystein.

Daraufhin wurde die phylogenetische Konservierung der betroffenen Region mittels *UCSC Genome Browser* untersucht (siehe Abbildung 9). Die Unveränderlichkeit der Aminosäuresequenz bei den verschiedenen dargestellten Organismen lässt darauf schließen, dass die detektierte Variante in einer evolutionär hochkonservierten Region liegt und damit funktionell besonders wichtig ist.

#### **4.4.2.3.2 Kontrollkollektiv**

Zur weiteren Überprüfung wurden 281 syrische Personen und 95 deutsche Personen aus einem gesunden Kontrollkollektiv anhand PCR und Sequenzierung auf die Variante hin untersucht. Keine der Kontrollen zeigte diesen Basenaustausch.

#### **4.4.2.3.3 Bioinformatische Analyse**

In Kooperation mit Professor Dr. Heinrich Sticht des Instituts für Biochemie der Universität Erlangen – Nürnberg wurde die Funktion der Aminosäure Tyrosin des Wildtyps bioinformatisch analysiert: Das „YVLI“-Motiv erfüllt den Y-x-x-[LMVIF] Konsensus, der ein Tyrosin-basierendes „sorting signal“ für die Interaktion mit einem Adaptor-Protein-Komplex darstellt. Es gibt Hinweise, dass Y4046C phosphoryliert wird und dann in der phosphorylierten Form Interaktionen mit SH2-Domänen von anderen Proteinen vermittelt. Es gibt zwei potentielle Interaktionspartner:

1. Phospholipase C-gamma 1 (PLCG1) und Phospholipase C-gamma 2 (PLCG2)
2. Inositol-1,4,5-trisphosphat 5-Phosphatase SHIP (INP4A)

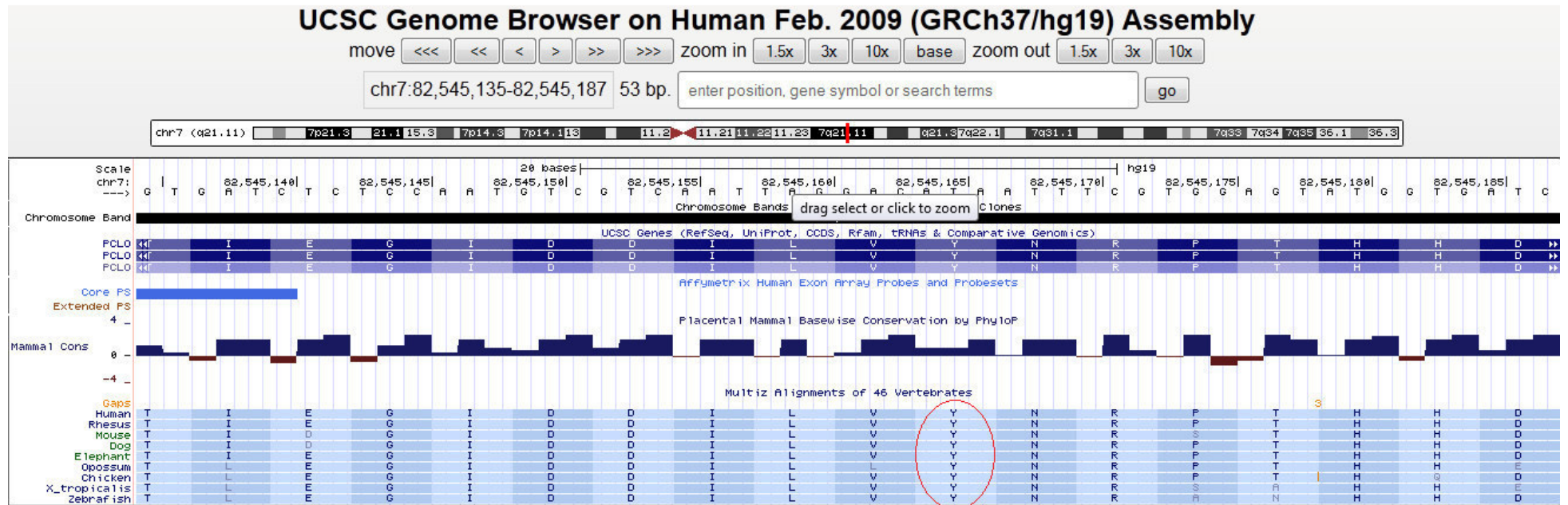


Abbildung 9: Darstellung der Aminosäuren im betroffenen Abschnitt bei Mensch, Rhesusaffe, Maus, Hund, Elefant, Opossum, Huhn, XenopusTropicalis und Zebrafisch. Die Konservierung der betroffenen Aminosäure Cystein ist rot markiert.

## **5 Diskussion**

### **5.1 Sequenzierungsergebnisse der Kandidatengene**

Homozygotie-Kartierung, Auswahl von Kandidatengenen und Sequenzierung in Kandidatenfamilien ist ein möglicher Ansatz um neue Gene für autosomal rezessive Mentale Retardierung zu identifizieren. Durch diese Vorgehensweise wurde am Institut der Humangenetik in Erlangen zum Beispiel bei TRAPPC9 und AP4E1 Mutationen gefunden (Abou Jamra *et al.*, 2011a; Abou Jamra *et al.*, 2011b). Nach Sequenzierung von insgesamt 192 Exons in 16 Genen konnte neben zahlreichen annotierten Varianten eine Kandidatenmutation gefunden werden. Die Nicht-Identifizierung von weiteren Kandidatenmutationen könnte durch eine falsche Priorisierung der Gene oder durch die falsche Auswahl des Untersuchungskollektivs begründet sein. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass die Mutation in nicht sequenzierten Abschnitten der untersuchten Gene liegt. Ebenso kann eine nicht-genetische Ursache oder ein anderer Erbgang nicht ausgeschlossen werden.

#### **5.1.1 Falsche Auswahl der Gene oder Familie**

Von den 216 in den Regionen gelegenen Genen wurden durch Priorisierung 16 Gene ausgewählt. Aufgrund der extremen Heterogenität und Vielfältigkeit der MR-Gene, die sich in den bislang veröffentlichten Publikationen zeigen, stellt die Priorisierung eine Herausforderung dar. Viele unterschiedliche Gene übernehmen wichtige Funktionen bei Neurogenese, Neuronaler Migration, Aufbau und Funktion an Synapsen und Transkription und bereits gefundene MR-Gene sind in verschiedenen biologischen Prozessen involviert (Chelly *et al.*, 2006; Mochida *et al.*, 2009). Des Weiteren ist trotz intensiver Recherche die Funktion einiger Gene immer noch unbekannt. Eine weitere Ursache für die Sequenzierungsergebnisse kann sein, dass das ausgewählte Gen zwar im Grunde mit Mentaler Retardierung assoziiert ist, aber nicht ursächlich für die Erkrankung der Patienten des Untersuchungskollektivs ist.

#### **5.1.2 Mutationen in nicht sequenzierten Abschnitten des Gens**

Die Nicht-Identifizierung von weiteren Kandidatenmutationen kann an der ausschließlichen Sequenzierung von Exons der ausgesuchten Kandidatengene liegen. Es wurden keine Promotorsequenzen oder Enhancer- beziehungsweise Silencersequenzen untersucht, was zu Veränderungen in der Expression und Aktivität des Gens führen könnte. Weiterhin erfolgte auch keine Analyse von

Introns, die entscheidend für das alternative Spleißen von mRNAs sind. So könnte eine Mutation in den entscheidenden Spleißstellen zu einer Veränderung der Proteinstruktur führen, welche möglicherweise die Funktion des Gens beeinflusst (Lucarini *et al.*, 2005).

### **5.1.3 Keine autosomal rezessive Mentale Retardierung aufgrund homozygoter Mutation**

Trotz der Analyse der Stammbäume des Untersuchungskollektivs, die auf autosomal rezessive Mentale Retardierung schließen lassen, kann ein anderer Vererbungsmodus oder eine nicht-genetische Ursache der Grund für Mentale Retardierung der Patienten sein (Ropers, 2010). Eine de-novo-Mutation mit autosomal dominanten Erbgang könnte vorkommen, wenn bei einer Familie nur ein Kind betroffen ist. Bei den Familien mit mehreren Betroffenen ist dies sehr unwahrscheinlich. Viel wahrscheinlicher kann zum Beispiel eine Compound-Heterozygotie in einer nicht homozygoten Region vorliegen.

## **5.2 Analyse der Variante *PCLO*: c.12137A>G**

### **5.2.1 Funktion des kodierten Proteins piccolo**

Aufgrund der essentiellen Funktion des Proteins piccolo im Gehirn durch Beeinflussung der basalen Erregungsübertragung zwischen Nervenzellen und der synaptischen Plastizität ist die Variante im Gen *PCLO* sehr interessant. *PCLO* kodiert für eines der größten Zytomatrixproteine der Aktiven Zone der Synapse (Fenster und Garner, 2002). Die Aktive Zone ist die Ausschüttungszone in der präsynaptischen Membran, in der die Verschmelzung der Neurotransmittervesikel mit der Membran erfolgt.

Die Regulation der Erregungsübertragung geschieht durch Einfluss der Neurotransmitterausschüttung, genauer durch Modulation des Kreislaufes synaptischer Vesikel. Dabei können verschiedene Populationen von Vesikeln unterschieden werden: Vesikel, die mit einem gewissen Abstand von der Plasmamembran der Aktiven Zone präsynaptischer Nervenendigungen lokalisiert sind, bilden den „Reserve Pool“. Im Verlauf werden Vesikel aus dem „Reserve Pool“ aktiv zur Plasmamembran überführt und dort verankert („docking“). Diese gedockten Vesikel werden vor der Fusionierung mit der Plasmamembran fusions-kompetent gemacht („priming“). Geprimte Vesikel können nach einem Stimulus wie zum Beispiel Calciumeinstrom fusionieren und bilden den „Release Ready Pool“. Nach Exozytose der Neurotransmitter

werden fusionierte Vesikel durch Endozytose wieder in das Innere der Präsynapse befördert. Dort gehen sie nach Befüllung mit Neurotransmittermolekülen wieder in den „Reserve Pool“ über oder werden abgebaut.

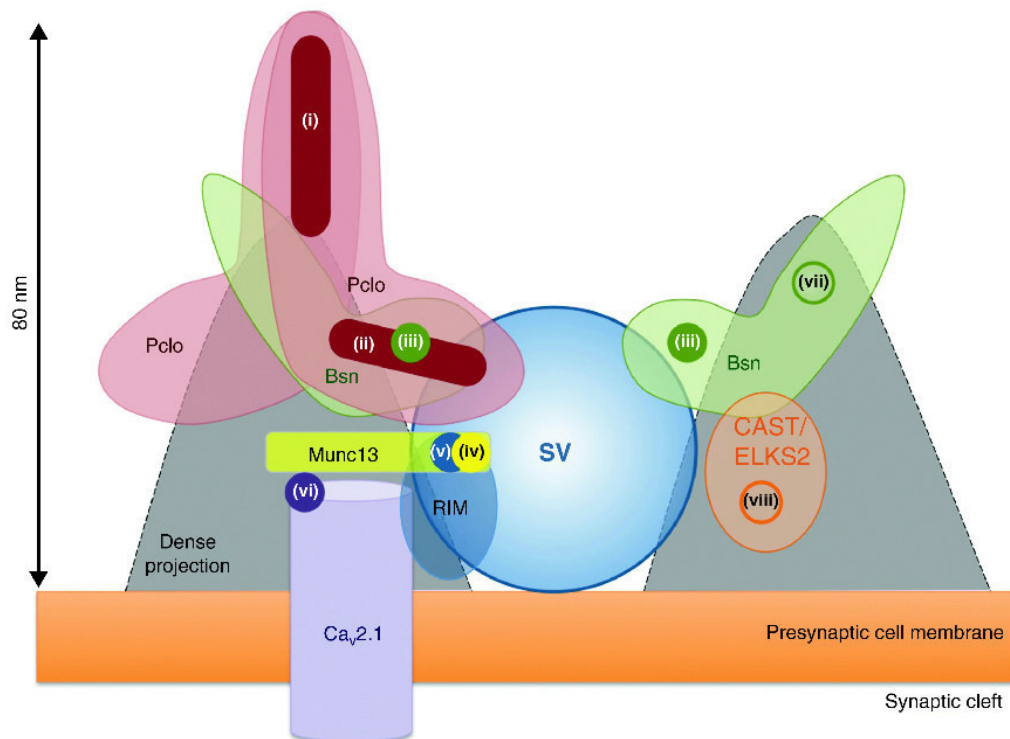


Abbildung 10: Schema über Organisation und Lokalisation der Proteine in der aktiven Zone von Synapsen des Gehirns: In enger topografischer Nähe mit dem Protein Bassoon (Bsn) beeinflusst *PCLO* in Interaktion mit weiteren Proteinen die Ausschüttung der synaptischen Vesikel (SV).

*PCLO* (i): N-Terminus von *PCLO*; *PCLO* (ii): C-Terminus von *PCLO*; Bsn (iii): Bassoon, Munc13 (vi): N-Terminus von Munc13; RIM (v): N-Terminus von RIM; Ca<sub>v</sub>2.1 (vi): P/Q-Typ Kalziumkanal; CAST/ELKS2 (viii): N-Terminus von CAST/ELKS2; (Gundelfinger und Fejtova, 2012)

Für Mobilisierung, Fusion und Endozytose der Vesikel werden viele Proteine benötigt, doch das Protein F-Actin spielt eine besondere Rolle, da es jeden Schritt moduliert. F-Actin ist wie piccolo ein Komponent der Zytomatrix der Aktiven Zone und reguliert durch Polymerisation und Interaktion mit Synapsin1A die Exozytose von Neurotransmittern (siehe Abbildung 11). Waites et al. zeigten den Einfluss von piccolo auf die Funktion von F-Actin. Der Knockdown von *PCLO* führte zu erhöhter Synapsin1A Dispersion und erniedrigter F-Actin Assemblierung, was in einer erhöhten Exozytoserate resultierte. Des Weiteren

wird durch Modulation von F-Actin die Rekrutierung des Proteins CAMKII erniedrigt. CAMKII ist ein präsynaptisches Signalprotein, welches zum einen Langzeitpotenzierung (LTP) und zum anderen auch Langzeitdepression (LTD) induziert. So spielt piccolo ebenso eine Rolle im Mechanismus von prä- und postsynaptischer Plastizität (Waites *et al.*, 2011; Wang, 2008).

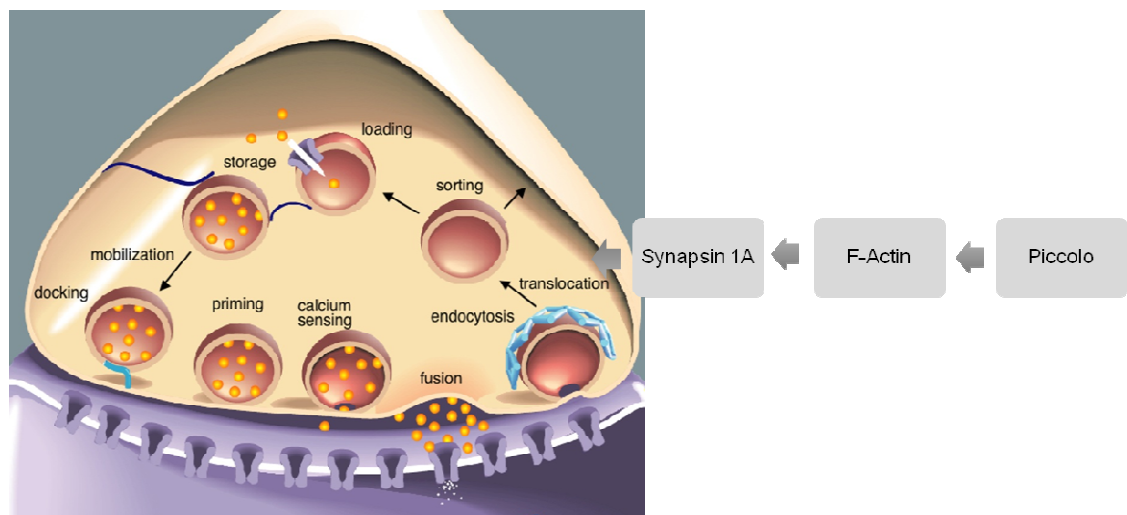


Abbildung 11: Schema über Kreislauf synaptischer Vesikel: *PCLO* reguliert über die Assemblierung des Proteins F-Actin und über Synapsin1A die Translokation synaptischer Vesikel.

modifiziert nach Richmond and Broadie (Richmond und Broadie, 2002)

Fenster und Garner erkannten, dass *PCLO* einen hohen Grad an Sequenzähnlichkeit mit dem Aktive-Zone-Protein *BSN* aufweist. Die meisten der Regionen, die eine Homologie aufweisen, sind auf kurze Regionen beschränkt, welche von Sequenzen, die ohne Bezug zueinander sind, flankiert sind (Fenster und Garner, 2002).

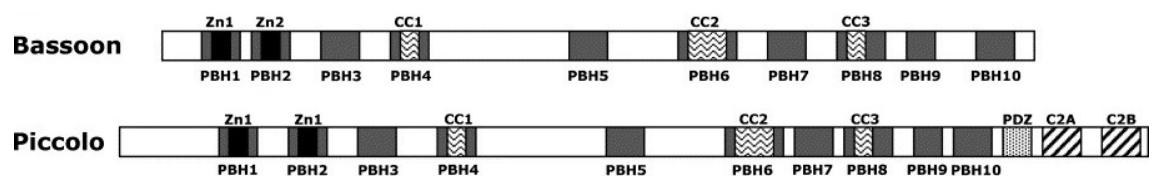


Abbildung 12: Vergleich der Aminosäuresequenz von *Bassoon* und *PCLO* (Fenster und Garner, 2002)

### 5.2.2 Phänotyp des Patienten 65110 mit der Variante *PCLO*: c.12137A>G

Nach unauffälliger Schwangerschaft wurde der männliche Patient in der 38. Schwangerschaftswoche per Sectio geboren. Bei normalen Geburtsgewicht, Körperlänge und Kopfumfang konnten keine organischen Fehlbildungen festgestellt werden. Ebenso sind keine Krampfanfälle bekannt und eine EEG Untersuchung zeigte keine Auffälligkeiten. Der Säugling war anfällig für Infekte und hatte vor dem Einsatz von Paukenröhrchen bis zu fünf akute Mittelohrentzündungen im Jahr. Ab dem Sprachbeginn mit zwölf Monaten bis zum Alter von vier Jahren konnte der Patient nur „Mama“ und „Papa“ sagen. Zum Untersuchungszeitpunkt war der Patient imstande, Mehrwortsätze zu sprechen, aber mit begrenztem Wortschatz. Das freie Stehen und Laufen erlernte er im Alter von 15 Monaten. Neben den Sprachproblemen hat der Patient Feinmotorik- und Konzentrationsschwierigkeiten sowie ein Aufmerksamkeitsdefizit. Außerdem besteht ein Einnässen tagsüber. Ein Entwicklungstest ergab einen IQ-Wert von 85. Nach einem Jahr im Regelkindergarten wurde der Junge in einen Förderkindergarten integriert. Ein Besuch in der Förderschule war geplant. Im Umgang mit anderen Kindern im Umfeld hat der Patient Schwierigkeiten.

Im Alter von sieben Jahren wurde der Patient türkischer Abstammung im Humangenetischen Institut in Erlangen untersucht. An morphologischen Besonderheiten zeigen sich ein prominentes Mittelgesicht, volle Lippen, tiefliegende Augen, eine leichte Synophrys, ein hoher Nasenrücken, ein tiefer vorderer Haaransatz und Sandalenlücken.

Die Familienanamnese ergab, dass keine andere Person in der Verwandtschaft mit Entwicklungsverzögerung bekannt ist. Seine Schwester entwickelt sich unauffällig. Mutter und Vater des Patienten sind miteinander verwandt. Ein Halbbruder (gemeinsamer Vater) der Großmutter des Patienten ist der Großvater des Vaters.

Nach ersten Untersuchungen konnte eine Chromosomenanomalie, Fragiles-X-Syndrom und kleine Deletionen ausgeschlossen werden. Auch die Analyse des X-Inaktivierungsmusters der Mutter ist unauffällig.

### 5.2.3 Weiteres Vorgehen

#### 5.2.3.1 Identifizierung von weiteren Mutationen in *PCLO*

Zur weiteren Untermauerung einer ursächlichen Wirkung dieser Variante beziehungsweise dass Mutationen in *PCLO* zu Mentaler Retardierung führen können, ist die Identifizierung von weiteren Mutationen in diesem Gen bei Personen mit Mentaler Retardierung geplant. Die Analyse von weiteren Mutationen in *PCLO* soll in drei Stufen abgehandelt werden:

1. Sequenzierung des Abschnittes, der an die Mutation angrenzt, in großen Kollektiven
2. Anfrage bei anderen Instituten für Humangenetik, ob *PCLO* eine Kandidatenmutation aufweist
3. Sequenzierung des gesamten Gens in großen Kollektiven mittels neuerer Technologien, zum Beispiel *next generation sequencing*

Nach Abschluss dieser Arbeit wurde durch andere Mitglieder der Arbeitsgemeinschaft bislang noch keine weitere Variante in *PCLO* gefunden.

Parallel dazu wird eine Suche nach Mutationen im Orthologen *Bassoon* mit der gleichen Vorgehensweise begonnen.

#### 5.2.3.2 Funktionelle Analysen

Um nachzuweisen, ob die identifizierte Variante in der Tat einen pathogenen Effekt hat, sollen in Kooperation mit der „AG for chemical synapses“ um Professor Dr. Eckart Gundelfinger und Dr. Anna Fejtova vom Institut Neurochemie und molekularer Biochemie des Leibnizinstituts für Neurobiologie Magdeburg Untersuchungen durchgeführt werden. Mittels bereits etablierter Zelllinien des Orthologen *Bassoons* soll der potentielle Interaktionspartner und die Wirkung der gefundenen Variante identifiziert werden.

Um den Partner von Piccolo mit einer SH2-Domäne zu ermitteln, wird ein *Pulldown-Assay* durchgeführt. Eine SH2-Domäne ist eine Proteindomäne, die spezifische Proteininteraktionen vermittelt. Die Region von etwa 100 Aminosäuren der SH2-Domäne erkennt insbesondere Peptide mit phosphoryliertem Tyrosin, was auf den Abschnitt der Variante in *PCLO* zutrifft. Der *Pulldown-Assay* ist eine Methode, um in vitro Interaktionen zwischen Proteinen nachzuweisen und kann dazu verwendet werden, um Interaktionspartner für ein Zielmolekül (bait) zu identifizieren. *Pulldown-Assays* basieren darauf, dass die Affinität des *bait*-Moleküls zu einer Matrix ausgenutzt

wird. Hierzu wird das *bait*-Molekül meist mittels der Generierung eines Fusionsproteins mit einem Protein-Tag versehen und über diesen an eine geeignete Matrix gebunden. Nach Zugabe möglicher Interaktionspartner bleiben die Interaktionspartner an das *bait*-Molekül und damit an die Matrix gebunden und können anschließend analysiert werden.

Diese Methode wird mit einem *PCLO*-Wildtyp und einem mutanten *PCLO*, welcher durch Mutagenese die gefundene Variante des Patienten 65110 enthält, durchgeführt. Die funktionellen Analysen, die auf den Ergebnissen dieser Arbeit basieren, wurden aufgrund begrenzter Zeit in dieser Doktorarbeit nicht behandelt.

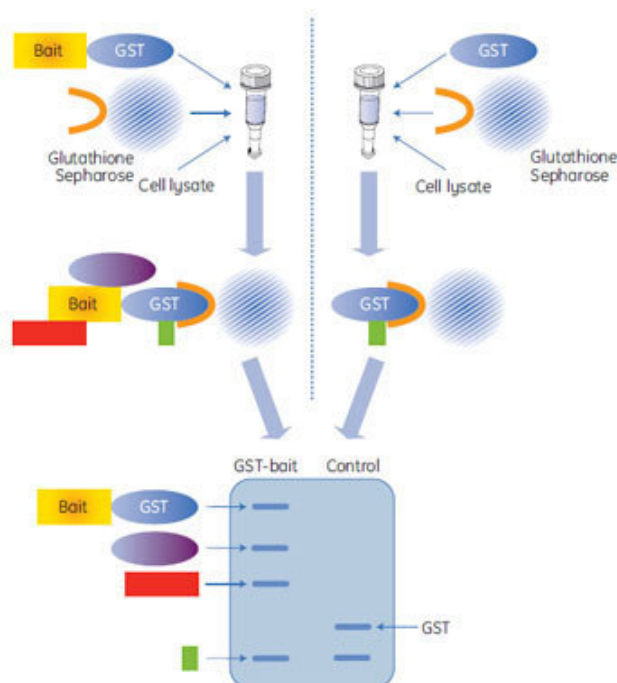


Abbildung 13: Darstellung eines *Pulldown*-Assays mit GST (Glutathion-S-Transferase) als Protein-Taq: Glutathion-S-Transferase bindet als Protein-Taq an das *bait*-Molekül. Bindung möglicher Interaktionspartner an das *bait*-Molekül. Nach Waschen und Eluierung, Detektion gebundener Interaktionspartner anhand Gelelektrophorese (Healthcare, 2013).

### 5.3 Ausblick

#### 5.3.1 Identifizierung von MR-Genen anhand Homozygotie-Kartierung

Identifizierung von MR-Genen anhand Homozygotie-Kartierung, Auswahl von Kandidatengenen und Sequenzierung in Kandidatenfamilien ist ein Ansatz, der in der Vergangenheit schon in einigen Fällen zu Erfolg führte, doch groß angelegte Sequenzierungen, wie *next generation sequencing* (NGS), sind neue erfolgversprechende Methoden, Kandidatengene für Mentale Retardierung zu identifizieren. So erlaubt die Kombination von Kopplungsanalysen und NGS neben dem Aufdecken von neuen homozygoten Varianten auch das Aufdecken von autosomal dominanten de-novo-Mutationen durch direkten Vergleich des Betroffenen mit seinen Eltern. Des Weiteren ist NGS auch in der Lage, compound-heterozygote Mutation zu detektieren und im Vergleich zum Verfahren nach Sanger kann mit höherer Effizienz und mit geringeren Kosten sequenziert werden. Dadurch können Funktionen der beteiligten Gene und deren Einfluss in die Signalwege aufgeklärt werden, was für die Erforschung der Ursachen von Mentaler Retardierung unabdingbar ist (Ropers, 2010).

#### 5.3.2 Verifikation von *PCLO*: c.12137A>G

Aufgrund der bisherigen Analyse ist die gefundene Variante des Gens *PCLO* bei Patient 65110 als potentiell Kandidatengen viel versprechend. Durch Kooperation mit anderen Instituten der Humangenetik werden hoffentlich zusätzliche Patienten mit weiteren *PCLO*-Varianten identifiziert. Verschiedene parallel laufende funktionelle Analysen wie die Forschung mit Zelllinien und ein *Pulldown-Assay*, sollen die Veränderung der Proteineigenschaften durch den Aminosäureaustausch ermittelt werden. Durch Identifizierung von weiteren *PCLO*-Mutationen in Patienten mit Mentaler Retardierung, könnte *PCLO* als neues Gen für autosomal rezessive Mentale Retardierung bestätigt werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- 1) Abbasi-Moheb, L., Mertel, S., Gonsior, M., Nouri-Vahid, L., Kahrizi, K., Cirak, S., Wieczorek, D., Motazacker, M.M., Esmaeeli-Nieh, S., Cremer, K., Weissmann, R., Tzschach, A., Garshasbi, M., Abedini, S.S., Najmabadi, H., Ropers, H.H., Sigrist, S.J., und Kuss, A.W. (2012). Mutations in NSUN2 cause autosomal-recessive intellectual disability. *American journal of human genetics* 90, 847-855.
- 2) Abou Jamra, R., Philippe, O., Raas-Rothschild, A., Eck, S.H., Graf, E., Buchert, R., Borck, G., Ekici, A., Brockschmidt, F.F., Nothen, M.M., Munnich, A., Strom, T.M., Reis, A., und Colleaux, L. (2011a). Adaptor protein complex 4 deficiency causes severe autosomal-recessive intellectual disability, progressive spastic paraplegia, shy character, and short stature. *American journal of human genetics* 88, 788-795.
- 3) Abou Jamra, R., Wohlfart, S., Zweier, M., Uebe, S., Priebe, L., Ekici, A., Giesebrecht, S., Abboud, A., Al Khateeb, M.A., Fakher, M., Hamdan, S., Ismael, A., Muhammad, S., Nothen, M.M., Schumacher, J., und Reis, A. (2011b). Homozygosity mapping in 64 Syrian consanguineous families with non-specific intellectual disability reveals 11 novel loci and high heterogeneity. *European journal of human genetics : EJHG* 19, 1161-1166.
- 4) al-Ansari, A. (1993). Etiology of mild mental retardation among Bahraini children: a community-based case control study. *Mental retardation* 31, 140-143.
- 5) Bartley, J.A., und Hall, B.D. (1978). Mental retardation and multiple congenital anomalies of unknown etiology: frequency of occurrence in similarly affected sibs of the proband. *Birth defects original article series* 14, 127-137.
- 6) Beckman Coulter, I. (2000-2013). Agencourt Ampure.
- 7) Bittles, A. (2001). Consanguinity and its relevance to clinical genetics. *Clinical genetics* 60, 89-98.
- 8) Bittles, A.H. (2008). A community genetics perspective on consanguineous marriage. *Community genetics* 11, 324-330.
- 9) Brockschneider, D., Sabanay, H., Riethmacher, D., und Peles, E. (2006). Ermin, a myelinating oligodendrocyte-specific protein that regulates cell morphology. *Journal of Neuroscience* 26, 757-762.
- 10) Caliskan, M., Chong, J.X., Uricchio, L., Anderson, R., Chen, P., Sougnez, C., Garimella, K., Gabriel, S.B., dePristo, M.A., Shakir, K., Matern, D., Das, S., Waggoner, D., Nicolae, D.L., und Ober, C. (2011). Exome sequencing reveals a novel mutation for autosomal recessive non-syndromic mental retardation in the *TECR* gene on chromosome 19p13. *Human molecular genetics* 20, 1285-1289.

- 11) Carpenter, N.J. (2001). Molecular cytogenetics. *Seminars in pediatric neurology* 8, 135-146.
- 12) Chelly, J., Khelifaoui, M., Francis, F., Cherif, B., und Bienvenu, T. (2006). Genetics and pathophysiology of mental retardation. *European journal of human genetics : EJHG* 14, 701-713.
- 13) Chen, Y.H., Tsai, M.T., Shaw, C.K., und Chen, C.H. (2001). Mutation analysis of the human NR4A2 gene, an essential gene for midbrain dopaminergic neurogenesis, in schizophrenic patients. *American journal of medical genetics* 105, 753-757.
- 14) Choi, K.H., Higgs, B.W., Wendland, J.R., Song, J., McMahon, F.J., und Webster, M.J. (2011). Gene expression and genetic variation data implicate PCLO in bipolar disorder. *Biological psychiatry* 69, 353-359.
- 15) Cobos, I., Broccoli, V., und Rubenstein, J.L. (2005a). The vertebrate ortholog of *Aristaless* is regulated by *Dlx* genes in the developing forebrain. *The Journal of comparative neurology* 483, 292-303.
- 16) Cobos, I., Calcagnotto, M.E., Vilaythong, A.J., Thwin, M.T., Noebels, J.L., Baraban, S.C., und Rubenstein, J.L. (2005b). Mice lacking *Dlx1* show subtype-specific loss of interneurons, reduced inhibition and epilepsy. *Nature neuroscience* 8, 1059-1068.
- 17) Cukier, H.N., Salyakina, D., Blankstein, S.F., Robinson, J.L., Sacharow, S., Ma, D., Wright, H.H., Abramson, R.K., Menon, R., Williams, S.M., Haines, J.L., Cuccaro, M.L., Gilbert, J.R., und Pericak-Vance, M.A. (2011). Microduplications in an autism multiplex family narrow the region of susceptibility for developmental disorders on 15q24 and implicate 7p21. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 156B, 493-501.
- 18) D'Arcangelo, G., und Curran, T. (1998). *Reeler*: new tales on an old mutant mouse. *Bioessays* 20, 235-244.
- 19) DeLisi, L.E., Mesen, A., Rodriguez, C., Bertheau, A., LaPrade, B., Llach, M., Riondet, S., Razi, K., Relja, M., Byerley, W., und Sherrington, R. (2002). Genome-wide scan for linkage to schizophrenia in a Spanish-origin cohort from Costa Rica. *American journal of medical genetics* 114, 497-508.
- 20) Drews, C.D., Yeargin-Allsopp, M., Decoufle, P., und Murphy, C.C. (1995). Variation in the influence of selected sociodemographic risk factors for mental retardation. *Am J Public Health* 85, 329-334.
- 21) Durkin, M.S., Hasan, Z.M., und Hasan, K.Z. (1998). Prevalence and correlates of mental retardation among children in Karachi, Pakistan. *American journal of epidemiology* 147, 281-288.

- 22) Fenster, S.D., und Garner, C.C. (2002). Gene structure and genetic localization of the PCLO gene encoding the presynaptic active zone protein Piccolo. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 20, 161-171.
- 23) Fukuoka, S., Ishiguro, K., Tanabe, A., Egashira, Y., Sanada, H., Fukuwatari, T., und Shibata, K. (2003). Identification and expression of alpha cDNA encoding human 2-amino-3-carboxymuconate-6-semialdehyde decarboxylase (ACMSD): a key enzyme for the tryptophan-niacine pathway and quinolinate hypothesis. *Advances in experimental medicine and biology* 527, 443-453.
- 24) Garavaglia, S., Perozzi, S., Galeazzi, L., Raffaelli, N., und Rizzi, M. (2009). The crystal structure of human alpha-amino-beta-carboxymuconate-epsilon-semialdehyde decarboxylase in complex with 1,3-dihydroxyacetonephosphate suggests a regulatory link between NAD synthesis and glycolysis. *The FEBS journal* 276, 6615-6623.
- 25) Garshasbi, M., Hadavi, V., Habibi, H., Kahrizi, K., Kariminejad, R., Behjati, F., Tzschach, A., Najmabadi, H., Ropers, H.H., und Kuss, A.W. (2008). A defect in the TUSC3 gene is associated with autosomal recessive mental retardation. *American journal of human genetics* 82, 1158-1164.
- 26) Garshasbi, M., Motazacker, M.M., Kahrizi, K., Behjati, F., Abedini, S.S., Nieh, S.E., Firouzabadi, S.G., Becker, C., Ruschendorf, F., Nurnberg, P., Tzschach, A., Vazifehmand, R., Erdogan, F., Ullmann, R., Lenzner, S., Kuss, A.W., Ropers, H.H., und Najmabadi, H. (2006). SNP array-based homozygosity mapping reveals MCPH1 deletion in family with autosomal recessive mental retardation and mild microcephaly. *Human genetics* 118, 708-715.
- 27) Granot-HersHKovitz, E., Raas-Rothschild, A., Frumkin, A., Granot, D., Silverstein, S., und Abeliovich, D. (2011). Complex chromosomal rearrangement in a girl with psychomotor-retardation and a de novo inversion: inv(2)(p15;q24.2). *American journal of medical genetics Part A* 155A, 1825-1832.
- 28) Gundelfinger, E.D., und Fejtova, A. (2012). Molecular organization and plasticity of the cytomatrix at the active zone. *Curr Opin Neurobiol* 22, 423-430.
- 29) Gurnett, C.A., Veile, R., Zempel, J., Blackburn, L., Lovett, M., und Bowcock, A. (2008). Disruption of sodium bicarbonate transporter SLC4A10 in a patient with complex partial epilepsy and mental retardation. *Archives of neurology* 65, 550-553.
- 30) Hamdan, F.F., Gauthier, J., Araki, Y., Lin, D.T., Yoshizawa, Y., Higashi, K., Park, A.R., Spiegelman, D., Dobrzeniecka, S., Piton, A., Tomitori, H., Daoud, H., Massicotte, C., Henrion, E., Diallo, O., Shekarabi, M., Marineau, C., Shevell, M., Maranda, B., Mitchell, G., Nadeau, A., D'Anjou, G., Vanasse, M., Srour, M., Lafreniere, R.G., Drapeau, P., Lacaille, J.C., Kim, E., Lee, J.R., Igarashi, K., Haganir, R.L., Rouleau, G.A., und Michaud, J.L.

(2011). Excess of de novo deleterious mutations in genes associated with glutamatergic systems in nonsyndromic intellectual disability. *American journal of human genetics* 88, 306-316.

31) Hamdan, F.F., Gauthier, J., Spiegelman, D., Noreau, A., Yang, Y., Pellerin, S., Dobrzeniecka, S., Cote, M., Perreau-Linck, E., Carmant, L., D'Anjou, G., Fombonne, E., Addington, A.M., Rapoport, J.L., Delisi, L.E., Krebs, M.O., Mouaffak, F., Joob, R., Mottron, L., Drapeau, P., Marineau, C., Lafreniere, R.G., Lacaille, J.C., Rouleau, G.A., und Michaud, J.L. (2009). Mutations in SYNGAP1 in autosomal nonsyndromic mental retardation. *The New England journal of medicine* 360, 599-605.

32) Han, S., Nam, J., Li, Y., Kim, S., Cho, S.H., Cho, Y.S., Choi, S.Y., Choi, J., Han, K., Kim, Y., Na, M., Kim, H., Bae, Y.C., und Kim, E. (2010). Regulation of dendritic spines, spatial memory, and embryonic development by the TANC family of PSD-95-interacting proteins. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 15102-15112.

33) Higgins, J.J., Pucilowska, J., Lombardi, R.Q., und Rooney, J.P. (2004). A mutation in a novel ATP-dependent Lon protease gene in a kindred with mild mental retardation. *Neurology* 63, 1927-1931.

34) Hildebrandt, F., Heeringa, S.F., Ruschendorf, F., Attanasio, M., Nurnberg, G., Becker, C., Seelow, D., Huebner, N., Chernin, G., Vlangos, C.N., Zhou, W., O'Toole, J.F., Hoskins, B.E., Wolf, M.T., Hinkes, B.G., Chaib, H., Ashraf, S., Schoeb, D.S., Ovunc, B., Allen, S.J., Vega-Warner, V., Wise, E., Harville, H.M., Lyons, R.H., Washburn, J., Macdonald, J., Nurnberg, P., und Otto, E.A. (2009). A systematic approach to mapping recessive disease genes in individuals from outbred populations. *PLoS genetics* 5, e1000353.

35) Hussain, R., und Bittles, A.H. (2000). Sociodemographic correlates of consanguineous marriage in the Muslim population of India. *Journal of biosocial science* 32, 433-442.

36) Ibi, D., Nitta, A., Ishige, K., Cen, X., Ohtakara, T., Nabeshima, T., und Ito, Y. (2010). Piccolo knockdown-induced impairments of spatial learning and long-term potentiation in the hippocampal CA1 region. *Neurochemistry international* 56, 77-83.

37) Iijima, T., Imai, T., Kimura, Y., Bernstein, A., Okano, H.J., Yuzaki, M., und Okano, H. (2005). Hzf protein regulates dendritic localization and BDNF-induced translation of type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 17190-17195.

38) Iijima, T., Ogura, H., Takatsuki, K., Kawahara, S., Wakabayashi, K., Nakayama, D., Fujioka, M., Kimura, Y., Bernstein, A., Okano, H.J., Kirino, Y., und Okano, H. (2007). Impaired motor functions in mice lacking the RNA-binding protein Hzf. *Neuroscience research* 58, 183-189.

- 39) Jamison, J.W. (1965). The impact of mental retardation on the family and some directions of help. *Journal of the National Medical Association* 57, 136-138.
- 40) Jordan, B.A., Fernholz, B.D., Boussac, M., Xu, C., Grigorean, G., Ziff, E.B., und Neubert, T.A. (2004). Identification and verification of novel rodent postsynaptic density proteins. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 3, 857-871.
- 41) Kahler, S.G., und Fahey, M.C. (2003). Metabolic disorders and mental retardation. *American journal of medical genetics Part C, Seminars in medical genetics* 117C, 31-41.
- 42) Kang, H., und Schuman, E.M. (1996). A requirement for local protein synthesis in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity. *Science* 273, 1402-1406.
- 43) Kirin, M., McQuillan, R., Franklin, C.S., Campbell, H., McKeigue, P.M., und Wilson, J.F. (2010). Genomic runs of homozygosity record population history and consanguinity. *PLoS One* 5, e13996.
- 44) Kleefstra, T., und Hamel, B.C. (2005). X-linked mental retardation: further lumping, splitting and emerging phenotypes. *Clin Genet* 67, 451-467.
- 45) Koekkoek, S.K., Yamaguchi, K., Milojkovic, B.A., Dortland, B.R., Ruigrok, T.J., Maex, R., De Graaf, W., Smit, A.E., VanderWerf, F., Bakker, C.E., Willemsen, R., Ikeda, T., Kakizawa, S., Onodera, K., Nelson, D.L., Mientjes, E., Joosten, M., De Schutter, E., Oostra, B.A., Ito, M., und De Zeeuw, C.I. (2005). Deletion of FMR1 in Purkinje cells enhances parallel fiber LTD, enlarges spines, and attenuates cerebellar eyelid conditioning in Fragile X syndrome. *Neuron* 47, 339-352.
- 46) Kolehmainen, J., Black, G.C., Saarinen, A., Chandler, K., Clayton-Smith, J., Traskelin, A.L., Perveen, R., Kivitie-Kallio, S., Norio, R., Warburg, M., Fryns, J.P., de la Chapelle, A., und Lehesjoki, A.E. (2003). Cohen syndrome is caused by mutations in a novel gene, COH1, encoding a transmembrane protein with a presumed role in vesicle-mediated sorting and intracellular protein transport. *American journal of human genetics* 72, 1359-1369.
- 47) Kooy, R.F. (2003). Of mice and the fragile X syndrome. *Trends in genetics : TIG* 19, 148-154.
- 48) Kuss, A.W., Garshasbi, M., Kahrizi, K., Tzschach, A., Behjati, F., Darvish, H., Abbasi-Moheb, L., Puettmann, L., Zecha, A., Weissmann, R., Hu, H., Mohseni, M., Abedini, S.S., Rajab, A., Hertzberg, C., Wieczorek, D., Ullmann, R., Ghasemi-Firouzabadi, S., Banihashemi, S., Arzhang, S., Hadavi, V., Bahrami-Monajemi, G., Kasiri, M., Falah, M., Nikuei, P., Dehghan, A., Sobhani, M., Jamali, P., Ropers, H.H., und Najmabadi, H. (2010). Autosomal recessive mental retardation: homozygosity mapping identifies 27 single linkage intervals, at least 14 novel loci and several mutation hotspots. *Hum Genet*.
- 49) Kuss, A.W., Garshasbi, M., Kahrizi, K., Tzschach, A., Behjati, F., Darvish, H., Abbasi-Moheb, L., Puettmann, L., Zecha, A., Weissmann, R., Hu, H., Mohseni, M., Abedini, S.S.,

Rajab, A., Hertzberg, C., Wieczorek, D., Ullmann, R., Ghasemi-Firouzabadi, S., Banihashemi, S., Arzhangi, S., Hadavi, V., Bahrami-Monajemi, G., Kasiri, M., Falah, M., Nikuei, P., Dehghan, A., Sobhani, M., Jamali, P., Ropers, H.H., und Najmabadi, H. (2011). Autosomal recessive mental retardation: homozygosity mapping identifies 27 single linkage intervals, at least 14 novel loci and several mutation hotspots. *Human genetics* 129, 141-148.

50) Le, W.D., Xu, P., Jankovic, J., Jiang, H., Appel, S.H., Smith, R.G., und Vassilatis, D.K. (2003). Mutations in NR4A2 associated with familial Parkinson disease. *Nature genetics* 33, 85-89.

51) Lenhard, W., Breitenbach, E., Ebert, H., Schindelhauer-Deutscher, H.J., und Henn, W. (2005). Psychological benefit of diagnostic certainty for mothers of children with disabilities: lessons from Down syndrome. *American journal of medical genetics Part A* 133A, 170-175.

52) Leonard, H., und Wen, X. (2002). The epidemiology of mental retardation: challenges and opportunities in the new millennium. *Mental retardation and developmental disabilities research reviews* 8, 117-134.

53) Lewis, C.M., Levinson, D.F., Wise, L.H., DeLisi, L.E., Straub, R.E., Hovatta, I., Williams, N.M., Schwab, S.G., Pulver, A.E., Faraone, S.V., Brzustowicz, L.M., Kaufmann, C.A., Garver, D.L., Gurling, H.M., Lindholm, E., Coon, H., Moises, H.W., Byerley, W., Shaw, S.H., Mesen, A., Sherrington, R., O'Neill, F.A., Walsh, D., Kendler, K.S., Ekelund, J., Paunio, T., Lonnqvist, J., Peltonen, L., O'Donovan, M.C., Owen, M.J., Wildenauer, D.B., Maier, W., Nestadt, G., Blouin, J.L., Antonarakis, S.E., Mowry, B.J., Silverman, J.M., Crowe, R.R., Cloninger, C.R., Tsuang, M.T., Malaspina, D., Harkavy-Friedman, J.M., Svrakic, D.M., Bassett, A.S., Holcomb, J., Kalsi, G., McQuillin, A., Brynjolfson, J., Sigmundsson, T., Petursson, H., Jazin, E., Zoega, T., und Helgason, T. (2003). Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part II: Schizophrenia. *American journal of human genetics* 73, 34-48.

54) Liang, J., Yin, C., Doong, H., Fang, S., Peterhoff, C., Nixon, R.A., und Monteiro, M.J. (2006). Characterization of erasin (UBXD2): a new ER protein that promotes ER-associated protein degradation. *Journal of cell science* 119, 4011-4024.

55) Lu, M., Grove, E.A., und Miller, R.J. (2002). Abnormal development of the hippocampal dentate gyrus in mice lacking the CXCR4 chemokine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 7090-7095.

56) Lucarini, L., Giusti, B., Zhang, R.Z., Pan, T.C., Jimenez-Mallebrera, C., Mercuri, E., Muntoni, F., Pepe, G., und Chu, M.L. (2005). A homozygous COL6A2 intron mutation causes in-frame triple-helical deletion and nonsense-mediated mRNA decay in a patient with Ullrich congenital muscular dystrophy. *Hum Genet* 117, 460-466.

- 57) Lybaek, H., Orstavik, K.H., Prescott, T., Hovland, R., Breilid, H., Stansberg, C., Steen, V.M., und Houge, G. (2009). An 8.9 Mb 19p13 duplication associated with precocious puberty and a sporadic 3.9 Mb 2q23.3q24.1 deletion containing NR4A2 in mentally retarded members of a family with an intrachromosomal 19p-into-19q between-arm insertion. *European journal of human genetics : EJHG* 17, 904-910.
- 58) Mandel, J.L., und Chelly, J. (2004). Monogenic X-linked mental retardation: is it as frequent as currently estimated? The paradox of the ARX (Aristaless X) mutations. *Eur J Hum Genet* 12, 689-693.
- 59) McKenna, W.L., Betancourt, J., Larkin, K.A., Abrams, B., Guo, C., Rubenstein, J.L., und Chen, B. (2011). Tbr1 and Fezf2 regulate alternate corticofugal neuronal identities during neocortical development. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 549-564.
- 60) McLaren, J., und Bryson, S.E. (1987). Review of recent epidemiological studies of mental retardation: prevalence, associated disorders, and etiology. *American journal of mental retardation : AJMR* 92, 243-254.
- 61) McLaren, W., Pritchard, B., Rios, D., Chen, Y., Flicek, P., und Cunningham, F. (2010). Deriving the consequences of genomic variants with the Ensembl API and SNP Effect Predictor. *Bioinformatics* 26, 2069-2070.
- 62) Mir, A., Kaufman, L., Noor, A., Motazacker, M.M., Jamil, T., Azam, M., Kahrizi, K., Rafiq, M.A., Weksberg, R., Nasr, T., Naeem, F., Tzschach, A., Kuss, A.W., Ishak, G.E., Doherty, D., Ropers, H.H., Barkovich, A.J., Najmabadi, H., Ayub, M., und Vincent, J.B. (2009). Identification of mutations in TRAPPC9, which encodes the NIK- and IKK-beta-binding protein, in nonsyndromic autosomal-recessive mental retardation. *American journal of human genetics* 85, 909-915.
- 63) Missler, M., Hammer, R.E., und Sudhof, T.C. (1998). Neurexophilin binding to alpha-neurexins. A single LNS domain functions as an independently folding ligand-binding unit. *The Journal of biological chemistry* 273, 34716-34723.
- 64) Mochida, G.H., Mahajnah, M., Hill, A.D., Basel-Vanagaite, L., Gleason, D., Hill, R.S., Bodell, A., Crosier, M., Straussberg, R., und Walsh, C.A. (2009). A truncating mutation of TRAPPC9 is associated with autosomal-recessive intellectual disability and postnatal microcephaly. *American journal of human genetics* 85, 897-902.
- 65) Modell, B., und Darr, A. (2002). Science and society: genetic counselling and customary consanguineous marriage. *Nature reviews Genetics* 3, 225-229.
- 66) Molinari, F., Foulquier, F., Tarpey, P.S., Morelle, W., Boissel, S., Teague, J., Edkins, S., Futreal, P.A., Stratton, M.R., Turner, G., Matthijs, G., Gecz, J., Munnich, A., und Colleaux, L. (2008). Oligosaccharyltransferase-subunit mutations in nonsyndromic mental retardation. *American journal of human genetics* 82, 1150-1157.

- 67) Molinari, F., Rio, M., Meskenaitė, V., Encha-Razavi, F., Auge, J., Bacq, D., Briault, S., Vekemans, M., Munnich, A., Attie-Bitach, T., Sonderegger, P., und Colleaux, L. (2002). Truncating neurotrypsin mutation in autosomal recessive nonsyndromic mental retardation. *Science* 298, 1779-1781.
- 68) Morozov, A., Muzzio, I.A., Bourtchouladze, R., Van-Strien, N., Lapidus, K., Yin, D., Winder, D.G., Adams, J.P., Sweatt, J.D., und Kandel, E.R. (2003). Rap1 couples cAMP signaling to a distinct pool of p42/44MAPK regulating excitability, synaptic plasticity, learning, and memory. *Neuron* 39, 309-325.
- 69) Morral, N., Bertranpetit, J., Estivill, X., Nunes, V., Casals, T., Gimenez, J., Reis, A., Varon-Mateeva, R., Macek, M., Jr., Kalaydjieva, L., und et al. (1994). The origin of the major cystic fibrosis mutation (delta F508) in European populations. *Nat Genet* 7, 169-175.
- 70) Motazacker, M.M., Rost, B.R., Hucho, T., Garshasbi, M., Kahrizi, K., Ullmann, R., Abedini, S.S., Nieh, S.E., Amini, S.H., Goswami, C., Tzschach, A., Jensen, L.R., Schmitz, D., Ropers, H.H., Najmabadi, H., und Kuss, A.W. (2007). A defect in the ionotropic glutamate receptor 6 gene (GRIK2) is associated with autosomal recessive mental retardation. *American journal of human genetics* 81, 792-798.
- 71) Najm, J., Horn, D., Wimplinger, I., Golden, J.A., Chizhikov, V.V., Sudi, J., Christian, S.L., Ullmann, R., Kuechler, A., Haas, C.A., Flubacher, A., Charnas, L.R., Uyanik, G., Frank, U., Klopocki, E., Dobyns, W.B., und Kutsche, K. (2008). Mutations of CASK cause an X-linked brain malformation phenotype with microcephaly and hypoplasia of the brainstem and cerebellum. *Nature genetics* 40, 1065-1067.
- 72) Najmabadi, H., Hu, H., Garshasbi, M., Zemojtel, T., Abedini, S.S., Chen, W., Hosseini, M., Behjati, F., Haas, S., Jamali, P., Zecha, A., Mohseni, M., Puttmann, L., Vahid, L.N., Jensen, C., Moheb, L.A., Bienek, M., Larti, F., Mueller, I., Weissmann, R., Darvish, H., Wrogemann, K., Hadavi, V., Lipkowitz, B., Esmaeeli-Nieh, S., Wieczorek, D., Kariminejad, R., Firouzabadi, S.G., Cohen, M., Fattahi, Z., Rost, I., Mojahedi, F., Hertzberg, C., Dehghan, A., Rajab, A., Banavandi, M.J., Hoffer, J., Falah, M., Musante, L., Kalscheuer, V., Ullmann, R., Kuss, A.W., Tzschach, A., Kahrizi, K., und Ropers, H.H. (2011). Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. *Nature* 478, 57-63.
- 73) Najmabadi, H., Motazacker, M.M., Garshasbi, M., Kahrizi, K., Tzschach, A., Chen, W., Behjati, F., Hadavi, V., Nieh, S.E., Abedini, S.S., Vazifehmand, R., Firouzabadi, S.G., Jamali, P., Falah, M., Seifati, S.M., Gruters, A., Lenzner, S., Jensen, L.R., Ruschendorf, F., Kuss, A.W., und Ropers, H.H. (2007). Homozygosity mapping in consanguineous families reveals extreme heterogeneity of non-syndromic autosomal recessive mental retardation and identifies 8 novel gene loci. *Human genetics* 121, 43-48.
- 74) Newey, S.E., Velamoor, V., Govek, E.E., und Van Aelst, L. (2005). Rho GTPases, dendritic structure, and mental retardation. *Journal of neurobiology* 64, 58-74.

- 75) Ng, P.C., und Henikoff, S. (2003). SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic acids research* 31, 3812-3814.
- 76) Niccols, A. (2007). Fetal alcohol syndrome and the developing socio-emotional brain. *Brain and cognition* 65, 135-142.
- 77) Nolan, D.K., Chen, P., Das, S., Ober, C., und Waggoner, D. (2008). Fine mapping of a locus for nonsyndromic mental retardation on chromosome 19p13. *Am J Med Genet A* 146A, 1414-1422.
- 78) Park, C.H., Kang, J.S., Shin, Y.H., Chang, M.Y., Chung, S., Koh, H.C., Zhu, M.H., Oh, S.B., Lee, Y.S., Panagiotakos, G., Tabar, V., Studer, L., und Lee, S.H. (2006). Acquisition of in vitro and in vivo functionality of Nurr1-induced dopamine neurons. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20, 2553-2555.
- 79) Penzes, P., Woolfrey, K.M., und Srivastava, D.P. (2011). Epac2-mediated dendritic spine remodeling: implications for disease. *Molecular and cellular neurosciences* 46, 368-380.
- 80) Perlmann, T., und Wallen-Mackenzie, A. (2004). Nurr1, an orphan nuclear receptor with essential functions in developing dopamine cells. *Cell and tissue research* 318, 45-52.
- 81) Pham-Dinh, D., Mattei, M.G., Nussbaum, J.L., Roussel, G., Pontarotti, P., Roeckel, N., Mather, I.H., Artzt, K., Lindahl, K.F., und Dautigny, A. (1993). Myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a member of a subset of the immunoglobulin superfamily encoded within the major histocompatibility complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 7990-7994.
- 82) Philippe, O., Rio, M., Carioux, A., Plaza, J.M., Guigue, P., Molinari, F., Boddaert, N., Bole-Feysot, C., Nitschke, P., Smahi, A., Munnich, A., und Colleaux, L. (2009). Combination of linkage mapping and microarray-expression analysis identifies NF-kappaB signaling defect as a cause of autosomal-recessive mental retardation. *American journal of human genetics* 85, 903-908.
- 83) Pinkel, D., Seagraves, R., Sudar, D., Clark, S., Poole, I., Kowbel, D., Collins, C., Kuo, W.L., Chen, C., Zhai, Y., Dairkee, S.H., Ljung, B.M., Gray, J.W., und Albertson, D.G. (1998). High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nature genetics* 20, 207-211.
- 84) Polder, J.J., Meerding, W.J., Bonneux, L., und van der Maas, P.J. (2002). Healthcare costs of intellectual disability in the Netherlands: a cost-of-illness perspective. *Journal of intellectual disability research : JIDR* 46, 168-178.
- 85) Priest, J.H., Thuline, H.C., Laveck, G.D., und Jarvis, D.B. (1961). An approach to genetic factors in mental retardation. *Studies of families containing at least two siblings*

admitted to a state institution for the retarded. *American journal of mental deficiency* 66, 42-50.

86) Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M.A., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P.I., Daly, M.J., und Sham, P.C. (2007). PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American journal of human genetics* 81, 559-575.

87) Pushkin, A., und Kurtz, I. (2006). SLC4 base ( $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ) transporters: classification, function, structure, genetic diseases, and knockout models. *American journal of physiology Renal physiology* 290, F580-599.

88) Rafiq, M.A., Ansar, M., Marshall, C.R., Noor, A., Shaheen, N., Mowjoodi, A., Khan, M.A., Ali, G., Amin-Ud-Din, M., Feuk, L., Vincent, J.B., und Scherer, S.W. (2010a). Mapping of three novel loci for non-syndromic autosomal recessive mental retardation (NS-ARMR) in consanguineous families from Pakistan. *Clin Genet*.

89) Rafiq, M.A., Ansar, M., Marshall, C.R., Noor, A., Shaheen, N., Mowjoodi, A., Khan, M.A., Ali, G., Amin-ud-Din, M., Feuk, L., Vincent, J.B., und Scherer, S.W. (2010b). Mapping of three novel loci for non-syndromic autosomal recessive mental retardation (NS-ARMR) in consanguineous families from Pakistan. *Clinical genetics* 78, 478-483.

90) Ramensky, V., Bork, P., und Sunyaev, S. (2002). Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic acids research* 30, 3894-3900.

91) Rauch, A. (2010). Genetik der mentalen Retardierung und Intelligenzminderung. *Pädiatrie*, 4.

92) Rauch, A., Hoyer, J., Guth, S., Zweier, C., Kraus, C., Becker, C., Zenker, M., Huffmeier, U., Thiel, C., Ruschendorf, F., Nurnberg, P., Reis, A., und Trautmann, U. (2006). Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *American journal of medical genetics Part A* 140, 2063-2074.

93) Rauch, A., Wieczorek, D., Graf, E., Wieland, T., Ende, S., Schwarzmayr, T., Albrecht, B., Bartholdi, D., Beygo, J., Di Donato, N., Dufke, A., Cremer, K., Hempel, M., Horn, D., Hoyer, J., Joset, P., Ropke, A., Moog, U., Riess, A., Thiel, C.T., Tzschach, A., Wiesener, A., Wohlleber, E., Zweier, C., Ekici, A.B., Zink, A.M., Rump, A., Meisinger, C., Grallert, H., Sticht, H., Schenck, A., Engels, H., Rappold, G., Schrock, E., Wieacker, P., Riess, O., Meitinger, T., Reis, A., und Strom, T.M. (2012). Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: an exome sequencing study. *Lancet* 380, 1674-1682.

94) Richmond, J.E., und Broadie, K.S. (2002). The synaptic vesicle cycle: exocytosis and endocytosis in *Drosophila* and *C. elegans*. *Curr Opin Neurobiol* 12, 499-507.

- 95) Rodrigues, R., Gabetta, C.S., Pedro, K.P., Valdetaro, F., Fernandes, M.I., Magalhaes, P.K., Januario, J.N., und Maciel, L.M. (2008). Cystic fibrosis and neonatal screening. *Cad Saude Publica* 24 Suppl 4, s475-484.
- 96) Roeleveld, N., Zielhuis, G.A., und Gabreels, F. (1997). The prevalence of mental retardation: a critical review of recent literature. *Dev Med Child Neurol* 39, 125-132.
- 97) Ropers, H.H. (2006). X-linked mental retardation: many genes for a complex disorder. *Current opinion in genetics & development* 16, 260-269.
- 98) Ropers, H.H. (2010). Genetics of early onset cognitive impairment. *Annual review of genomics and human genetics* 11, 161-187.
- 99) Ropers, H.H., und Hamel, B.C. (2005). X-linked mental retardation. *Nat Rev Genet* 6, 46-57.
- 100) Rossi, D., und Zlotnik, A. (2000). The biology of chemokines and their receptors. *Annual review of immunology* 18, 217-242.
- 101) Rozen, S., und Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132, 365-386.
- 102) Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., und Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- 103) Salvador-Carulla, L., und Bertelli, M. (2008). 'Mental retardation' or 'intellectual disability': time for a conceptual change. *Psychopathology* 41, 10-16.
- 104) Sanger, F., Nicklen, S., und Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 5463-5467.
- 105) Schmidt, S., Haase, C.G., Bezman, L., Moser, H., Schmidt, M., Kohler, W., Lington, C., und Klockgether, T. (2001). Serum autoantibody responses to myelin oligodendrocyte glycoprotein and myelin basic protein in X-linked adrenoleukodystrophy and multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* 119, 88-94.
- 106) Schuurs-Hoeijmakers, J.H., Hehir-Kwa, J.Y., Pfundt, R., van Bon, B.W., de Leeuw, N., Kleefstra, T., Willemsen, M.A., van Kessel, A.G., Brunner, H.G., Veltman, J.A., van Bokhoven, H., de Brouwer, A.P., und de Vries, B.B. (2011). Homozygosity mapping in outbred families with mental retardation. *European journal of human genetics : EJHG* 19, 597-601.
- 107) Seelow, D., Schuelke, M., Hildebrandt, F., und Nurnberg, P. (2009). HomozygosityMapper--an interactive approach to homozygosity mapping. *Nucleic Acids Res* 37, W593-599.

- 108) Smits, S.M., Ponnio, T., Conneely, O.M., Burbach, J.P., und Smidt, M.P. (2003). Involvement of Nurr1 in specifying the neurotransmitter identity of ventral midbrain dopaminergic neurons. *The European journal of neuroscience* 18, 1731-1738.
- 109) Solinas-Toldo, S., Lampel, S., Stilgenbauer, S., Nickolenko, J., Benner, A., Dohner, H., Cremer, T., und Lichter, P. (1997). Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes, chromosomes & cancer* 20, 399-407.
- 110) Strom, T. ExonPrimer (Helmholtz Center, Munich).
- 111) Stumm, R.K., Zhou, C., Ara, T., Lazarini, F., Dubois-Dalcq, M., Nagasawa, T., Holtt, V., und Schulz, S. (2003). CXCR4 regulates interneuron migration in the developing neocortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23, 5123-5130.
- 112) Suzuki, T., Li, W., Zhang, J.P., Tian, Q.B., Sakagami, H., Usuda, N., Kondo, H., Fujii, T., und Endo, S. (2005). A novel scaffold protein, TANC, possibly a rat homolog of *Drosophila* rolling pebbles (rols), forms a multiprotein complex with various postsynaptic density proteins. *The European journal of neuroscience* 21, 339-350.
- 113) Tadmouri, G.O., Nair, P., Obeid, T., Al Ali, M.T., Al Khaja, N., und Hamamy, H.A. (2009). Consanguinity and reproductive health among Arabs. *Reproductive health* 6, 17.
- 114) Toyo-oka, K., Shionoya, A., Gambello, M.J., Cardoso, C., Leventer, R., Ward, H.L., Ayala, R., Tsai, L.H., Dobyns, W., Ledbetter, D., Hirotsume, S., und Wynshaw-Boris, A. (2003). 14-3-3epsilon is important for neuronal migration by binding to NUDEL: a molecular explanation for Miller-Dieker syndrome. *Nature genetics* 34, 274-285.
- 115) Tzschach, A., und Ropers, H.-H. (2007). Genetik der mentalen Retardierung. *Dtsch Arztebl* 104, 1400-.
- 116) Uyguner, O., Kayserili, H., Li, Y., Karaman, B., Nurnberg, G., Hennies, H., Becker, C., Nurnberg, P., Basaran, S., Apak, M.Y., und Wollnik, B. (2007). A new locus for autosomal recessive non-syndromic mental retardation maps to 1p21.1-p13.3. *Clin Genet* 71, 212-219.
- 117) Vermeer, S., Koolen, D.A., Visser, G., Braekel, H.J.L., van der Burgt, I., de Leeuw, N., Willemsen, M.A.A.P., Sistermans, E.A., Pfundt, R., und de Vries, B.B.A. (2007). A novel microdeletion in 1(p34.2p34.3), involving the SLC2A1 (GLUT1) gene, and severe delayed development. *Dev Med Child Neurol* 49, 380-384.
- 118) Vissers, L.E., de Ligt, J., Gilissen, C., Janssen, I., Steehouwer, M., de Vries, P., van Lier, B., Arts, P., Wieskamp, N., del Rosario, M., van Bon, B.W., Hoischen, A., de Vries,

B.B., Brunner, H.G., und Veltman, J.A. (2010). A de novo paradigm for mental retardation. *Nature genetics* 42, 1109-1112.

119) Waites, C.L., Leal-Ortiz, S.A., Andlauer, T.F., Sigrist, S.J., und Garner, C.C. (2011). Piccolo regulates the dynamic assembly of presynaptic F-actin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 14250-14263.

120) Wallen, A.A., Castro, D.S., Zetterstrom, R.H., Karlen, M., Olson, L., Ericson, J., und Perlmann, T. (2001). Orphan nuclear receptor Nurr1 is essential for Ret expression in midbrain dopamine neurons and in the brain stem. *Molecular and cellular neurosciences* 18, 649-663.

121) Wang, T., Jia, L., Lv, B., Liu, B., Wang, W., Wang, F., Yang, G., Bu, X., Yao, L., und Zhang, B. (2011). Human Ermin (hErmin), a new oligodendrocyte-specific cytoskeletal protein related to epileptic seizure. *Brain research* 1367, 77-84.

122) Wang, Z.W. (2008). Regulation of synaptic transmission by presynaptic CaMKII and BK channels. *Molecular neurobiology* 38, 153-166.

123) Woolfrey, K.M., Srivastava, D.P., Photowala, H., Yamashita, M., Barbolina, M.V., Cahill, M.E., Xie, Z., Jones, K.A., Quilliam, L.A., Prakriya, M., und Penzes, P. (2009). Epac2 induces synapse remodeling and depression and its disease-associated forms alter spines. *Nature neuroscience* 12, 1275-1284.

124) Wright, S.W., Tarjan, G., und Eyer, L. (1959). Investigation of families with two or more mentally defective siblings; clinical observations. *AMA journal of diseases of children* 97, 445-463.

125) Yaqoob, M., Bashir, A., Tareen, K., Gustavson, K.H., Nazir, R., Jalil, F., von Döbeln, U., und Ferngren, H. (1995). Severe mental retardation in 2 to 24-month-old children in Lahore, Pakistan: a prospective cohort study. *Acta Paediatr* 84, 267-272.

126) Young, K.G., und Copeland, J.W. (2010). Formins in cell signaling. *Biochimica et biophysica acta* 1803, 183-190.

127) Zimprich, A. (2011). Genetics of Parkinson's disease and essential tremor. *Current opinion in neurology* 24, 318-323.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

|                  |                                                         |
|------------------|---------------------------------------------------------|
| ° C              | Grad Celsius                                            |
| µg               | Mikrogramm                                              |
| µl               | Mikroliter                                              |
| A                | Adenin                                                  |
| ARID             | Autosomal recessive intellectual disability             |
| Array-CGH        | <i>Array comparative genomic hybridization</i>          |
| AS               | Aminosäure                                              |
| Bp               | Basenpaar                                               |
| C                | Cytosin                                                 |
| Chr              | Chromosom                                               |
| Cys (C)          | Cystein                                                 |
| ddNTP            | 2',3'-Didesoxynucleosid-5'-triphosphat                  |
| dNTP             | 2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat                       |
| DMSO             | Dimethylsulfoxid                                        |
| DANN             | Desoxyribonukleinsäure                                  |
| EDTA             | Ethylendiamintetraacetat                                |
| ER               | Endoplasmatisches Retikulum                             |
| FISH             | Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung                      |
| G                | Guanin                                                  |
| G                | Gramm                                                   |
| GST              | Glutathion-S-Transferase                                |
| H <sub>2</sub> O | Wasser                                                  |
| IBD              | <i>Identity by descent</i>                              |
| IBS              | <i>Identity by state</i>                                |
| IQ               | Intelligenzquotient                                     |
| LTD              | Lang-Zeit-Depression                                    |
| LTP              | Lang-Zeit-Potenzierung                                  |
| M                | Mol pro Liter                                           |
| Mb               | Megabasenpaare                                          |
| Mg               | Milligramm                                              |
| ml               | Milliliter                                              |
| MLPA             | <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i> |
| mRNA             | <i>messenger</i> Ribonukleinsäure                       |
| MR               | Mentale Retardierung                                    |
| MRNET            | <i>German Mental Retardation Network</i>                |
| NCBI             | <i>National Center for Biotechnology Information</i>    |
| NGS              | <i>next generation sequencing</i>                       |
| OMIM             | <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>              |
| PKU              | Phenylketonurie                                         |
| PolyPhen         | <i>Polymorphism Phenotyping</i>                         |
| RNA              | Ribonukleinsäure                                        |
| ROH              | <i>Runs of Homozygosity</i>                             |
| SH2              | <i>Src-homology 2</i>                                   |
| SNP              | <i>Single nucleotide polymorphism</i>                   |
| SIFT             | <i>Sorts Intolerant From Tolerant</i>                   |
| SV               | synaptische Vesikel                                     |
| T                | Thymin                                                  |

|         |                                      |
|---------|--------------------------------------|
| Taq     | Thermus aquaticus                    |
| TBE     | Tris-Borat-EDTA-Puffer               |
| Tyr (Y) | Tyrosin                              |
| UCSC    | University of California, Santa Cruz |
| ZNS     | Zentrales Nervensystem               |

#### **Internationale Abkürzungen der Nukleotide**

|   |         |
|---|---------|
| A | Adenin  |
| C | Cytosin |
| G | Guanin  |
| T | Thymin  |

#### **Internationale Abkürzungen der Aminosäuren**

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

## 8 Anhang

### 8.1 Verwendete Primer

| Exon-ID     | <i>forward</i>             | <i>reverse</i>             | Länge<br>(bp) |
|-------------|----------------------------|----------------------------|---------------|
| TBR1_Ex1_1  | TGCTGGTTGAAGTGCTTTCTG      | CATGTAGCGGCTAGGGCTG        | 549           |
| TBR1_Ex1_2  | CTGCAGATCGCTACCTCCTC       | ACCCCAAATCGTCGCTG          | 483           |
| TBR1_Ex2    | CCCCGCTTCTTGCAATTAATC      | CTCGAGCCAGTCCACAAAGG       | 316           |
| TBR1_Ex3    | TACGTGGTGAGGAGCTGGG        | TGCTGCTTTACACTGACGAAC      | 269           |
| TBR1_Ex4    | CGGTCAGTTAGCCTGGAAGG       | GATGTTAGCGCTGCTAGTACCC     | 398           |
| TBR1_Ex5    | GGCCTTAAGCCCCTGTAAAAG      | CAACCTTGTCTTCACACATTCC     | 272           |
| TBR1_Ex6_1  | GAAAAGTGGAGGTGGCCTTC       | AGCAGGGCAGCACCGAG          | 600           |
| TBR1_Ex6_2  | GGCCACGCTGCTCTCTTAC        | GTCAAATAAAATGAGTGGGTGC     | 636           |
| ERMN_Ex1    | CTGTGCTGCAAACTCTCATCAG     | TGACCTCTAGTCAGCACTCTAATTCT | 266           |
| ERMN_Ex2    | TTTGTGCTCTTAGAGTAGGAGTTGG  | GGGTGTCCAGCTCATTTTCG       | 460           |
| ERMN_Ex3    | GGACAGCCCCATATTATTGAAC     | AAGGTGCACACACAGATTTGG      | 739           |
| ERMN_Ex4_1  | TTTGAGAATAACAGACTAATGGC    | CCTTCCTCTTTAAATTGAGAAACC   | 401           |
| ERMN_Ex4_2  | GATGAGGAGCAGAAGGTTTGG      | AACTTCCACCTCCCTCCAAG       | 444           |
| ACMSD_Ex1   | AACTCCACAGTTTTACAAAAGG     | TTCCACAAAGAAGAGAAAGGC      | 206           |
| ACMSD_Ex2   | CTTCTGCACCTAGCATGCC        | CCAGCCTGCAGTGAGGTATC       | 198           |
| ACMSD_Ex3   | TTAGGGAAGAAATACGTTCTAAAGC  | TTGTCAGCAAACCTTAAGGGC      | 260           |
| ACMSD_Ex4   | AGGAGGAGTTTAGGGTGGAGG      | TGTCCAACTTGAGGCATCTG       | 243           |
| ACMSD_Ex5   | CCATGAGGAGGCACTGTTC        | ACCTCCTCCCTGCCAGC          | 402           |
| ACMSD_Ex6   | TTTCCCCAAAACAGTACCTGG      | AAGCCTCTTTGGGAGTCTGT       | 563           |
| ACMSD_Ex7   | GACAATTCCCCAGCCACTAAC      | TTTTCTTACAGTCACCCCATCTG    | 252           |
| ACMSD_Ex8   | GCTGGCCTACAGTAACTTCTTGC    | GCCAAAGGAGAGAGAATGGG       | 342           |
| ACMSD_Ex9   | CAAAGAGACCTAATAGTGACACCTGC | AGGCTGACTTTCAGCTTTGTC      | 514           |
| ACMSD_Ex10  | GGTAAGAGATTCACTGTATAACCTGC | TGGGACATTCACTTCTGAGTAAATAG | 322           |
| NR4A2_Ex3_1 | CCGGTGTAGCTCCAGGTG         | CGTAGTGGCCACGTAGTTCTG      | 568           |
| NR4A2_Ex3_2 | TTTACTACAAGCCCTCCTCGC      | AGGGCACACTCCGAGGTC         | 575           |
| NR4A2_Ex4   | CGTAGACCCCAGTCACATAACAG    | GGAACGTGATGCTGGAGTATG      | 300           |
| NR4A2_Ex5   | ACATGGATTGTCTGAAGATCTGAAT  | ATGCTTCTAGTCAGTGAAGGCTT    | 489           |
| NR4A2_Ex6   | TTTCCTTACTGGTCAGAGAGAGG    | TCCATTCCATTCTCAAGG         | 535           |
| NR4A2_Ex7   | CCTTTCAAGGTCCACTGGTCTAC    | AGCTAGTTGGCAAACCAAGG       | 429           |

|                |                            |                           |     |
|----------------|----------------------------|---------------------------|-----|
| NR4A2_Ex8      | TTCTCCTTGGTTTTGCCAAC       | GAGACTGCTCACACGGCTATC     | 426 |
| DL492456_Ex1_1 | ATCCACTTCCATCAGTCACGC      | TTGCCAACCTGCAAGCAC        | 635 |
| DL492456_Ex1_2 | GATTGCAGCAGCTAACACTGG      | GCCTCCATGCAGTCCTGTTAG     | 701 |
| CXCR4_Ex1      | GGCAGCAGGTAGCAAAGTGAC      | ATGTCCTGGCCGCTTCTG        | 184 |
| CXCR4_Ex2_1    | AAGAAAGCAAGCCTGAATTGG      | TCCTTGGCCTCTGACTGTTG      | 593 |
| CXCR4_Ex2_2    | CTTCCTATGCAAGGCAGTCC       | TCGATGCTGATCCCAATGTAG     | 468 |
| CXCR4_Ex2_3    | TGGTTGTGTTCCAGTTTCAGC      | GGTCCTGCCTAGACACACATC     | 678 |
| FMNL_Ex1       | CGGGAGCTGTTCTGATTTCC       | GGGAATGGAGGCTCGCTC        | 299 |
| FMNL_Ex2       | TTTGGTCTGCCTGCAAGTTAC      | CAGCAGCAACAGAGGCA         | 523 |
| FMNL_Ex3       | GGTAACATAATCTGATGTGGCTGAC  | GAAGGTCTCTTCCAATGCAGG     | 236 |
| FMNL_Ex4       | AGGAATATTGGTGAATACTGTTGTG  | TGTCCATATTTACTGCACCCG     | 603 |
| FMNL_Ex5       | TTTGCATTGTGTCCGTTCC        | GTTTCTGCCCTCTCTGTGG       | 254 |
| FMNL_Ex6       | CCATACTAAGGTGCAGATGTCTTG   | GCAATTTATGAGATACAGTGCCC   | 359 |
| FMNL_Ex7       | TGTCTGTAAAGTGCATGTGCC      | AATCCTGGCATTACTTCAAATAGA  | 465 |
| FMNL_Ex8       | AAGTTTCATTAGGTAGATACTTCGGG | TTGGTTAAGTGTGACTAGCCC     | 259 |
| FMNL_Ex9       | TTGGAAGGAAGAAACAGCTGAC     | TCAAGTGCCAATATCAACCC      | 494 |
| FMNL_Ex10      | AGACTGCAAAGGCAACCAATG      | AGGCATGGCTGTTTCCAAC       | 620 |
| FMNL_Ex11      | AAAGGAAATCGGTAAGTGAGCC     | CATAGAGCTTTAGGCATTCTTTAGC | 325 |
| FMNL_Ex12      | AAGGGCTGGACTATTTGTCTG      | TGATAGCTCTCTCTTGACAGG     | 714 |
| FMNL_Ex13      | CTTGGAGCTGCACTTTCTGAG      | TGAAGGTACTCTGCGTTCCAC     | 268 |
| FMNL_Ex14      | TTTCTCTTATCCTCAGTTTGCC     | AAGAAACAGATGGACTTTGAAAATA | 738 |
| FMNL_Ex15      | TATGCACATGGCTTATTGCAG      | GAGACCTGGACTTTGAAAGAATAGC | 374 |
| FMNL_Ex16      | AAAGTGTCACTGCAAGGACTG      | CAGGTTAACAGAACACCCATGC    | 291 |
| FMNL_Ex17      | GAAACTAACTGGTGGCTTCCG      | TTCAACTTTGAAGTAGCACACACAG | 456 |
| FMNL_Ex18      | GCTGTACCAGATGGATGATGG      | TCACACTGAGTACGATTCTGGG    | 434 |
| FMNL_Ex19-20   | TGAAGCCTGTATGCTCTAAATGC    | TCCACCACCCTAACTTCATCT     | 444 |
| FMNL_Ex21      | TCAGTTAATGACTCTGGGTGGG     | AGGGAATGGCTCCACCAC        | 297 |
| FMNL_Ex22      | AATCTCCTGAGAACTTGCCCC      | AATACAGGGCCTGCACCAC       | 328 |
| FMNL_Ex23      | TAGAGCATCCAGTTCAAATGCC     | CTGCAGAGAGTTGGGACTCAG     | 243 |
| FMNL_Ex24      | TTGTAATTCTCAACTCACTAAGGATG | GCTGGTCCTTTGTATGGCTTG     | 286 |
| FMNL_Ex25      | TGCTTATTAGTAACATAATGCTCAGG | ACAGGGTTCCAATGCAGAGTAT    | 425 |
| FMNL_Ex26      | CAGCTGGCCTTTGTCCTG         | TGCAGTTAAATCGTAGCACATAAAG | 267 |

|                |                             |                             |     |
|----------------|-----------------------------|-----------------------------|-----|
| TANC1_Ex3      | TTGTCAAGACACAAGTTATATTCCAAC | CATTTCTCATAGCCTCCAGCA       | 269 |
| TANC1_Ex4      | CACTGATGCTTGAGTTTTCCC       | ATTGCTGGTTAACATCAGTACTGAT   | 648 |
| TANC1_Ex5      | CACACACTGTACATTCCAAGGC      | CAAGGACACTCAAGTTTCATTTCAG   | 264 |
| TANC1_Ex6      | TCACCAGACAAAGCAGCTGTAG      | GAACAATGGCTTCCCTGCTC        | 323 |
| TANC1_Ex7      | TTTTAAACTTCCGTTTTCCTGTTC    | CTGGCAGACTGACCTTCACAG       | 413 |
| TANC1_Ex8      | GGCAGTGTGCATGTTTAAATTC      | TTCCCATGTGAAGACAGTGAAC      | 417 |
| TANC1_Ex9      | TTTGTTGAAAGCCTGAACTGA       | ACACAGTTGGCTTCAATGCTG       | 327 |
| TANC1_Ex10     | ACGAGATTGGAATGCTTACAG       | CTTCACACATGATGGCAAACC       | 559 |
| TANC1_Ex11     | TATGCCCTGGCACAAATCAA        | TCCCTTTTCCAATCTACTTCTCAG    | 321 |
| TANC1_Ex12     | ATGGGCAGAGTTGTGTTCTCG       | TGACCACCTGCCTTCTGG          | 399 |
| TANC1_Ex13     | GCACTAAAATACACTGGGTGTTGC    | TGAATGGTTTACAACAGTTTACG     | 336 |
| TANC1_Ex14_1   | CTAGTGAATCTGGTTTAAATGCTG    | GAAGTGCCCTCTCAAAGGC         | 448 |
| TANC1_Ex14_2   | GGGCCACTTGGTCATTAAGAG       | ATTGCCCTTCCATTGAGACAC       | 461 |
| TANC1_Ex15     | CAATGGGTGGTGAATTGAGG        | GAGCTGTCTAAATCTCCAAAGCA     | 268 |
| TANC1_Ex16     | GCAGGTGGGAAGGAGATG          | AACAGGGCTGTTGGAGGAAC        | 269 |
| TANC1_Ex17     | AGGATACTGCCCATTTCAG         | AGAGACAAGAGAGTCTGGCCC       | 406 |
| TANC1_Ex18     | CACAGCTAGGTGGTGCATCTG       | CTCCTTCTTTCGGTCCTTCAG       | 350 |
| TANC1_Ex19     | CACACTGTCTCCTTTGATACATGG    | TCAGTCATTCTTAAGACAATTAGGC   | 249 |
| TANC1_Ex20     | GGCTATCTGTGCTCCACCA         | GTTCTCAGGGGAGCCAGG          | 268 |
| TANC1_Ex21     | AGTTGATAACAGCAATGAATTGG     | TCAGAAAGCACTGAATGGGTC       | 433 |
| TANC1_Ex22     | GGTATAGCAGGTGTGGTGGA        | CCCTGGATTGAGCTGTTAC         | 767 |
| TANC1_Ex23     | AAGACTGCCCACCCCTAAATC       | GGGAGCAGGTCACTCTCTGTG       | 300 |
| TANC1_Ex24     | TCCTGCTGGTGCTGACCTC         | TACCCAATTAAGAGGGTGCTCC      | 253 |
| TANC1_Ex25     | TGGGAGTTATTATTTAGAACCTCT    | CTGGTCTGGAGAAGGGCTG         | 294 |
| TANC1_Ex26     | AATCGTGTGTCCAGGCTG          | CAACACTTCTGCAGCAAAACC       | 246 |
| TANC1_Ex27_1   | TTCTCTTTCCTTTGAGCACAGC      | GACTTGAGGAGGGTCTGAG         | 637 |
| TANC1_Ex27_2   | CAAGCAGGCCCAGATCG           | CATGATGCCCATGAACGG          | 598 |
| TANC1_Ex27_3   | TTTTCAGATGGCTTCAAGGTC       | ATCAATGGCATCAGATCCACC       | 658 |
| SLC4A10_Ex1    | AGACTGTAGCATTGCTTGCTG       | CTAGCAGACCGCTTGCCTAAC       | 409 |
| SLC4A10_Ex1/1F | TCAGACAGCATCAGCAAATACAAC    | AATAATCATATTGTTTAGCTGCCATAA | 461 |
| SLC4A10_Ex1/2F | ATTGTCATTCTGTACAAATCAGAG    | AACTGATTGTAGCATACTGCCTATC   | 473 |
| SLC4A10_Ex2    | AATGTTTGACTGCCTCCAATG       | ATGTACCCCTCCCCAGTAAGC       | 455 |
| SLC4A10_Ex3    | AAAGACAGTGCCACGCTCC         | CTCTCCCACTTCTCTCCAACC       | 447 |
| SLC4A10_Ex4    | GTGGTGCTGAAGGCAGTGAC        | CTTCTAAAATCAGCAGCAATCATAG   | 341 |

|               |                            |                             |     |
|---------------|----------------------------|-----------------------------|-----|
| SLC4A10_Ex5   | CCAAAACCTATGAACCAAGACAC    | TGATTATGAGAATTAGTTTTCCAAAGT | 395 |
| SLC4A10_Ex6   | GGCACACGTTCTAGAGGAAAGC     | TGCCACAGATGCTCTGTTTATG      | 538 |
| SLC4A10_Ex7   | TTGAAGTGCCTATTTCACTCAGTATG | TGCAAAATATTGTGTCAACACCTC    | 261 |
| SLC4A10_Ex7_1 | AGTGATCAGCTCCTTGGACCT      | TGTATGGCAGTTTGTGACAACT      | 425 |
| SLC4A10_Ex8   | TGAAGCACTGTGCAAGAATATG     | TTGTGGATTTCACATTAGTTTCTAGTC | 355 |
| SLC4A10_Ex9   | TTCCTTTGAGATGAGTGATTCTG    | CAACAAACTGTCATGAAAAGAGG     | 257 |
| SLC4A10_Ex10  | ACTCTTCTTTAGAGTCAGAGCTGTC  | ACACCAGCATGGCACATGTA        | 463 |
| SLC4A10_Ex11  | TGCATATTGCTTCAAGGAAAA      | GGTAAAGTATAATGGAAGGGTGATC   | 416 |
| SLC4A10_Ex12  | CCTGGCAACAAAGCAAATGAG      | GAATCCAAAATTAAATGCTCACTTATC | 345 |
| SLC4A10_Ex13  | TTTTCAGGGTGAAGCACAAAG      | CCAAAAGTGATGTTGGGAGAAG      | 326 |
| SLC4A10_Ex14  | TCACTTCCTGAATGAGGTTTATTTTC | TCAACTTAAGGCACATTCTCTGC     | 450 |
| SLC4A10_Ex15  | GTGACTGGAGAAAATGGAGCC      | CCTTAATAATGAAAGATAACCCAG    | 381 |
| SLC4A10_Ex16  | TCAGAAGGTGTTAGTTTTCTGCAAG  | TCAGTGGCTCCTTTTATTACATCA    | 323 |
| SLC4A10_Ex17  | TCAGGTTCTGACAGAGCTAATGG    | TAGCCATGCTGTGTGCATTTTC      | 424 |
| SLC4A10_Ex18  | ATAGGCCACTCAGCTCCTCTG      | AAATTCTCATCTCATTGTAAGACCAAG | 458 |
| SLC4A10_Ex19  | GGTTTCTATTCGCAATCAGGC      | TTGCAAATTTATGGCTCAGATTC     | 421 |
| SLC4A10_Ex20  | AATGCAAAACCACAATCTATTTGAA  | CTCAGGTGGTGGCATTTTCTC       | 227 |
| SLC4A10_Ex21  | GGACCATATTAACATCAACTTGTC   | TTGTTCCAGTTTCAATTCATGTG     | 341 |
| SLC4A10_Ex22  | AAACCATACAGGCAAATCTACACC   | GTGATCACTGTCTAAAGACAAAAGT   | 313 |
| SLC4A10_Ex23  | GCAAACAGAGTGGAAGGTCTTG     | CAAGAAACCTCTCTGAGGATCTACAC  | 289 |
| SLC4A10_Ex24  | TGATTGCCCTATATTTAGTTTCTGTC | AATTACAATTTCTACCCACTTTTGG   | 353 |
| SLC4A10_Ex25  | AGAGTGATTGAGGGAATTGGG      | CATAAGGAAATGCAACCAAGG       | 199 |
|               |                            |                             |     |
| NXPH2_Ex1     | CCCGCGAAGTGGAGATG          | AGGCTGGGCTCCAAGTCAG         | 210 |
| NXPH2_Ex2_1   | TAATTTCCCTTGCGCTTTGAC      | AAGCTCACTGAAACATTGCC        | 514 |
| NXPH2_Ex2_2   | TCAATCTCCTCATCACAGGG       | AGAGCTGGGCTTGTTTCTTTG       | 491 |
|               |                            |                             |     |
| UBXN4_Ex1     | GCAGAGCCGGACGAAGAC         | GCGGCTGAGGTATACAAGAGG       | 246 |
| UBXN4_Ex2     | TTGAGGTTTCCGTTTTCCAG       | CATCAACATTCTTCTAGTCCAAGAG   | 279 |
| UBXN4_Ex3     | TCCTTCAACCTGATTGCTGTG      | ATGGGGTGCACTACACCATTTG      | 384 |
| UBXN4_Ex4     | CAAGTAGCTTGCAAGAGGCAG      | TGGCATGGCAGTTTCTCTG         | 799 |
| UBXN4_Ex5     | CATTTTGGATTCTATTTATGAGC    | TTGTCTTCTGCCACTAAATGACAC    | 484 |
| UBXN4_Ex6     | TTTGTGAACAATTTTATCCACGTC   | CCAAAAGCTGACTGGTGACTTC      | 497 |
| UBXN4_Ex7     | TAGCTAAATCCATCTCCTAAATGTGT | ACCCTAGGCCTGCCACAC          | 223 |
| UBXN4_Ex8     | TTTTCGTTGCATTCAAAATAATATC  | TTTTGTGTGCACAGTCTGGTAG      | 324 |
| UBXN4_Ex9     | CCATGCATATTTGTTTGAATTG     | ATGTCCCTCTGGAATGGACTG       | 324 |

|                 |                            |                             |      |
|-----------------|----------------------------|-----------------------------|------|
| UBXN4_Ex10      | AAGCCATTCTCCCTGCC          | AACACCCGACAGAATTTCCAC       | 647  |
| UBXN4_Ex11      | GCAATGTTAATTAAAGCATCATTTTG | CCTTCAGTATATCTGTGCACTTCC    | 327  |
| UBXN4_Ex12      | AGTTTCATCTGGAACCTTGGG      | CGTGGGAAGTGGAGAGGAC         | 392  |
| UBXN4_Ex13      | TGGAAGTTGGAACAGCTTG        | AAGCAGTCCCAGTCTCCAG         | 302  |
| DLX1_Ex1        | TGTTCCGCTTAAATTGGGTTC      | GATATTCGAAACCTCCACTGCT      | 578  |
| DLX1_Ex2        | TCGGTAGCCACTCGCTCTC        | CAGCGAGCAACAAATGAAGAC       | 200  |
| DLX1_Ex3        | TCCTATCTCTGCTGTTCTGCG      | ACGGGATGGATGGACCTG          | 422  |
| RAPGEF4_Ex1     | AGTCTCCGAGGGACGCAG         | TGAATAGCCGAAAGGGTATG        | 810  |
| RAPGEF4_Ex2     | AAATGAGGCCTGTTGATTCAC      | TGCTATTTATCTCCATAAAGTAACCAC | 295  |
| RAPGEF4_Ex3     | GGGAAGGGTGGTAAGCTCAG       | GGGAAAGAGGAAATGGACTTG       | 318  |
| RAPGEF4_Ex4F    | AACTGAGCTCAGCTTCGATAGAT    | CAGGGAACATGTCAATGATGAT      | 1104 |
| RAPGEF4_Ex5     | AAATACAAGGCTCAGATGCTTCC    | CTCTGACAAGCTGGTGTAGGAC      | 286  |
| RAPGEF4_Ex6     | CCCTGCTCCTGATTCATTG        | TTGCTCTGTTGAATGTGGGTC       | 329  |
| RAPGEF4_Ex7-8   | TGCATTCAAGTTCTTTAGGCAG     | CAAGCCTAACCTTCCAGAACC       | 763  |
| RAPGEF4_Ex9     | AAAGCCATCTCCCATCCTC        | CAAGAGTTCAGCAACTACTTACCC    | 271  |
| RAPGEF4_Ex10    | CTGCCTGACACTCTGCATTTG      | AGAGCAGCCTTGTGTCTCTCC       | 358  |
| RAPGEF4_Ex11    | GATCCGTTTCCATGTTTGAGG      | CCCACAACACCGTAATACTCTCC     | 243  |
| RAPGEF4_Ex12    | CGGGACAGTTTGCATTGTG        | GCTTCCCGTGGCATGTG           | 226  |
| RAPGEF4_Ex13    | ATTTGCCAGTGATGTTTCTCG      | TTGCAAATTTAATTGTGGCACTAC    | 305  |
| RAPGEF4_Ex14    | ATCGCTAGGTACAGCCCATT       | CAGGACTACTCAATTAAGACTATGCTC | 364  |
| RAPGEF4_Ex15    | AGCACCAAATGAGTTTCTGAAG     | CATGCTATTGTAGAAATGATGATACC  | 285  |
| RAPGEF4_Ex16    | TGAAAGGTATATGGTTCCCTGG     | TCCCAAAGTCTTTCGCTATAC       | 311  |
| RAPGEF4_Ex17    | TGAATGGATACTCTTGCTTTCC     | TGAGATAAGAATGGCCCTCG        | 228  |
| RAPGEF4_Ex18    | GCTGGGATCTGTCACTCTTTACC    | CTCCAGGGAAGCTGCTGAG         | 320  |
| RAPGEF4_Ex19    | GCAGATGACATAGGGACACATC     | ACCTTTCTTGTTGGGCAAAGG       | 258  |
| RAPGEF4_Ex20-21 | TTGTCTCCTGAAAGGATTCTGTG    | TGGGTCCAAGGTGATGCTTAC       | 532  |
| RAPGEF4_Ex22    | AAATTGGAGAGGATGCCTAAAC     | GCTAACTCCTTACATAGTTTCTGCTTG | 317  |
| RAPGEF4_Ex23    | TTGTTGGTGTGATTAGGGCAG      | AGCCACTGGGTTCAGTGTGAC       | 263  |
| RAPGEF4_Ex24    | CCCTCAGAACTCCTGAAAGC       | CAAACCTAAGCAATGCCAGCAG      | 280  |
| RAPGEF4_Ex25    | GATTGACTTCACATTTGCTGACC    | TGTTTGGCCCTCTAGCAGTTC       | 408  |
| RAPGEF4_Ex26    | TGAGCCCTGACAAATATTAATGAC   | TCCACCTTTCCATTGTTATAC       | 313  |
| RAPGEF4_Ex27    | TGGAAGATTATTCTCAAATGGC     | CCTGAGGGTGCCATTCATTAG       | 394  |
| RAPGEF4_Ex28    | AGGCAGGTGTATTAGGAGGTAACA   | AAAGAAGGCAGAAGGATGGG        | 288  |

|              |                           |                            |     |
|--------------|---------------------------|----------------------------|-----|
| RAPGEF4_Ex29 | TGCAAATCTGCCAGCATAATC     | GCTGCTGTGAACCACCACAC       | 378 |
| RAPGEF4_Ex30 | GGTACCAAGTATTGCAGAAATGG   | GATATTTCCAGGCTCCAAGG       | 247 |
| RAPGEF4_Ex31 | GAGGGAACCCAGGAACCTATG     | GAATTCTCTAGTGGCAATACAGTCAG | 335 |
| MOG_Ex1      | CCTCCAAGATCTTCCCTTGG      | GGATGTTTGAAGGAGCTAAGCC     | 282 |
| MOG_Ex2      | CCTTCTCATGACAGGCTTGC      | CAAACCATCTGGCCTAGTGCT      | 792 |
| MOG_Ex3      | AGGCGATACACCACAATAATATGA  | CTGCTAGGTATGATACAGAGGCCT   | 808 |
| MOG_Ex4-5    | CTGGGTGTGGGAGGGTC         | ACTCAACCAGGAGCCAGGG        | 451 |
| MOG_Ex6      | AGTCACAGGTACTGCTCATATTG   | TAGCAGATGATCAAGGCAACC      | 676 |
| MOG_Ex7-8    | ATGTCCATAGGGAGGATGTGG     | TGCAACTTGATGGATGAGATG      | 644 |
| RNF39_Ex1_1  | GAGAACCAGATGAGGCGTTAC     | GCGGCAGAAGCTGTGCTC         | 402 |
| RNF39_Ex1_2  | GTCTGGAGCAGCTGGCG         | CTAAACTTCCACAGGGCCTCC      | 427 |
| RNF39_Ex2-3  | CTGAAAGGTGAGGAGGGACAC     | CACCTACTTTGCGGTGCTTC       | 593 |
| RNF39_Ex4_1  | TTCGTTGACTATTCTCCACCC     | CCAGGTCCACGCGAAT           | 509 |
| RNF39_Ex4_2  | CCACTATGCAGTGGGCG         | GCGTGTGAATGTGTTCCAG        | 435 |
| PCLO_Ex1     | TCCAACATGGAGGAGGCAC       | TATATGTACCGCCGTGCTGG       | 560 |
| PCLO_Ex2-1   | AGGCCAGATTCTATTAAGTGCAAAG | TTGGCTTTCCTGTACCTGGAG      | 842 |
| PCLO_Ex2-2   | AGTGGTTCAGAAGGAGCAAGG     | ATGAAGGCTTCTCTGACCCAG      | 566 |
| PCLO_Ex2-3   | AGCCATTGGCTCAACAACC       | TAGGCTGTTGAGCTGAGGG        | 615 |
| PCLO_Ex2-4   | AGCCTCCTTCACAACTGCC       | TGCCATCATGTCATATATGTGTTTAG | 585 |
| PCLO_Ex3-1   | TGAGAGACATAGTTTCAAATGGCAG | AACTCTGTGAGGGTTTGGCAG      | 621 |
| PCLO_Ex3-2   | TAAAGCCAACCACTGACCTTG     | TGGTCCACTTTGTGAATGAGG      | 602 |
| PCLO_Ex3-3   | ACTGGGAAACTCTTTGGGTTTG    | TGCTCAGATATTTGGCCACC       | 612 |
| PCLO_Ex4-1   | AACAGTGACCCACCTTCTCC      | TGTCTTTGGAGCCACTCTGC       | 681 |
| PCLO_Ex4-2   | TGCCTGTTCTACAGAATCATC     | ACCATTGAGCAACTTGATACTTAGG  | 691 |
| PCLO_Ex5-1   | TTATTTGGTAGTAATGGAGAGGCC  | TCTCTTCAACTGAATCATAAGGCTC  | 607 |
| PCLO_Ex5-2   | TCAGAAGAGGAGATCAAAGAGAGTC | TTTAAATCGGCGTAGCCCTC       | 615 |
| PCLO_Ex5-3   | AAGCATTGATGAAGATGCAGG     | TGTCTTTGGCCTTTCCCTTC       | 625 |
| PCLO_Ex5-4   | AAAGCTCGGCACAGACCAC       | TTAGCAGACTGCCATCTACCG      | 655 |
| PCLO_Ex5-5   | TGCAAATGAACGAGATGAAGTG    | TTGCACTGCTGGTGAATC         | 572 |
| PCLO_Ex5-6   | TTGGTGAGGATATGACAGAGTCC   | AGAAACAGTGTGAGCAACTGGC     | 611 |
| PCLO_Ex5-7   | AGTGTATCTTTAGATCGGACTGCC  | AAGTTGGTGGAGGAAGTGGTG      | 565 |
| PCLO_Ex5-8   | TCTGGCAGTCCTTCTGTTTCC     | ATCTGTTGGAGTCCCTGGTTC      | 651 |
| PCLO_Ex5-9   | AGCAGATTATAAATTGCCTTCCC   | TTTCACATCCATTGTAGAAGCAG    | 619 |

|             |                             |                             |     |
|-------------|-----------------------------|-----------------------------|-----|
| PCLO_Ex5-10 | TCCAGAGCCTCTTGCTCTAGATAAC   | TGATTCCCTGGGATACGGTG        | 581 |
| PCLO_Ex5-11 | AGCACATGCAGTGACATTGG        | TTCATCCTGAAATGAGATGAGG      | 590 |
| PCLO_Ex6-1  | TGCATGCAGTCTCATTATTATG      | TCGGATGCTGTGGTTAAAGTG       | 574 |
| PCLO_Ex6-2  | ACAACAGGTGCATCTGAAACG       | TGGTTTGTGGAGAAGCAGTTC       | 556 |
| PCLO_Ex6-3  | AGGCAGGAGACGTTAGCTCAG       | AGTTCTCCTTCTCCTACTCACATAGC  | 549 |
| PCLO_Ex6-4  | TCCGAGGACAGTATGATGACATG     | TTGTCTTTGGGTGGAGATGTG       | 514 |
| PCLO_Ex6-5  | ACGAGTGGATGCCAAGGTAG        | AGGTACCAGGAGCCTGATCG        | 582 |
| PCLO_Ex7-1  | TTGTGACCAATACTTGAAATTATATGC | TTGGAATGTTGGCTGAGTCTG       | 837 |
| PCLO_Ex7-2  | ACATGTCTGACAGTGAAGTGAGTAGC  | TTCCTCCAAACCTATTCTCAAGTC    | 554 |
| PCLO_Ex7-3  | TATTTGGAGCCCAAGATAACCTC     | TGATAAAGTATGGCTGCTGGC       | 653 |
| PCLO_Ex7-4  | AACATCAGATTAAACAGGAATTTG    | AAATCAAGCCCATAGACAGAGG      | 535 |
| PCLO_Ex7-5  | TTCATCTATTGGTGGCATTTC       | AAGCAGACACCAAACAATCAAG      | 887 |
| PCLO_Ex8    | AGAACATCTGCTTCCCTCAATC      | TTAGGACAATTAAGACCATTCTAGGG  | 290 |
| PCLO_Ex9    | TCAATGTGCTTTGAAATGAACC      | TTGTGGGGTGAGGGAAGG          | 413 |
| PCLO_Ex10   | CAGAGAAGGATGAGAACATTTGC     | TCATGTTATATTTAGCTTCTGGATACC | 333 |
| PCLO_Ex11   | TGTCTTCAATGCCATATGTACCC     | GCTAACTGGCAAAGGTTCCAC       | 274 |
| PCLO_Ex12   | GATGGTAGGCATGCTTTGGAG       | CATCTACAATTACATCTGCCTCTGC   | 293 |
| PCLO_Ex13   | TCTGAAGATGCAACGGGAAC        | TTTGTTCGAATGAAGATTTGC       | 972 |
| PCLO_Ex14   | TTATTCTGAAGCAGCCAAATG       | CAATTTCAACAAACCAGTGGC       | 268 |
| PCLO_Ex15   | TCTTTAAATGACAGTTCCACCC      | CCAGAATTGAAAGGCTGATTTG      | 833 |
| PCLO_Ex16   | TCATTTATGTTATGGGATAGCTCCTC  | TTACAGCCCATGTTGAAGTGC       | 265 |
| PCLO_Ex17   | TGCATGTCCTTTAGTTAACTGTG     | TTTCTCTCTCAAATATGATAAATGTGG | 492 |
| PCLO_Ex18   | TTACATAAATGGAAGGAGTTTAAGG   | AGAAACATGCTTTGCATCGTG       | 263 |
| PCLO_Ex19   | TTGTTTCCAGTATCATTGGTGAAG    | AAGCCCATTCTCCTGATTCC        | 519 |
| PCLO_Ex20   | CCCAAATTGTTTCCAGATG         | AGAGAACAGGGTGAGCAGAGG       | 493 |
| PCLO_Ex21   | TTCTTCAGTAGCTGTTTCTTGTCAC   | GGACAATGACTCAGAATTGGG       | 370 |
| PCLO_Ex22   | AGGTATATTGTTTGGCCTGAATAGG   | ACCCTGGGAAAGTCTTCTGAG       | 609 |
| PCLO_Ex23   | AGCATCTGTGTATTTATCAGTCTACCC | AGAGGGACTACAGGCAGGAGC       | 736 |
| PCLO_Ex24   | TTGTGCAAAATGTAACAAGAACTC    | AGCTGATTGGATGGGGTGAG        | 435 |
| PCLO_Ex25   | TCAGCGTCACCCTCTTTG          | TCCACAACAATAAATGTACAAGGTC   | 422 |

## 8.2 Protokolle der PCR-Reaktion

### 8.2.1 WinTaq-PCR

| Reagenzien                    | Volumen (µl) |
|-------------------------------|--------------|
| DNA (25ng/µl)                 | 1,5          |
| Primer <i>forward</i> (10 pM) | 1            |
| Primer <i>reverse</i> (10 pM) | 1            |

|                  |           |
|------------------|-----------|
| WinTaq-Puffer    | 2         |
| dNTPs (2,5 mM)   | 1         |
| WinTaq           | 1,5       |
| <u>optional:</u> |           |
| DMSO             | 1         |
| Betain (5 M)     | 4         |
| USF-Wasser       | auf 20 µl |

#### PCR-Programm: TD Wintaq

| Temperatur | Dauer | Schritt                   | Zyklen |
|------------|-------|---------------------------|--------|
| 94°C       | 3'    | Denaturierung             |        |
| 94°C       | 20"   | Denaturierung             | 20     |
| 65°C       | 40"   | Annealing, - 0,3°C/Zyklus |        |
| 68°C       | 1'15" | Elongation                |        |
| 94°C       | 20"   | Denaturierung             | 18     |
| 59°C       | 40"   | Annealing                 |        |
| 68°C       | 1'15" | Elongation                |        |
| 70°C       | 10'   | Elongation                |        |
| 15°C       | 5'    | Abkühlen                  |        |

#### 8.2.2 *Invitro Taq-PCR*

| Reagenzien                    | Volumen (µl) |
|-------------------------------|--------------|
| DNA (25ng/µl)                 | 1,5          |
| Primer <i>forward</i> (10 pM) | 1            |
| Primer <i>reverse</i> (10 pM) | 1            |
| 10 x Puffer                   | 1,5          |
| MgCl <sub>2</sub> (2,5 mM)    | 0,45         |
| dNTPs (2,5 mM)                | 0,3          |
| Invitro Taq                   | 0,07         |
| USF-Wasser                    | auf 18,5 µl  |

#### PCR-Programm: TD\_invitro

| Temperatur | Dauer | Schritt                   | Zyklen |
|------------|-------|---------------------------|--------|
| 94°C       | 3'    | Denaturierung             |        |
| 94°C       | 20"   | Denaturierung             | 10     |
| 65°C       | 40"   | Annealing, - 0,5°C/Zyklus |        |
| 70°C       | 1'15" | Elongation                |        |
| 94°C       | 20"   | Denaturierung             | 29     |
| 58°C       | 40"   | Annealing                 |        |
| 70°C       | 1'15" | Elongation                |        |
| 70°C       | 10'   | Elongation                |        |
| 15°C       | 5'    | Abkühlen                  |        |

#### 8.2.3 *Gold Taq-PCR*

| Reagenzien                    | Volumen (µl)            |
|-------------------------------|-------------------------|
| DNA (25ng/µl)                 | 2,5                     |
| Primer <i>forward</i> (10 pM) | 1 (1,2 mit DMSO/Betain) |
| Primer <i>reverse</i> (10 pM) | 1 (1,2 mit DMSO/Betain) |
| 10 x Puffer                   | 1,5                     |

|                            |           |
|----------------------------|-----------|
| MgCl <sub>2</sub> (2,5 mM) | 1         |
| dNTPs (2,5 mM)             | 1,5       |
| Invitro Taq                | 0,2       |
| USF-Wasser                 | auf 15 µl |

#### PCR-Programm: TD63-53 Gold

| Temperatur | Dauer | Schritt                 | Zyklen |
|------------|-------|-------------------------|--------|
| 96°C       | 10'   | Denaturierung           |        |
| 94°C       | 20"   | Denaturierung           |        |
| 63°C       | 1'    | Annealing, - 1°C/Zyklus | 9      |
| 72°C       | 1'    | Elongation              |        |
| 94°C       | 20"   | Denaturierung           |        |
| 53°C       | 1'    | Annealing               | 29     |
| 72°C       | 1'    | Elongation              |        |
| 72°C       | 10'   | Elongation              |        |
| 15°C       | 10'   | Abkühlen                |        |

#### 8.2.4 GC-rich Kit

| Reagenzien                    | Volumen (µl) |
|-------------------------------|--------------|
| DNA (25ng/µl)                 | 2,5          |
| Primer <i>forward</i> (10 pM) | 0,5          |
| Primer <i>reverse</i> (10 pM) | 0,5          |

##### Mix 1

|               |     |
|---------------|-----|
| Puffer rot    | 2,5 |
| dNTPs (10 µM) | 0,5 |
| USF-Wasser    | 11  |

##### Mix 2

|             |     |
|-------------|-----|
| Puffer gelb | 5   |
| Enzymmix    | 0,5 |
| USF-Wasser  | 2   |

#### PCR-Programm: GCrich\_A60

| Temperatur | Dauer | Schritt                 | Zyklen |
|------------|-------|-------------------------|--------|
| 95°C       | 3'    | Denaturierung           |        |
| 95°C       | 30"   | Denaturierung           |        |
| 60°C       | 30"   | Annealing               | 11     |
| 68°C       | 45"   | Elongation              |        |
| 95°C       | 30"   | Denaturierung           |        |
| 60°C       | 30"   | Annealing               | 25     |
| 68°C       | 45"   | Elongation, + 5"/Zyklus |        |
| 68°C       | 10'   | Elongation              |        |
| 15°C       | 10'   | Abkühlen                |        |

### 8.3 Protokoll der Sequenzierreaktion

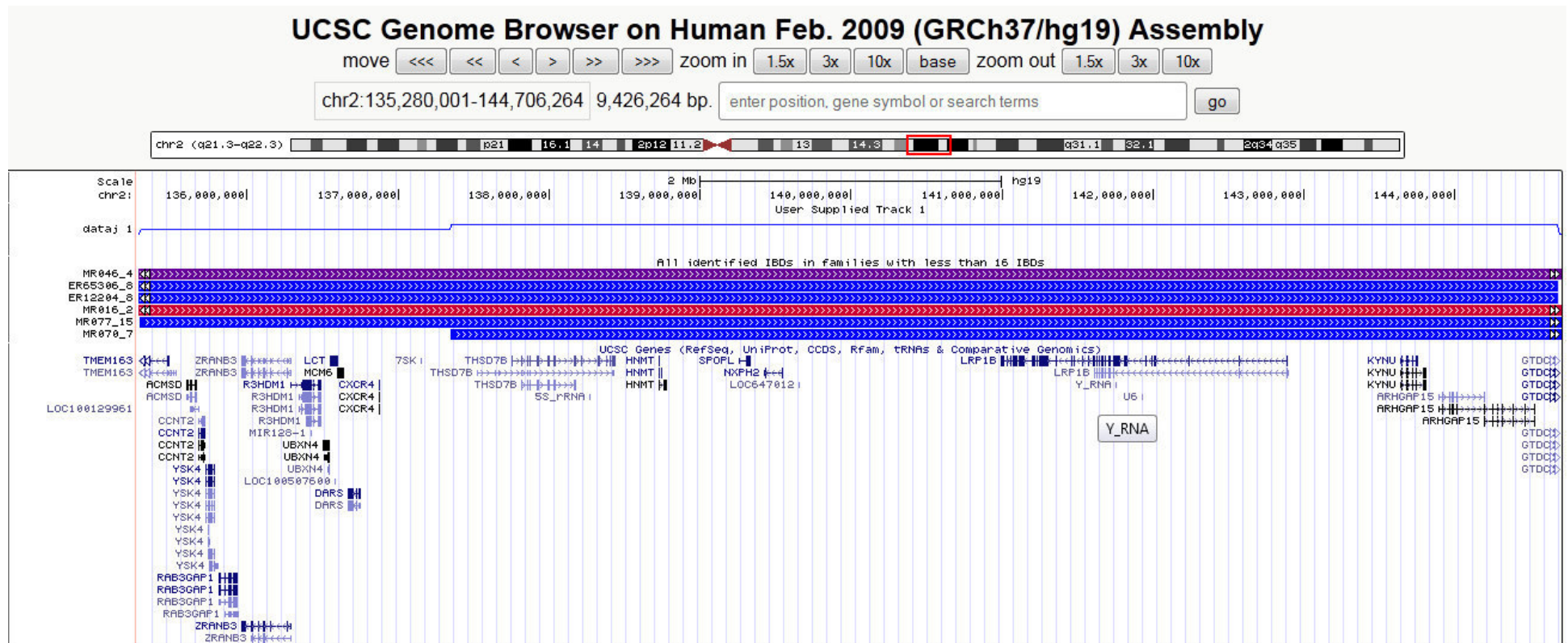
| Reagenzien                                  | Volumen (µl) |
|---------------------------------------------|--------------|
| PCR-Produkt                                 | 5            |
| Primer <i>forward</i> oder reverse (2,5 pM) | 1            |
| <i>BigDye</i> Puffer                        | 2            |
| BigDye                                      | 0,2          |
| USF-Wasser                                  | auf 10 µl    |

Sequenzierprogramm: BigDye55\_2Min.

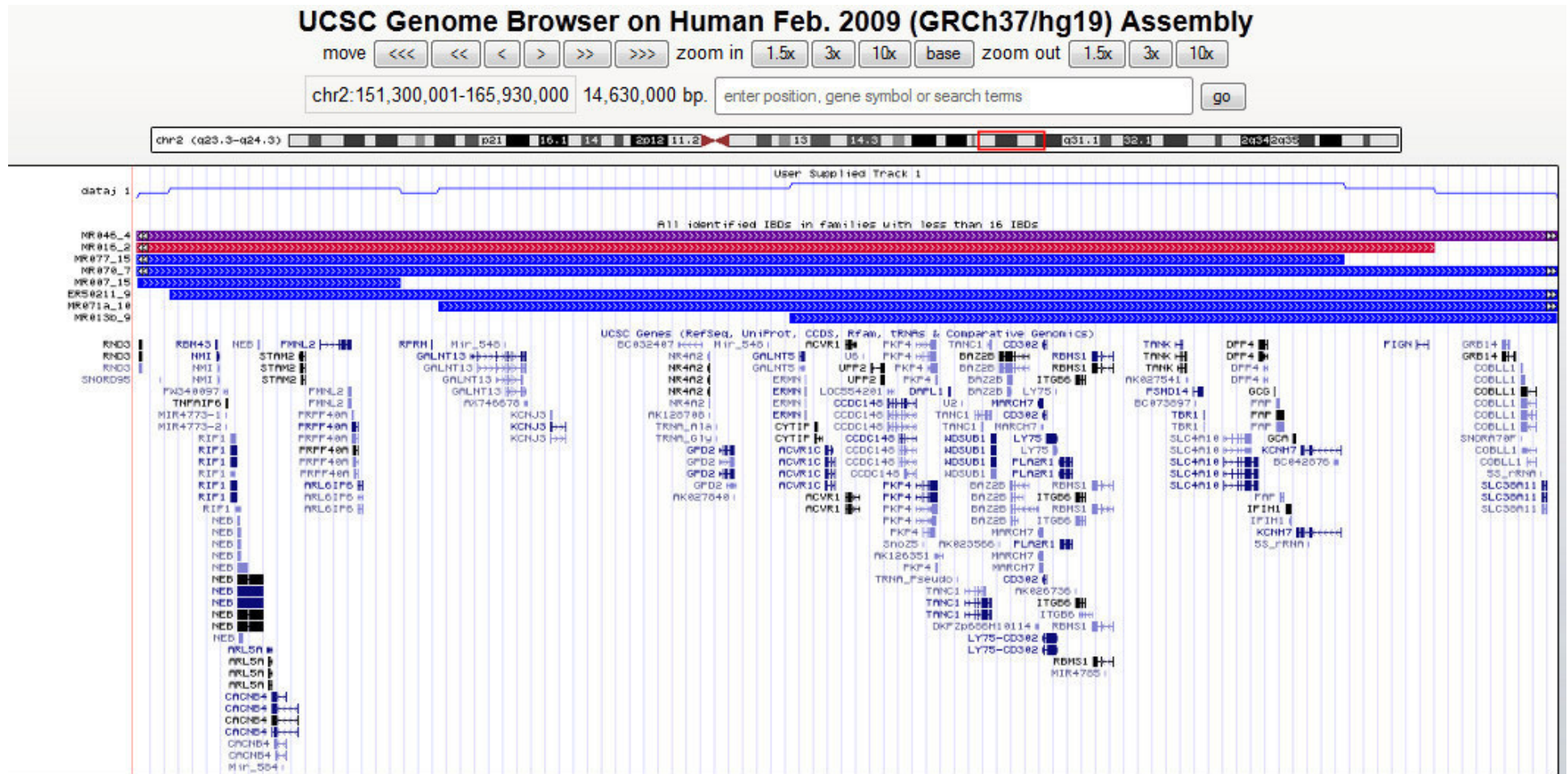
| Temperatur | Dauer | Schritt       | Zyklen |
|------------|-------|---------------|--------|
| 96°C       | 10"   | Denaturierung | 25     |
| 55°C       | 10"   | Annealing     |        |
| 60°C       | 2'    | Elongation    |        |
| 15°C       | 10'   | Abkühlen      |        |

## 8.4 Screenshots der Kandidatenregionen (Stand: September 2012)

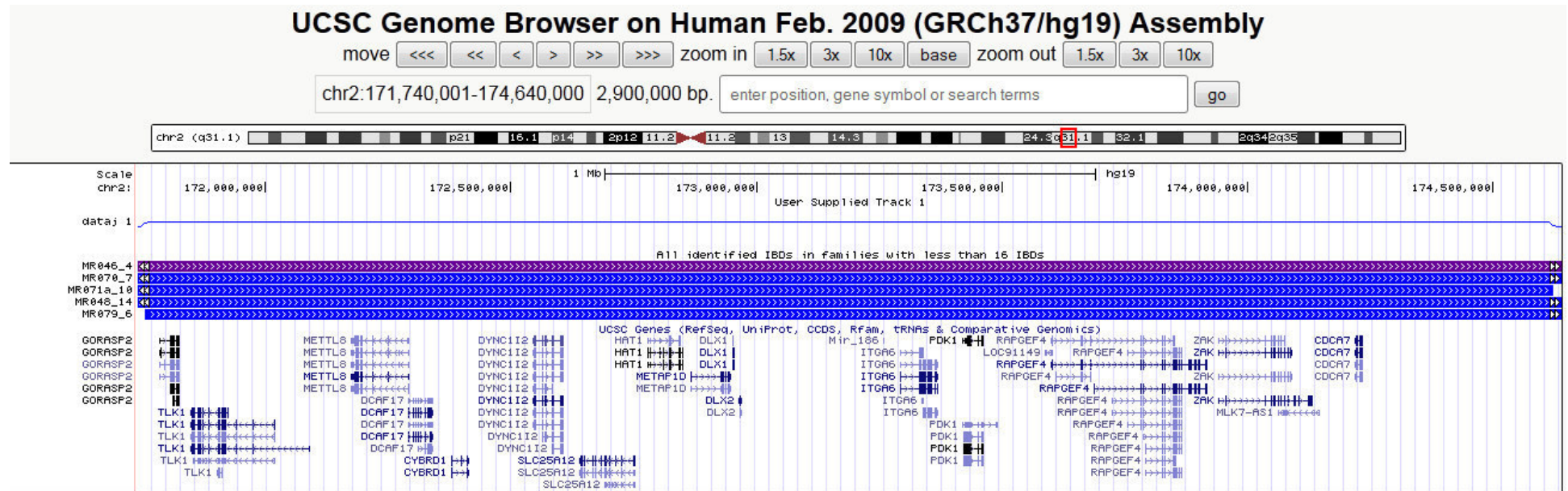
Chr2:135.280.001-144.706.264



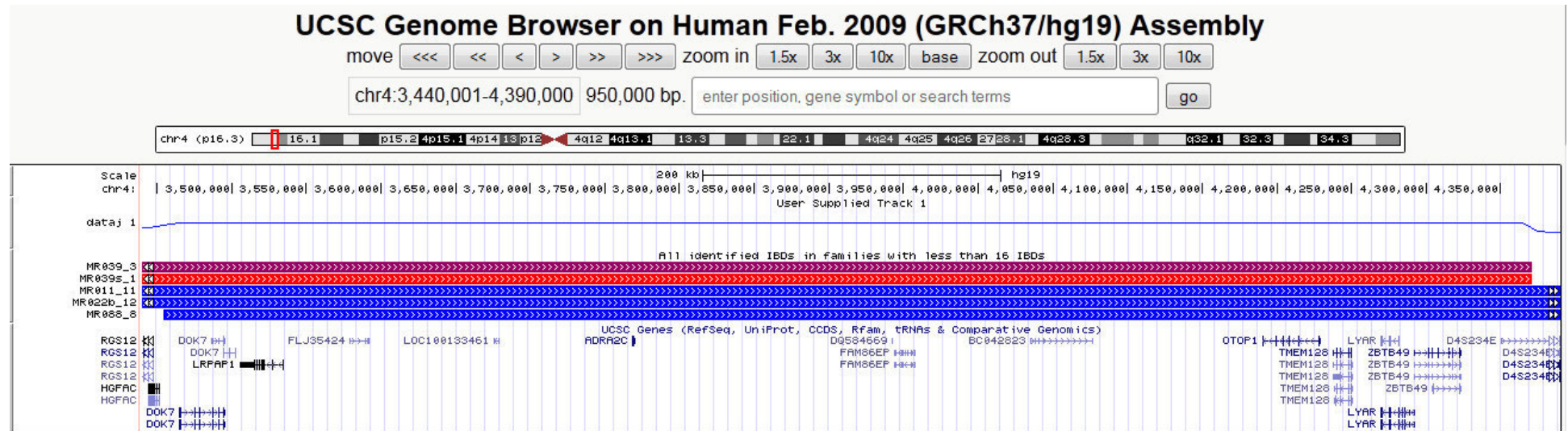
Chr2:151.300.001-165.930.000



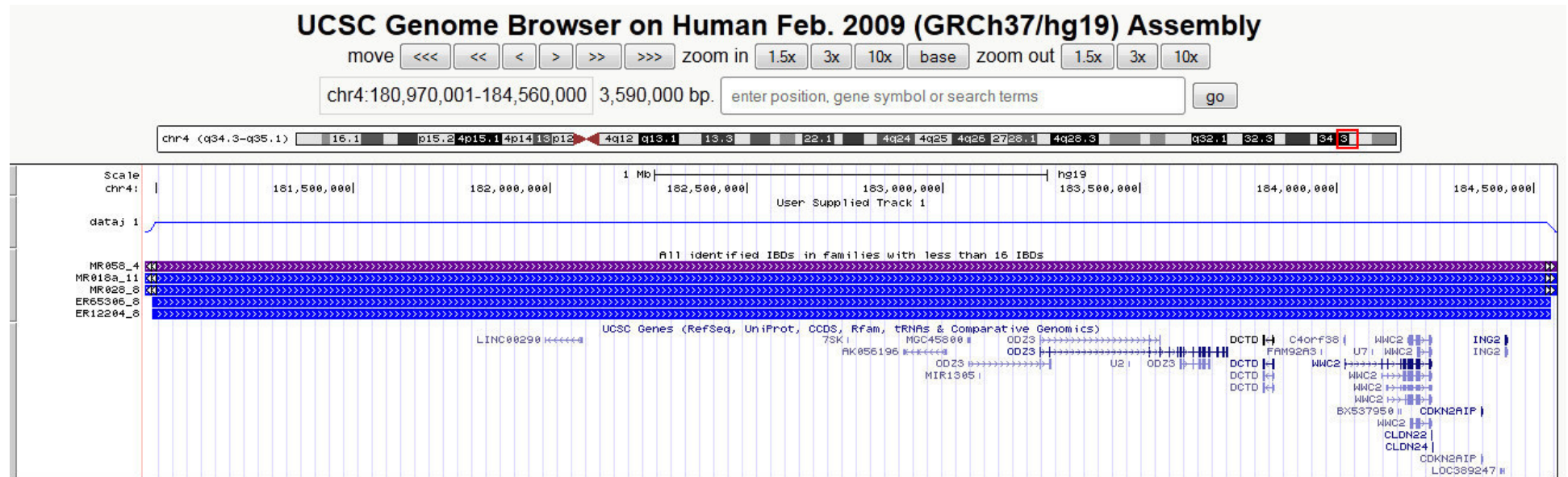
Chr2:171,740,001-174,640,000



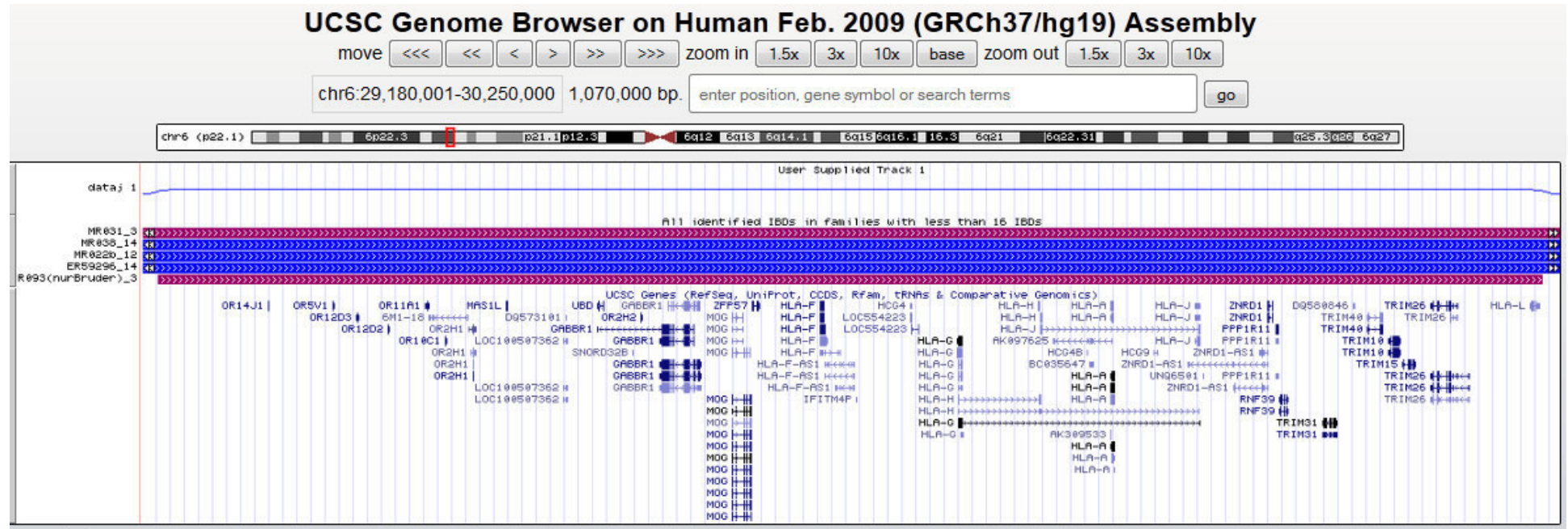
Chr4:3.440.001-4.390.000



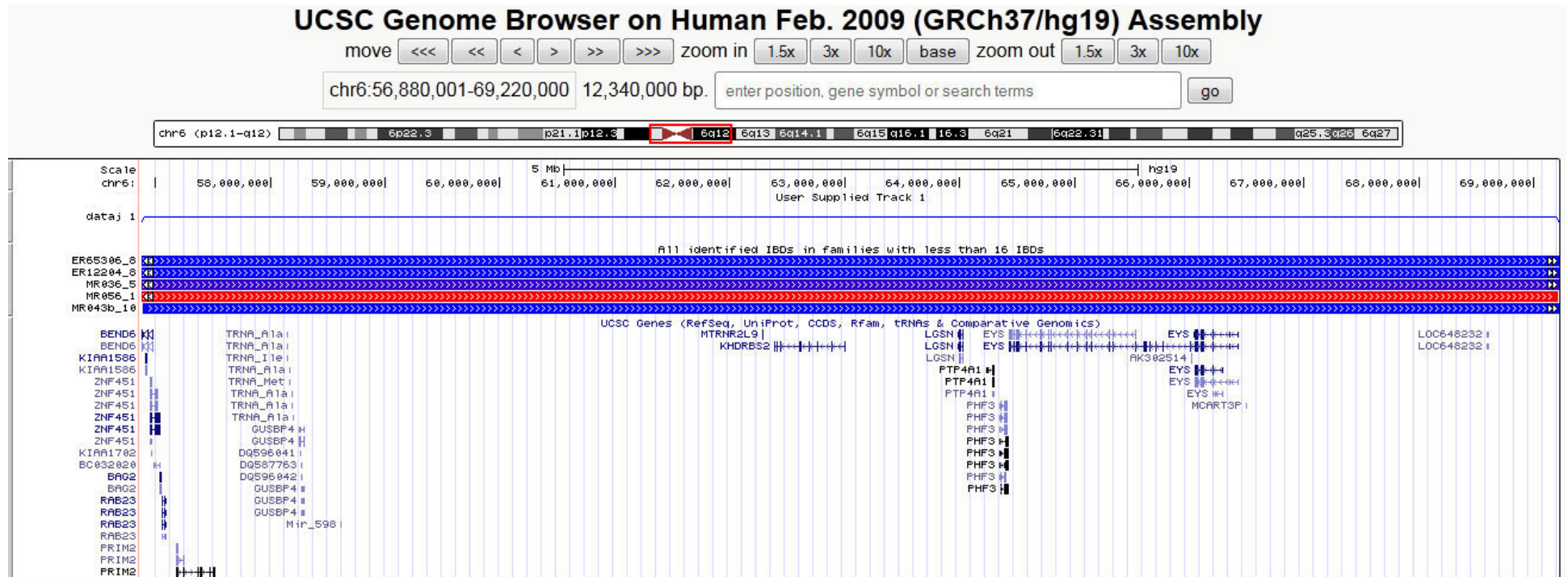
Chr4:180.970.001-184.560.000



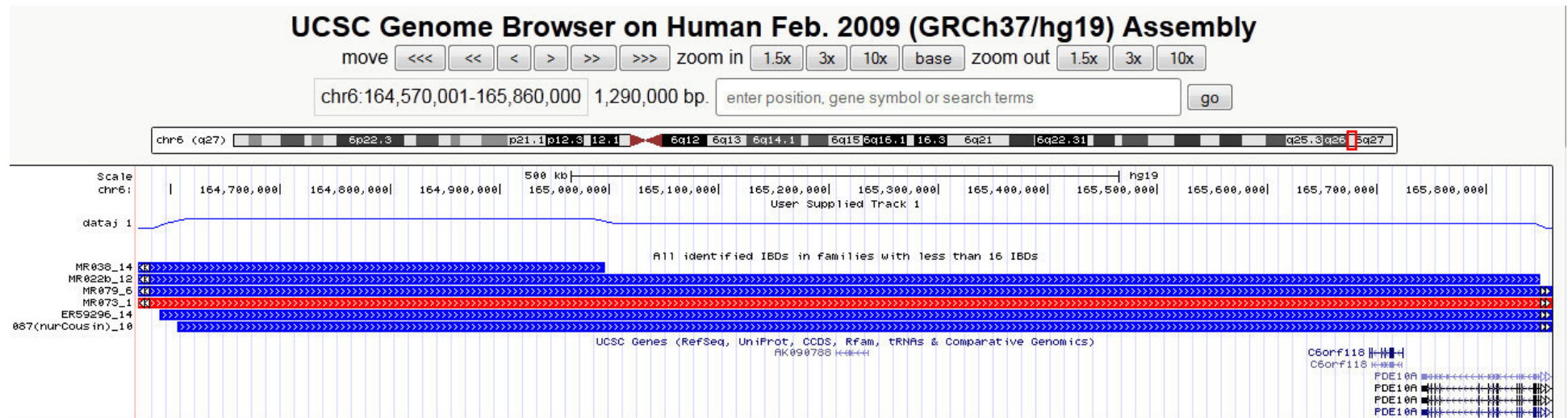
Chr6:29.180.001-30.250.000



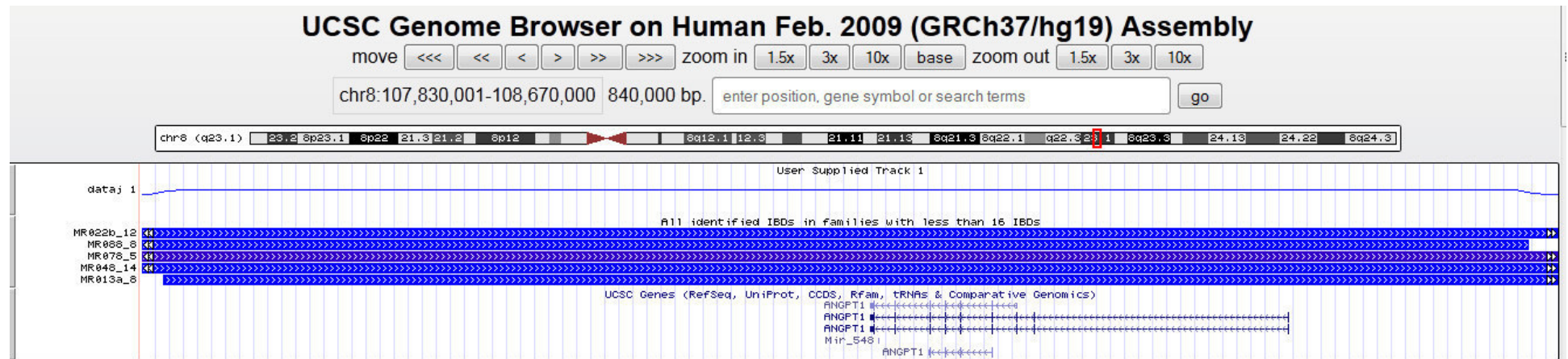
Chr6:56.880.001-69.220.000



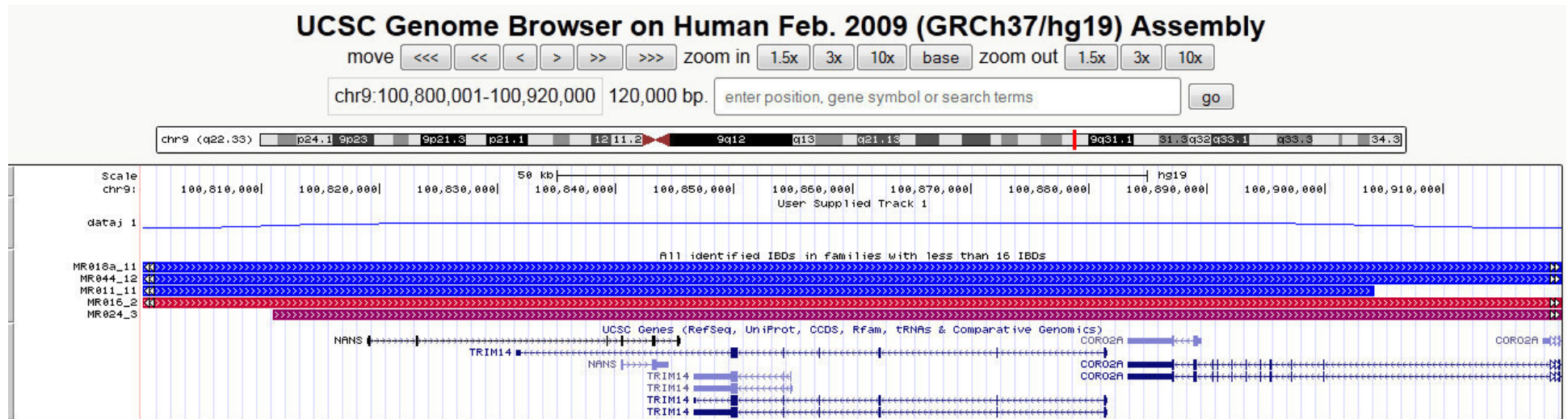
Chr6:164.570.001-165.860.000



Chr8:107,830,001-108,670,000



Chr9:100.800.001-100.920.000



## 8.5 Priorisierung aller Gene in den Kandidatenregionen

Region: Chr2:135,3M - 144,7M

| name                   | c.e. | position                | expression                                                      | function                                                                                                                                                                                                                   | pri. | Comment                                                                                                                                 |
|------------------------|------|-------------------------|-----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b><i>TMEM163</i></b>  | 8    | 135,213,330-135,476,571 | cerebellum, thalamus                                            | transmembrane protein163                                                                                                                                                                                                   | 4    |                                                                                                                                         |
| <b><i>ACMSD</i></b>    | 10   | 135,213,330-135,476,572 | kidney, brain                                                   | aminocarboxymuconate semialdehyde decarboxylase<br>-->ACMSD prevents the accumulation of quinolinate. The neuronal excitotoxin quinolinate has been implicated in the pathogenesis of several neurodegenerative disorders. | 1    | ACMSD is the only known enzyme that can process ACMS to a benign catabolite and thus prevent the accumulation of quinolinate from ACMS. |
| <b><i>AK303295</i></b> | 0    | 135,213,330-135,476,573 | no further information                                          |                                                                                                                                                                                                                            | 4    |                                                                                                                                         |
| <b><i>CCNT2</i></b>    | 10   | 135,213,330-135,476,574 | different brain regions, T-cells                                | cyclin family-->cell cycle(CDK kinases)                                                                                                                                                                                    | 2    | subunits of the transcription elongation factor p-TEFb,p-TEFb: negative regulator of human immunodeficiency virus type 1                |
| <b><i>YSK4</i></b>     | 10   | 135,213,330-135,476,575 | different brain regions                                         | Yeast Sps1/Ste20-related kinase 4 isoform 1                                                                                                                                                                                | 4    | no further information                                                                                                                  |
| <b><i>RAB3GAP1</i></b> | 24   | 135,213,330-135,476,576 | prefrontal cortex, medulla oblongata, pons, blood, lymphoblasts | RAB3 GTPase-activating protein-->mediates the hydrolysis of GTP bound Rab3 to the GDP bound form.                                                                                                                          | 2    | Associations with Warburg micro syndrome(ocular and neurodevelopmental defects)                                                         |
| <b><i>ZRANB3</i></b>   | 11   | 135,213,330-135,476,577 | no further information                                          | Putative uncharacterized protein                                                                                                                                                                                           | 4    |                                                                                                                                         |

|                       |    |                         |                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                   |   |                                                         |
|-----------------------|----|-------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|---------------------------------------------------------|
| <b>R3HDM1</b>         | 24 | 135,213,330-135,476,578 | fetal brain, prefrontal cortex, occipital lobe, cingulate cortex, hypothalamus, subthalamic nucleus, medulla oblongata, lymphoblasts | R3H domain containing 1                                                                                                                                                           | 3 | no further information                                  |
| <b>DM004397</b>       | 0  | 135,213,330-135,476,579 | no further information                                                                                                               |                                                                                                                                                                                   | 4 |                                                         |
| <b>UBXN4</b>          | 13 | 135,213,330-135,476,580 | in many tissues, including heart, brain, placenta, lung, liver, skeletal muscle, kidney and pancreas                                 | UBX domain containing 2-->UBXD2 is an integral membrane protein of the endoplasmic reticulum that binds valosin-containing protein and promotes ER-associated protein degradation | 2 | Accumulates in Alzheimer disease-afflicted brains       |
| <b>AK097922</b>       | 0  | 135,213,330-135,476,581 | no further information                                                                                                               |                                                                                                                                                                                   | 4 |                                                         |
| <b>DKFZp781B11202</b> | 13 | 135,213,330-135,476,582 | especially in lymphoblasts and blood                                                                                                 | part of a multienzyme complex of aminoacyl-tRNA synthetases. charges its cognate tRNA with aspartate during protein biosynthesis                                                  | 3 | no further information                                  |
| <b>LCT</b>            | 17 | 135,213,330-135,476,583 |                                                                                                                                      | phlorizin hydrolase activity and lactase activity                                                                                                                                 | 5 | Disease Associations with hypolactasia and bone density |
| <b>MCM6</b>           | 17 | 135,213,330-135,476,584 | lymphoblasts, leukemia lymphoblastic+chronic myelogenous, BM-CD 34, BM-CD 33+endothelial, bone marrow                                | mini-chromosome maintenance proteins-->eukaryotic genome replication, key component of the pre-replication complex                                                                | 3 | MCM2-5,7: same function as MCM 6                        |
| <b>DARS</b>           | 16 | 135,213,330-135,476,585 | BM-CD 34, BM-CD 33+endothelial, Burkitt-Lymphoma, 721 B Lymphoblasts, thyroid, Hypothalamus                                          | aspartyl-tRNA synthetase                                                                                                                                                          | 3 | no further information                                  |

|                 |    |                         |                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                           |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|-----------------|----|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>CXCR4</b>    | 2  | 135,213,330-135,476,586 | bone marrow, blood, t-+b-cells, pons, lung, adrenal cortex, pancreas                  | chemokine receptor-->chemokine receptor specific for stromal cell-derived factor-1. It acts with the CD4 protein to support HIV entry into cells and is also highly expressed in breast cancer cells.                                     | 2 | Mutations in this gene have been associated with WHIM-syndrome. Review highlights the differential expression of CXCR4 and CXCL12 and their importance for the temporal regulation of neuronal migration and circuit formation during development and possibly in adult neurogenesis and repair. CXCR4 is critical to the progression of diverse brain malignancies |
| <b>KIAA1679</b> | 0  | 135,213,330-135,476,587 | no further information                                                                |                                                                                                                                                                                                                                           | 4 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>THSD7B</b>   | 27 | 135,213,330-135,476,588 | different brain regions, atrioventricular node                                        | Thrombospondin type-1 domain-containing protein 7B                                                                                                                                                                                        | 4 | no further information                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| <b>HNMT</b>     | 6  | 138,721,808-138,773,933 | Different brain regions have different expression levels.                             | histamine N-methyltransferase, brain: the neurotransmitter activity of histamine is controlled by N(tau)-methylation via histamine N-methyltransferase. Polymorphism affects the activity levels of this gene product in red blood cells. | 2 | Positive Disease Associations: alcoholism, Asthma                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <b>DL492456</b> | 1  | 139,044,726-139,046,440 |                                                                                       | highly similar to 14-3-3 protein epsilon(signaling pathway)                                                                                                                                                                               | 1 | mice deficient in the 14-3-3 epsilon protein have defects in brain development and neuronal migration, similar to defects observed in mice heterozygous with regard to Pafah1b, the gene that is associated with isolated lissencephaly                                                                                                                             |
| <b>CR626194</b> | 0  | 139,175,857-139,259,268 | no further information                                                                |                                                                                                                                                                                                                                           | 4 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>NXPH2</b>    | 2  | 139,426,729-139,537,811 | Expressed in brain and kidney                                                         | neurexophilin 2 precursor-->May be signaling molecules that resemble neuropeptides and that act by binding to alpha-neurexins and possibly other receptors                                                                                | 2 | no further information                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| <b>SPOPL</b>    | 10 | 139,259,350-139,330,803 | ovary, lymphoblasts, skin, blood, trigeminal + ciliary ganglion, cerebellum peduncles | speckle-type POZ protein-like-->may act in ubiquitination and proteasomal degradation processes                                                                                                                                           | 3 | Protein modification; protein ubiquitination                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

|                 |    |                         |                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-----------------|----|-------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>LRP1B</b>    | 91 | 140,988,996-142,889,270 | Expressed in thyroid gland and in salivary gland, as well as in adult and fetal brain; fetal brain, prefrontal cortex, amygdala, caudatus nucleus, globus pallidus | low density lipoprotein-related protein-->play a wide variety of roles in normal cell function and development due to their interactions with multiple ligands | 2 | Associations with NSCLC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| <b>LRPDIT</b>   | 14 | 141,607,671-142,889,270 | amygdala, prefrontal cortex                                                                                                                                        | low density lipoprotein receptor related protein-deleted in tumor                                                                                              | 2 | no further information                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| <b>GTDC1</b>    | 7  | 144,703,583-144,969,146 | Ubiquitous                                                                                                                                                         | Glycosyltransferase-like domain-containing protein 1                                                                                                           | 4 | no further information                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| <b>KYNU</b>     | 13 | 143,635,195-143,799,884 | Monocytes, dendritic cells, 721 B lymphoblasts                                                                                                                     | Kynureninase-->catalyzes the cleavage of L-kynurenine and L-3-hydroxykynurenine into anthranilic and 3-hydroxyanthranilic acids                                | 1 | Positive Disease Associations: hypertension; defect of tryptophan metabolism is described in a Sudanese family with a high degree of consanguinity. autosomal recessive pattern of inheritance. The condition manifests as a pellagra-like skin rash within 8 weeks after birth, with signs of cerebellar ataxia and developmental retardation. Six of nine children born from first-cousin parents presented with the same clinical picture: non-progressive congenital encephalopathy with marked hypertonia resembling the stiff-baby syndrome, delayed milestones, mental deficiency and congenital deafness. |
| <b>ARHGAP15</b> | 13 | 143,886,899-144,525,920 | lung, liver and lymphoid cells; pons                                                                                                                               | GTPase activator for the Rho-type GTPases by converting them to an inactive GDP-bound state.                                                                   | 3 | Overexpression results in an increase in actin stress fibers and cell contraction.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |

c.e. = coding exons, pri.= prioritization

Region: Chr2:151,3M - 165,9M

| name            | c.e. | position                | expression                                                                            | function                                                                                                                                            | pri. | Comment                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-----------------|------|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>RND3</b>     | 5    | 151,324,712-151,344,175 | ubiquitous; fetal brain, olfactory bulb, muscle, bronchial epithelial cells, prostate | Organization of the actin cytoskeleton in response to extracellular growth factors                                                                  | 2    | expression of RND1 or RhoE in mammalian cells inhibited the formation of actin stress fibers, membrane ruffles, and integrin-based focal adhesions, and induced loss of cell-substrate adhesion leading to cell rounding. Conclusion: RND proteins act as negative regulators of actin assembly and of cell adhesion                                                                                             |
| <b>RBM43</b>    | 4    | 152,104,729-152,118,389 | especially dorsal root ganglion, subthalamic nucleus, atrioventricular node, ovary    | RNA binding, nucleotide binding                                                                                                                     | 4    | no further information                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| <b>TNFAIP6</b>  | 6    | 152,214,105-152,236,559 | especially fetal lung, blood, muscle                                                  | tumor necrosis factor-->secretory protein that contains a hyaluronan-binding domain-->involved in extracellular matrix stability and cell migration | 3    | enhance the serine protease inhibitory activity of I alpha I, which is important in the protease network associated with inflammation. Enhanced levels of this protein are found in the synovial fluid of patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis.                                                                                                                                                 |
| <b>BC072675</b> | 0    | 152,332,640-152,333,850 | no further information                                                                |                                                                                                                                                     | 4    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>NEB</b>      | 147  | 152,341,855-152,590,989 | thyroid, skeletal muscle, tongue                                                      | encodes nebulin, a giant protein component of the cytoskeletal matrix                                                                               | 3    | mutation in this gene cause the autosomal recessive nemaline myopathy type(hypotonia at birth, with particular involvement of the bulbar, neck flexor, and respiratory muscles. The facies was myopathic with a high-arched palate. The spine was hyperlordotic. Deep tendon reflexes were decreased or absent. Chest deformities were common, but there was no cardiac involvement. No intellectual disability. |
| <b>ARL5</b>     | 0    | 152,645,593-152,685,009 | BM-CD33 + myeloid, blood, cells of the immune system, placenta, thyroid, prostate     | the protein is developmentally regulated and may play a role during embryonic development                                                           | 2    | Alternative splicing results in multiple transcript variants encoding different isoforms.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

|               |    |                         |                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                    |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|---------------|----|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>STAM2</b>  | 14 | 152,973,316-153,032,506 | especially fetal brain, prefrontal cortex, amygdala, immune cells, pituitary gland, smooth muscle, trachea, fetal lung, bronchial epithelial cells | closely related to STAM, an adaptor protein involved in the downstream signaling of cytokine receptors, both of which contain a SH3 domain and the immunoreceptor tyrosine-based activation motif. | 2 | acts downstream of JAK kinases, and is phosphorylated in response to cytokine stimulation. Are thought to exhibit compensatory effects on the signaling pathway                                                                                                                                                                                                                                                         |
| <b>NMI</b>    | 7  | 152,126,982-152,146,430 | brain, cancer cell line-myeloid leukemias, blood, fetal lung, ovar                                                                                 | interacts with NMYC and CMYC (two members of the oncogene Myc family), and other transcription factors containing a Zip, HLH, or HLH-Zip motif.                                                    | 3 | The NMI protein also interacts with all STATs except STAT2 and augments STAT-mediated transcription in response to cytokines IL2 and IFN-gamma.                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| <b>RIF1</b>   | 35 | 152,266,428-152,332,418 | Highly expressed in testis                                                                                                                         | may be involved in DNA repair-->Required for checkpoint mediated arrest of cell cycle progression in response to DNA damage during S-phase.                                                        | 3 | Seems to play no role in either the G1/S or G2/M DNA damage checkpoints                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| <b>ARL5A</b>  | 6  | 152,657,480-152,685,009 | muscle specific, BM-CD33 + myeloid, blood, cells of the immune system, placenta, thyroid, prostate                                                 | ARF family of GTP-binding proteins. With its distinctive nuclear/nucleolar localization and interaction with HP1alpha development.                                                                 | 2 | The protein is developmentally regulated and may play a role in nuclear dynamics and/or signaling cascades during embryonic                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| <b>CACNB4</b> | 13 | 152,689,288-152,955,593 | Cingulate cortex, cerebellum peduncles, amygdala, thalamus, prefrontal cortex, occipital lobe, skeletal muscle, immune cells                       | member of the beta subunit family of voltage-dependent calcium channel complex proteins.                                                                                                           | 2 | The protein encoded by this locus plays an important role in calcium channel function by modulating G protein inhibition, increasing peak calcium current, controlling the alpha-1 subunit membrane targeting and shifting the voltage dependence of activation and inactivation. Certain mutations in this gene have been associated with idiopathic generalized epilepsy (IGE) and juvenile myoclonic epilepsy (JME). |

|                 |    |                         |                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                           |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|-----------------|----|-------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>FMNL2</b>    | 26 | 153,191,751-153,506,346 | Conspicuous high expression in brain, spinal cord, lymphoblasts, adipocyte, fetal lung, placenta       | formin-related protein--> have been implicated in morphogenesis, cytokinesis, and cell polarity.                                                                                                                                          | 1 | severely mentally retarded patients, but neither dysmorphic nor microcephalic. His phenotype was initially ascribed to a presumed cryptic chromosome 19 imbalance caused by the 19p-into19q insertion, but subsequent array-CGH detected a 3.9-Mb deletion of 2q23.3q24.1 This novel microdeletion involves seven genes, of which FMNL2, a suggested regulator of Rho-GTPases, and NR4A2, an essential gene for differentiation of dopaminergic neurons |
| <b>PRPF40A</b>  | 26 | 153,508,109-153,573,975 | blood, immune cells, bronchial epithelial cells                                                        | binding huntingtin in HD lymphoblastoid cells                                                                                                                                                                                             | 2 | interacting with the human nuclear scaffold protein NAKAP. In human embryonic kidney cells, NAKAP and HYPA localized within the nucleus and copurified with the nuclear matrix. NAKAP associated with HYPA in normal human brain, and both proteins copurified with a portion of huntingtin protein in HD brain                                                                                                                                         |
| <b>ARL6IP6</b>  | 4  | 153,574,423-153,617,767 | lymph node, nerve, embryonic tissue                                                                    | ADP-ribosylation factor-like protein 6-interacting protein                                                                                                                                                                                | 4 | no further information                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>PFAAP1</b>   | 0  | 153,574,423-153,617,767 |                                                                                                        | phosphonoformate immuno-associated protein                                                                                                                                                                                                | 4 | no further information                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>RPRM</b>     | 1  | 154,333,852-154,335,322 | fetal brain, whole brain, lymphoblasts, uterus, prostate, adrenal gland, pituitary gland, pineal gland | TP53 dependant G2 arrest mediator-->may be involved in the regulation of p53-dependent g2 arrest of the cell cycle. seems to induce cell cycle arrest by inhibiting cdk1 activity and nuclear translocation of the cdc2 cyclin b1 complex | 3 | no further information                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>GALNT13</b>  | 11 | 154,728,426-155,310,488 | ganglia, brain                                                                                         | member of the UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase (GalNAcT; EC 2.4.1.41) family                                                                                                              | 3 | protein initiate O-linked glycosylation of mucins by the initial transfer of N-acetylgalactosamine (GalNAc) with an alpha-linkage to a serine or threonine residue. Pathway: Protein modification; protein glycosylation.                                                                                                                                                                                                                               |
| <b>AX746678</b> | 0  | 155,292,365-155,313,950 | no further information                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                           | 4 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |

|                 |    |                         |                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                    |   |                                                                                                                                                                                                                                          |
|-----------------|----|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>KCNJ3</b>    | 3  | 155,555,093-155,713,014 | occipital lobe, whole brain, amygdala, thalamus, monocytes, colorectal CA, skeletal muscle                                                                                                         | potassium inwardly-rectifying channel -->has a greater tendency to allow potassium to flow into a cell rather than out of a cell, is controlled by G-proteins and plays an important role in regulating heartbeat. | 2 | Associates with GIRK2, GIRK3 or GIRK4 to form a G-protein activated heteromultimer pore-forming unit. The resulting inward current is much larger. Positive Disease Associations: epilepsy                                               |
| <b>BC032307</b> | 0  | 156,877,048-157,111,432 | salivary gland, esophagus                                                                                                                                                                          | no further information                                                                                                                                                                                             | 4 |                                                                                                                                                                                                                                          |
| <b>NR4A2</b>    | 6  | 157,180,946-157,189,287 | Cerebellum, Cerebellum peduncles, BM-CD33+myeloid, adrenal cortex, trachea, ovary; expressed in a number of cell lines of t-cell, b-cell and fibroblast origin. strong expression in brain tissue. | member of the steroid-thyroid hormone-retinoid receptor superfamily-->may act as a transcription factor.                                                                                                           | 1 | Mutations in this gene have been associated with disorders related to dopaminergic dysfunction, including Parkinson disease, schizophrenia, and manic depression. Misregulation of this gene may be associated with rheumatoid arthritis |
| <b>AK128708</b> | 0  | 157,193,084-157,198,172 | ascites, uterus, vascular                                                                                                                                                                          | no further information                                                                                                                                                                                             | 4 |                                                                                                                                                                                                                                          |
| <b>GPD2</b>     | 16 | 157,291,965-157,442,914 | fetal brain, subthalamic nucleus, superior cervical ganglion, blood, immune cells, skeletal muscle; Trachea, mouth, ganglia, ear                                                                   | glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 -->localizes to the inner mitochondrial membrane and catalyzes the conversion of glycerol-3-phosphate to dihydroxyacetone phosphate, using FAD as a cofactor.                 | 3 | Positive Disease Associations: diabetes, type 2                                                                                                                                                                                          |
| <b>GALNT5</b>   | 10 | 158,114,340-158,167,912 | Ascites, Trachea, mouth, connective tissue, parathyroid                                                                                                                                            | N-acetylgalactosaminyltransferase 5 -->Protein modification; protein glycosylation                                                                                                                                 | 4 | no further information                                                                                                                                                                                                                   |

|               |   |                         |                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |   |                                                                                                                                                                                                          |
|---------------|---|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>ERMN</b>   | 4 | 158,175,126-158,184,146 | highly expressed in adult and fetal brain. expressed at intermediate levels in the lung and liver.                                                                                                                               | plays a role in cytoskeletal rearrangements during the late wrapping and/or compaction phases of myelinogenesis as well as in maintenance and stability of myelin sheath in the adult.                                                                                                                                                                                                                     | 1 | may play an important role in late-stage oligodendroglia maturation, myelin/ranvier node formation during cns development, and in the maintenance and plasticity of related structures in the mature cns |
| <b>CYTIP</b>  | 8 | 158,271,131-158,300,604 | blood, immune cells, salivary gland                                                                                                                                                                                              | This protein is expressed weakly in resting NK and T cells. The encoded protein modulates the activation of ARF genes by CYTH1. This protein interacts with CYTH1 and SNX27 proteins and may act to sequester CYTH1 protein in the cytoplasm                                                                                                                                                               | 3 | By its binding to cytohesin-1 (CYTH1), it modifies activation of ARFs by CYTH1 and its precise function may be to sequester CYTH1 in the cytoplasm                                                       |
| <b>ACVR1C</b> | 8 | 158,383,280-158,485,399 | present in pancreas, heart, colon, small intestine, ovary and the hippocampus, medulla oblongata and putamen of the brain. isoform 1, isoform 2, isoform 3 and isoform 4 are all expressed in the placenta throughout pregnancy. | type I receptor for the TGFB family of signaling molecules. Upon ligand binding, type I receptors phosphorylate cytoplasmic SMAD transcription factors, which then translocate to the nucleus and interact directly with DNA or in complex with other transcription factors                                                                                                                                | 2 | plays a role in cell differentiation, growth arrest and apoptosis                                                                                                                                        |
| <b>ACVR1</b>  | 9 | 158,592,958-158,732,374 | pituitary gland, ear, heart, nerve, kidney                                                                                                                                                                                       | dimeric growth and differentiation factors which belong to the transforming growth factor-beta (TGF-beta) superfamily of structurally related signaling proteins. These receptors are all transmembrane proteins. Type I receptors are essential for signaling--> which signals a particular transcriptional response in concert with activin type II receptors. activate SMAD transcriptional regulators. | 5 | associated with fibrodysplasia ossificans progressive(no ID). May be involved for left-right pattern formation during embryogenesis                                                                      |

|                 |    |                         |                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                         |   |                                                                                                                                  |
|-----------------|----|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>CCDC148</b>  | 6  | 159,144,932-159,313,214 | pons, dorsal root ganglion, temporal lobe, skin, bladder, Trachea, prostate                                                             | Putative uncharacterized protein                                                                                                                                                                                                                                                        | 4 | associated with acute lung injury                                                                                                |
| <b>PKP4</b>     | 16 | 159,313,476-159,537,938 | high expression in brain(corpus callosum, thalamus), spinal cord, blood                                                                 | Plakophilin4-->Members of the p120(ctn)/plakophilin subfamily of Armadillo-like proteins may be a component of desmosomal plaque and other adhesion plaques                                                                                                                             | 2 | is thought to be involved in regulating junctional plaque organization and cadherin function                                     |
| <b>AK126351</b> | 0  | 159,514,849-159,591,514 | ganglia, pituitary gland                                                                                                                | no further information                                                                                                                                                                                                                                                                  | 4 |                                                                                                                                  |
| <b>TANC1</b>    | 25 | 159,825,146-160,089,168 | Thalamus, Hypothalamus, cerebellum peduncles, spinal cord, immune cells, thyroid, uterus, fetal lung, bronchial epithelial cells, ovary | May be a scaffold component in the postsynaptic density                                                                                                                                                                                                                                 | 1 | Subcellular location: Cell junction, synapse, postsynaptic cell membrane, postsynaptic density                                   |
| <b>WDSUB1</b>   | 10 | 160,092,305-160,143,063 | pituitary gland, kidney, lung, adrenal gland, placenta                                                                                  | sterile alpha motif and U-box domain                                                                                                                                                                                                                                                    | 4 | no further information                                                                                                           |
| <b>BAZ2B</b>    | 6  | 160,289,268-160,472,028 | blood, ganglia, pituitary gland, uterus                                                                                                 | may play a role in transcriptional regulation interacting with iswi.                                                                                                                                                                                                                    | 3 | no further information                                                                                                           |
| <b>MARCH7</b>   | 9  | 160,569,010-160,625,083 | blood, immune cells, pituitary gland                                                                                                    | axotrophin-->member of the MARCH family of membrane-bound E3 ubiquitin ligases. MARCH proteins add ubiquitin to target lysines in substrate proteins, thereby signaling their vesicular transport between membrane compartments. PATHWAY: Protein modification; protein ubiquitination. | 3 | MHC class II stabilization at the surface of human dendritic cells is the result of maturation-dependent MARCH I down-regulation |

|                 |    |                         |                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                         |   |                                                                                                                                                                                                             |
|-----------------|----|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>PLA2R1</b>   | 30 | 160,798,012-160,919,121 | temporal lobe, superior cervical ganglion, blood, lymphoblasts, appendix, skeletal muscle; Stanford: present in lung macrophage (at protein level). highly expressed in kidney. also expressed in pancreas, amnion, choriondecidua and placenta | Phospholipase A2 receptor. Exists as both a transmembrane form and a soluble form. The transmembrane receptor may play a role in clearance of phospholipase A2, thereby inhibiting its action.          | 3 | Polymorphisms at this locus have been associated with susceptibility to idiopathic membranous nephropathy(70%). may be involved in responses in proinflammatory cytokine productions during endotoxic shock |
| <b>AK026736</b> | 0  | 160,956,184-160,958,258 | cerebellum peduncles, pons, tonsil, bone marrow, fetal thyroid, liver, bronchial epithelial cells                                                                                                                                               | receptor for fibronectin and cytotactin. internalisation of integrin alpha-v/beta-6 via clathrin-mediated endocytosis promotes carcinoma cell invasion.                                                 | 4 | no further information                                                                                                                                                                                      |
| <b>UPP2</b>     | 9  | 158,851,691-158,992,665 | Predominantly expressed in kidney; temporal lobe, medulla oblongata, ciliary ganglion, uterus, fetal liver                                                                                                                                      | uridine phosphorylase 2-->Catalyzes the reversible phosphorylytic cleavage of uridine and deoxyuridine to uracil and ribose- or deoxyribose-1- phosphate.                                               | 2 | PATHWAY: Pyrimidine metabolism; UMP biosynthesis via salvage pathway; uracil from uridine                                                                                                                   |
| <b>DAPL1</b>    | 4  | 159,651,829-159,672,494 | thyroid, adrenal gland, (1%brain) specificity: Expressed in hair follicle                                                                                                                                                                       | May play a role in the early stages of epithelial differentiation or in apoptosis. may play a role in lysine biosynthesis                                                                               | 3 | no further information                                                                                                                                                                                      |
| <b>RBMS1</b>    | 13 | 161,128,663-161,350,318 | blood, immune cells, uterus, smooth muscle, placenta, fetal lung; Tissue Specificity: highest amounts are found in placenta, lung and heart.                                                                                                    | member of a small family of proteins which bind single stranded DNA/RNA.--> have been implicated in such diverse functions as DNA replication, gene transcription, cell cycle progression and apoptosis | 4 | Variation in the levels of pregnancy-specific beta-1-glycoprotein in maternal serum from chromosomally abnormal pregnancies. Association with Diabetes2                                                     |

|                 |    |                         |                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                         |   |                                                                                                                                      |
|-----------------|----|-------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>CD302</b>    | 6  | 160,625,141-160,654,766 | Expressed in myeloid and B lymphoid cell lines. Isoform 2 and isoform 3 are expressed in malignant Hodgkin's lymphoma cells called Hodgkin's and Reed-Sternberg (HRS) cells. Fetal liver, fetal thyroid, fetal lung                              | C-type lectin receptor involved in cell adhesion and migration, as well as endocytosis and phagocytosis                                 | 3 | no further information                                                                                                               |
| <b>LY75</b>     | 35 | 160,659,869-160,761,262 | Expressed in spleen, thymus, colon and peripheral blood lymphocytes. Detected in myeloid and B lymphoid cell lines. Isoform 2 and isoform 3 are expressed in malignant Hodgkin's lymphoma cells called Hodgkin's and Reed-Sternberg (HRS) cells. | Acts as an endocytic receptor to direct captured antigens from the extracellular space to a specialized antigen- processing compartment | 3 | . Causes reduced proliferation of B-lymphocytes                                                                                      |
| <b>ITGB6</b>    | 15 | 160,958,233-161,056,589 | pons, cerebellum peduncles, liver, bronchial epithelial cells                                                                                                                                                                                    | unknown                                                                                                                                 | 3 | animal model: mice lacking this integrin develop exaggerated inflammation and, as they showed, are protected from pulmonary fibrosis |
| <b>AK027541</b> | 0  | 162,101,250-162,105,241 | parathyroid, ascites, lymph node                                                                                                                                                                                                                 | no further information                                                                                                                  | 4 |                                                                                                                                      |
| <b>PSMD14</b>   | 10 | 162,164,786-162,268,226 | widely expressed. highest levels in heart and skeletal muscle.                                                                                                                                                                                   | component of the 26S proteasome, a multiprotein complex that degrades proteins targeted for destruction by the ubiquitin pathway        | 3 | no further information                                                                                                               |
| <b>BC073897</b> | 0  | 162,196,029-162,196,646 | no further information                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                         | 4 |                                                                                                                                      |

|                |    |                         |                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|----------------|----|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>SLC4A10</b> | 26 | 162,480,845-162,841,785 | especially brain, furthermore pancreas, uterus                                                                                                                                  | small family of sodium-coupled bicarbonate transporters (NCBTs) that regulate the intracellular pH of neurons, the secretion of bicarbonate ions across the choroid plexus, and the pH of the brain extracellular fluid                                                                                                                | 1 | The protein encoded by this gene was initially identified as a sodium-driven chloride bicarbonate exchanger (NCBE) though there is now evidence that its sodium/bicarbonate cotransport activity is independent of any chloride ion countertransport under physiological conditions. 13-year-old girl with moderate mental retardation, progressive cognitive decline, and partial complex epilepsy associated with a de novo balanced translocation, t(2;13)(q24;q31), that interrupted the SLC4A10 gene between exons 2 and 3             |
| <b>FAP</b>     | 8  | 163,027,201-163,100,045 | vascular, skin, muscle, uterus                                                                                                                                                  | involved in the pericellular proteolysis of the extracellular matrix, the migration and invasion of endothelial cells into the ecm. may have a role in tissue remodeling during development and wound healing, and may contribute to invasiveness in malignant cancers                                                                 | 2 | may be involved in the control of fibroblast growth or epithelial-mesenchymal interactions during development, tissue repair, and epithelial carcinogenesis                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| <b>IFIH1</b>   | 16 | 163,123,590-163,175,039 | Widely expressed, at a low level. Expression is detected at slightly highest levels in placenta, pancreas and spleen and at barely levels in detectable brain, testis and lung. | putative RNA helicases-->involving alteration of RNA secondary structure such as translation initiation, nuclear and mitochondrial splicing, and ribosome and spliceosome assembly. are believed to be involved in embryogenesis, spermatogenesis, and cellular growth and division. Involved in innate immune defense against viruses | 3 | candidate genes for type 1 diabetes, Association of IFIH1 and other autoimmunity risk alleles with selective IgA deficiency                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| <b>KCNH7</b>   | 16 | 163,227,917-163,695,240 | ubiquitous(vascular, pancreas), Expressed in prolactin-secreting adenomas                                                                                                       | potassium voltage-gated channel -->regulating neurotransmitter release, heart rate, insulin secretion, neuronal excitability, epithelial electrolyte transport, smooth muscle contraction, and cell volume.                                                                                                                            | 2 | expression in the olfactory bulb, cerebral cortex, hippocampus, hypothalamus, and cerebellum. in the cerebral cortex and in all CA subfields and in the granular cell layer of the dentate gyrus of the hippocampus; In the thalamus, positively labeled neurons were detected in the anterodorsal nucleus with ERG2 riboprobes. Transcripts for ERG1 and, to a lesser degree, also for ERG3, were detected in the basal ganglia and in several brainstem nuclei. All three ERG genes appeared to be expressed in cerebellar Purkinje cells |

|                 |    |                         |                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-----------------|----|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>BC042876</b> | 0  | 163,625,449-163,654,482 | no further information                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 4 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| <b>TANK</b>     | 7  | 162,016,939-162,092,682 | ubiquitous: blood, immune cells, uterus, muscle, fetal liver, lymph node, amygdala        | TRAF family member-->Acts as a regulator of TRAF function by maintaining them in a latent state                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 3 | the protein encoded by this gene can block TRAF2 binding to LMP1, the Epstein-Barr virus transforming protein, and inhibit LMP1-mediated NF-kappa-B activation                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <b>TBR1</b>     | 6  | 162,272,620-162,281,573 | especially brain(90%expression)                                                           | T-box, brain, 1-->T-box genes encode transcription factors involved in the regulation of developmental processes. A similar protein has been disrupted in mice and shown to be critical for early cortical development, and causes loss of projection neurons in the olfactory bulbs and olfactory cortex. Probable transcriptional regulator involved in developmental processes. TBR1 is required for normal brain development. | 1 | It is expressed in postmitotic cells in the forebrain with onset during embryogenesis and continues to be expressed in the adult brain. Expression is 10-fold more abundant in embryonic than in adult tissue; Animal model: The cortex of neonatal mutants was approximately normal size, but early-born neurons, which guide early neuronal migrations and axonal projections, showed molecular and functional defects. Early-born cells formed a preplate but did not express markers of Cajal-Retzius, subplate, or layer 6 neurons. Cajal-Retzius cells expressed decreased levels of reelin, resulting in a reeler-like cortical migration disorder. Impaired subplate differentiation was associated with ectopic projection of thalamocortical fibers into the basal telencephalon. Layer 6 defects contributed to errors in the thalamocortical, corticothalamic, and callosal projections. Markers of later-born cortical layers were relatively normal, and other properties of cortical neurons, such as neurotransmitter expression, cell death, and neuronal morphology, were mostly unaffected |
| <b>DPP4</b>     | 26 | 162,848,757-162,931,052 | immune cells, prostate, smooth muscle, cardiac myocytes, kidney, placenta, salivary gland | dipeptidylpeptidase IV-->exopeptidase that cleaves X-proline dipeptides from the N-terminus of polypeptides. pericellular proteolysis of the extracellular matrix, the migration and invasion of endothelial cells into the ecm. may be involved in the promotion of lymphatic endothelial cells adhesion, migration and tube formation. when overexpressed, enhanced cell proliferation                                          | 3 | Positive Disease Associations: periodontitis                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

|               |    |                         |                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |   |                                                                                                                                                                           |
|---------------|----|-------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>GCG</b>    | 5  | 162,999,389-163,008,757 | Glucagon: A cells of the islets of Langerhans. GLP-1, GLP-2, oxyntomodulin and glicentin: enteroendocrine cells throughout the gastrointestinal tract. GLP1 and GLP2: selected neurons in the brain. | Glucagon preproprotein-->preproprotein that is cleaved into four distinct mature peptides: Glucagon, GLP-1 und 2, Oxyntomodulin, Glicentin                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 3 | no further information                                                                                                                                                    |
| <b>GCA</b>    | 8  | 163,200,583-163,219,146 | blood, monocytes, neutrophils, macrophages. highly expressed in bone marrow.                                                                                                                         | grancalcin-->calcium-binding protein abundant in neutrophils and macrophages. Grancalcin localization is dependent upon calcium and magnesium                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 3 | may play a role in the adhesion of neutrophils to fibronectin. may play a role in the formation of focal adhesions.                                                       |
| <b>FIGN</b>   | 2  | 164,464,118-164,592,513 | bladder, liver, vascular, ubiquitous                                                                                                                                                                 | new member of the 'meiotic' or subfamily-7, group of ATPases associated with diverse cellular activities, the AAA proteins=molecular chaperones that facilitate a variety of functions, including membrane fusion, proteolysis, peroxisome biogenesis, endosome sorting, and meiotic spindle formation                                                                                                                        | 2 | insufficient growth of the retinal neural epithelium, and lower penetrance skeletal abnormalities, including pelvic girdle dysgenesis, skull bone fusions and polydactyly |
| <b>GRB14</b>  | 14 | 165,349,333-165,478,360 | fetal brain, high levels: liver, kidney, pancreas, testis, ovary, heart and skeletal muscle. Moderate expression: small intestine, colon, peripheral blood leukocytes, brain, and placenta           | adaptor proteins that are known to interact with a number of receptor tyrosine kinases and signaling molecules-->growth factor receptor-binding protein that interacts with insulin receptors and insulin-like growth-factor receptors. Inhibitory effect on receptor tyrosine kinase signaling and, in particular, on insulin receptor signaling. may play a role in signaling pathways that regulate growth and metabolism. | 3 | breast cancer cell lines and correlated with estrogen receptor positivity. GRB14 expression was also observed in human prostate cancer cell lines                         |
| <b>COBLL1</b> | 14 | 165,541,260-165,697,928 | immune cells, placenta, prostate; high: lung, liver, kidney, pancreas, ovary, spinal cord, brain, fetal liver, and all specific                                                                      | no further information                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 4 |                                                                                                                                                                           |

|                 |   |                         |                                                                                                            |                                                           |                          |
|-----------------|---|-------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|--------------------------|
|                 |   |                         | adult brain regions examined.<br>Intermediate:skeletal muscle, spleen, testis, and fetal brain             |                                                           |                          |
| <b>KIAA0977</b> | 0 | 165,557,032-165,698,650 | no further information                                                                                     | 4                                                         |                          |
| <b>SLC38A11</b> | 9 | 165,754,812-165,812,035 | high: pharynx, bone marrow;<br>intermediate:prostate, spleen, eye, embryonic tissue, skin, pancreas, brain | Putative sodium-coupled neutral amino acid transporter 11 | 4 no further information |

c.e. = coding exons, pri.= prioritization

Region: Chr2:171,7M - 174,6M

| name            | c.e. | position                | expression                                                                                        | function                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | pri. | Comment                                                                                  |
|-----------------|------|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>GORASP2</b>  | 10   | 171,785,711-171,823,639 | vascular, spinal cord, lymphocytes, ubiquitous                                                    | golgi reassembly stacking protein 2-->may play a role in the stacking of Golgi cisternae and Golgi ribbon formation, as well as Golgi fragmentation during apoptosis or mitosis. also plays a role in the intracellular transport of transforming growth factor alpha and may function as a molecular chaperone | 2    | Depletion disrupts the Golgi apparatus and causes a block in secretory protein transport |
| <b>TLK1</b>     | 20   | 171,847,333-172,087,824 | ubiquitous; pineal gland, nerve, esophagus, bone marrow, lymph node, salivary gland; High: Testis | Tousled-like kinase=nuclear serine/threonine kinases that are potentially involved in the regulation of chromatin assembly-->cell regulation; DNA-Reparation                                                                                                                                                    | 3    | no further information                                                                   |
| <b>FLJ13984</b> | 9    | 172,173,915-172,290,525 | immune cells, esophagus, bone marrow, bone, liver, heart                                          | moderately similar to Methyltransferase-like protein 2                                                                                                                                                                                                                                                          | 3    | no further information                                                                   |

|                 |    |                         |                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-----------------|----|-------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>METTL8</b>   | 10 | 172,173,915-172,291,312 | immune cells, blood, esophagus, bone marrow, bone, liver, heart                                                  | methyltransferase like 8                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 3 | no further information                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| <b>C2ORF37</b>  | 0  | 172,290,727-172,341,560 | ubiquitously expressed.                                                                                          | nuclear transmembrane protein that associates with cullin 4A/damaged DNA binding protein 1 ubiquitin ligase complex                                                                                                                                                                                                                                                                        | 2 | Mutations in this gene are associated with AR Woodhouse-Sakati syndrome(hypogonadism, partial alopecia, diabetes mellitus, mental retardation, and deafness)-->Middle eastern families                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| <b>CYBRD1</b>   | 4  | 172,378,866-172,414,644 | highly expressed:duodenal brush border membrane, erythrocyte membranes, Also expressed in respiratory epithelium | Ferric-chelate reductase that reduces Fe(3+) to Fe(2+)-->member of the cytochrome b(561) family that encodes an iron-regulated protein.It has ferric reductase activity and is believed to play a physiological role in dietary iron absorption.May be involved in extracellular ascorbate recycling in erythrocyte membranes. May also act as a ferrireductase in airway epithelial cells | 3 | Defects in CYBRD1 may be a cause of primary hereditary hemochromatosis (HFE)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| <b>DYNC1I2</b>  | 17 | 172,543,982-172,604,919 | fetal brain, thalamus, hypothalamus, vascular                                                                    | dynein, cytoplasmic 1, intermediate chain 2-->The intermediate chains seem to help dynein bind to dynactin 150 kDa component-->regulate dynein function.                                                                                                                                                                                                                                   | 2 | specific intermediate chain isoforms are utilized during axon growth.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| <b>SLC25A12</b> | 18 | 172,639,915-172,750,813 | High levels in heart and skeletal muscle, low in brain and very low in kidney                                    | Calcium-dependent mitochondrial aspartate and glutamate carrier. May have a function in the urea cycle                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 1 | Positive Disease Associations: autism; SLC25A12 expression is associated with neurite outgrowth and is upregulated in the prefrontal cortex of autistic subjects; global cerebral hypomyelination-->severe psychomotor retardation, hypotonia, and hypomyelination of the central nervous system are substrates for the TIMM8A TIMM13(x-Chromosom) complex:cause Mohr-Tranebjaerg(with ID) syndrome, Jensen syndrome(sensorineural hearing loss with onset in infancy, followed in adolescence by progressive optic nerve atrophy with loss of vision and in adulthood by progressive dementia) |

|              |    |                          |                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|--------------|----|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>HAT1</b>  | 11 | 172,778,935-172,848,599  | blood, immune cells,                                                                                                         | histone acetyltransferase--> involved in the rapid acetylation of newly synthesized cytoplasmic histones.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 3 | Histone acetylation, particularly of histone H4, plays an important role in replication-dependent chromatin assembly. May play a role in telomeric silencing                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>MAP1D</b> | 10 | 172,864,804-172,945,586) | Overexpressed in colon cancer cell lines and colon tumors; ganglia, nerv, blood                                              | methionine aminopeptidase 1D precursor --> Removes the amino-terminal methionine from nascent proteins.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 3 | May play a role in colon tumorigenesis.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| <b>DLX1</b>  | 2  | 172,950,208-172,954,399  | whole brain(97.54%), especially fetal brain, occipital lobe, cingulate cortex, amygdala, hypothalamus                        | member of a homeobox transcription factor gene(family similar to the Drosophila distal-less gene.) localized to the nucleus where it may function as a transcriptional regulator of signals from multiple TGF-(Garavaglia <i>et al.</i> ) superfamily members. --> may play a role in the control of craniofacial patterning and the differentiation and survival of inhibitory neurons in the forebrain. -->essential for the production of forebrain GABAergic interneurons during embryonic development + may be involved in the early development of diencephalic subdivisions | 1 | mouse studies of Dlx gene family loss- and gain-of-function mutations and the role of Dlx homeobox genes in craniofacial, limb, and bone development.; Pubmed: Delayed interneuron maturation may lead to interneuron hyperexcitability, followed by a compensatory reduction in the strength of excitatory transmission onto interneurons. This reduced excitation onto surviving interneurons, coupled with the loss of a significant fraction of GABAergic inputs to excitatory neurons starting at P30, may underlie cortical dysrhythmia |
| <b>DLX2</b>  | 3  | 172,964,167-172,967,478  | no further information                                                                                                       | located in a tail-to-tail configuration with another member of the gene family-->same function like DLX1:regulation of forebrain development                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 2 | associated with Axenfeld-Rieger syndrome (+MR)=AD, prominent and anteriorly displaced Schwalbe line, iris stromal hypoplasia, atrial septal defect and sensorineural hearing loss, glaucoma                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <b>ITGA6</b> | 25 | 173,292,314-173,371,181) | predominantly expressed by epithelia, isoforms expressed in heart, kidney, placenta, colon, duodenum, myoblasts and myotubes | Integrin alpha chain alpha 6-->participate in cell adhesion as well as cell-surface mediated signalling.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 3 | cause of epidermolysis bullosa letalis with pyloric atresia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <b>PDK1</b>  | 11 | 173,420,779-173,463,860  | expressed predominantly in the heart. Furthermore brain(parietal lobe), blood, immune cells                                  | pyruvate dehydrogenase kinase 1 precursor-->catalyzes the oxidative decarboxylation                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 3 | no further information                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

|                 |    |                         |                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                             |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|-----------------|----|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>LOC91149</b> | 0  | 173,587,920-173,600,934 | no further information                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                             | 4 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| <b>RAPGEF4</b>  | 31 | 173,600,525-173,917,618 | Predominantly expressed in brain(especially prefrontal cortex, amygdala) and adrenal gland. Isoform 2 is expressed in liver.                                    | Guanine nucleotide exchange factor (GEF) for RAP1A, RAP1B and RAP2A small GTPases that is activated by binding cAMP.                                                                                        | 1 | Rare missense mutations in the EPAC2 (also known as RAPGEF4) gene, previously found in individuals with autism, affected basal and neuroligin-stimulated GEF activity, dendritic Rap signaling, synaptic protein distribution and spine morphology. Thus, we identify a previously unknown mechanism that promotes dynamic remodeling and depression of spiny synapses, disruption of which may contribute to some aspects of disease. |
| <b>ZAK</b>      | 19 | 173,940,565-174,132,736 | 80%brain,                                                                                                                                                       | member of the MAPKKK family of signal transduction molecules-->mediates gamma radiation signaling leading to cell cycle arrest-->cell cycle checkpoint regulation in cells. also has pro-apoptotic activity | 2 | positive mediator of cell hypertrophy in cultured rat cardiac myocytes,elevated expression of atrial natriuretic factor and increased organization of actin fibers                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>BC040565</b> | 0  | 174,062,443-174,146,581 | no further information                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                             | 4 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| <b>CDCA7</b>    | 10 | 174,219,561-174,233,718 | ubiquitous with higher level in thymus and small intestine. overexpressed in a large number of tumors, in blood from patients with aml and in cml blast crisis. | c-Myc responsive gene, and behaves as a direct c-Myc target gene.                                                                                                                                           | 3 | Overexpression of this gene--> induces anchorage-independent growth and clonogenicity in lymphoblastoid cells. may play a role as transcriptional regulator.                                                                                                                                                                                                                                                                           |

c.e. = coding exons, pri.= prioritization

Region: Chr4:3,4M - 4,4M

| name         | c.e. | position            | expression                               | function                                                                                                                                                                                  | pri. | Comment                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|--------------|------|---------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>RGS12</b> | 17   | 3,315,874-3,441,638 | isoform 3 is brain specific., ubiquitous | member of the 'regulator of G protein signaling' (RGS) gene family-->may function as a GTPase-activating protein+transcriptional repressor. This protein may play a role in tumorigenesis | 1    | RGS12 associates with the nerve growth factor (NGF) receptor tyrosine kinase TrkA, . RGS12 is required for NGF-mediated neurite outgrowth siRNA-mediated knockdown of RGS12 expression also inhibits NGF-induced axonal growth in dissociated cultures of primary dorsal root ganglia neurons. These data suggest that |

|                  |    |                     |                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                              |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|------------------|----|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  |    |                     |                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                              |   | RGS12 may play a critical, and receptor-selective, role in coordinating Ras-dependent signals that are required for promoting and/or maintaining neuronal differentiation.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| <b>HGFAC</b>     | 14 | 3,443,726-3,451,211 | liver                                                                                                                             | serine protease that converts hepatocyte growth factor(HGF) to the active form downstream of tyrosine kinase 7                                                                                                               | 3 | no further information                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| <b>DOK7</b>      | 7  | 3,465,033-3,496,208 | preferentially expressed in skeletal muscle and heart present in thigh muscle, diaphragm and heart but not in the liver or spleen | -->neuromuscular synaptogenesis<br>-->aneural activation of muscle-specific receptor kinase, which is required for postsynaptic differentiation, and in the subsequent clustering of the acetylcholine receptor in myotubes. | 2 | Mutations in this gene are a cause of familial limb-girdle myasthenia autosomal recessive(=congenital myasthenic syndrome type 1B)--1mutation                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| <b>DQ589974</b>  | 0  | 3,510,861-3,512,749 | no further information                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                              | 4 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>LRPAP1</b>    | 8  | 3,514,290-3,534,224 | caudate nucleus, blood, immune cells, blood, placenta                                                                             | low density lipoprotein receptor-related protein--> Interacts with LRP1/alpha-2-macroglobulin receptor and glycoprotein 330                                                                                                  | 2 | Positive Disease Associations: Alzheimer's Disease , gallstones , myocardial infarct , myocardial infarction                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| <b>AX747702</b>  | 0  | 3,578,596-3,592,166 | no further information                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                              | 4 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>BC131584</b>  | 0  | 3,578,596-3,592,438 | no further information                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                              | 4 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>BC042381</b>  | 0  | 3,675,321-3,679,582 | no further information                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                              | 4 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>ADRA2C</b>    | 1  | 3,768,296-3,770,251 | immune cells, uterus                                                                                                              | alpha-2C-adrenergic receptor--> G protein-coupled receptor superfamily.--> have a critical role in regulating neurotransmitter release from sympathetic nerves and from adrenergic neurons in the central nervous system     | 2 | mouse studies revealed: required for normal presynaptic control of transmitter release from sympathetic nerves in the heart and from central noradrenergic neurons. The alpha2A subtype inhibited transmitter release at high stimulation frequencies, whereas the alpha2C subtype modulated neurotransmission at lower levels of nerve activity. Positive Disease Associations: adrenomedullary hormone activity; sympathetic nervous function , heart failure, left ventricular ejection fraction |
| <b>DQ584669</b>  | 0  | 3,941,973-3,941,998 | no further information                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                              | 4 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>LOC348926</b> | 0  | 3,943,670-3,957,148 | no further information                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                              | 4 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>BC042823</b>  | 0  | 4,034,897-4,076,782 | no further information                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                              | 4 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>OTOP1</b>     | 6  | 4,190,530-4,228,621 | ubiquitous(intermediate expression globus pallidus)                                                                               | Inhibits P2Y purinoceptors. Modulates calcium homeostasis and influx of calcium                                                                                                                                              | 3 | Required for normal formation of otoconia in the inner ear.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |

| in response to extracellular ATP |   |                     |                                                                                           |                                                                                                                                |   |                                                                                                            |
|----------------------------------|---|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>TMEM128</b>                   | 4 | 4,237,269-4,249,934 | ubiquitous(intermediate expression: whole brain, hypothalamus, immune cells, uterus, lung | transmembrane protein                                                                                                          | 4 | no further information                                                                                     |
| <b>LYAR</b>                      | 8 | 4,269,431-4,291,896 | blood, immune cells, testis, YAR mRNA was not detected in brain                           | important nucleolar protein for control of self-renewal and differentiation in embryonic stem cells                            | 3 | no further information                                                                                     |
| <b>ZNF509</b>                    | 7 | 4,291,924-4,323,512 | ubiquitous                                                                                | no further information                                                                                                         | 4 |                                                                                                            |
| <b>CR596502</b>                  | 0 | 4,323,689-4,335,908 | no further information                                                                    |                                                                                                                                | 4 |                                                                                                            |
| <b>D4S234E</b>                   | 4 | 4,349,869-4,420,784 | only in brain, all regions(neuronal cells)                                                | brain neuron cytoplasmic protein, p53-responsive gene-->accumulated in the ER and induces apoptosis in response to DNA damage. | 2 | within the Huntington disease locus.                                                                       |
| <b>NSG1</b>                      | 3 | 4,387,584-4,419,654 | especially in brain(80%), placenta, pituitary gland                                       | moderately similar to Neuron-specific protein family member 1                                                                  | 2 | Mutations in this region(=EVC2 Gen) cause Weyers acrofacial dysostosis, Ellis-van Creveld syndrome (No ID) |

c.e. = coding exons, pri.= prioritization

### Region: Chr4:181,0M - 184,6M

| name            | c.e. | position                | expression                                                                                                                                                                                      | function                                     | pri. | Comment                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-----------------|------|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>AF088005</b> | 0    | 181,985,245-182,080,302 | no further information                                                                                                                                                                          |                                              | 4    |                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| <b>AK056196</b> | 0    | 182,896,309-183,006,289 | no further information                                                                                                                                                                          |                                              | 4    |                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| <b>MGC45800</b> | 0    | 183,060,159-183,065,668 | no further information                                                                                                                                                                          |                                              | 4    |                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| <b>ODZ3</b>     | 27   | 183,245,099-183,724,177 | Expressed in adult and fetal brain(high in brain, with highest levels in amygdala and caudate nucleus, followed by thalamus and subthalamic nucleus), slightly lower levels in testis and ovary | May function as a cellular signal transducer | 2    | highly expressed along axonal tracts of projection neurons of the developing visual pathway. Overexpression demonstrated that Ten_m3 promotes homophilic adhesion and neurite outgrowth in vivo. This suggests an important role for Ten_m3 in the development of the visual pathway. |

|                 |    |                         |                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |   |                                                                                      |
|-----------------|----|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|--------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>DCTD</b>     | 5  | 183,811,245-183,838,630 | blood, muscle, immune cells, lung                                                             | catalyzes the deamination of dCMP to dUMP                                                                                                                                                                                                                                                                  | 3 | no further information                                                               |
| <b>FAM92A3</b>  | 0  | 183,958,818-183,961,271 | no further information                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |   | 4                                                                                    |
| <b>C4orf38</b>  | 1  | 184,018,174-184,020,352 | blood, immune cells                                                                           | no further information                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 4 |                                                                                      |
| <b>BOMB</b>     | 0  | 84,124,669-184,241,927  | no further information                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |   | 4                                                                                    |
| <b>WWC2</b>     | 23 | 184,020,463-184,241,927 | thyroid, uterus, lung, testis, prefrontal cortex                                              | no further information                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 4 |                                                                                      |
| <b>BX537950</b> | 0  | 184,154,785-184,161,787 | no further information                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |   | 4                                                                                    |
| <b>CDKN2AIP</b> | 3  | 184,365,789-184,369,049 | Ubiquitously expressed(esp blood, immune cells)                                               | CDKN2A interacting protein-->Activates TP53/p53 by CDKN2A-dependent and CDKN2A- independent pathways                                                                                                                                                                                                       | 3 | plays a role in tumorigenesis                                                        |
| <b>ING2</b>     | 2  | 184,426,220-184,432,249 | blood, widely expressed. higher expressed in colon-cancer tumor than in normal colon tissues. | inhibitor of growth family-->modulate the activity of histone acetyltransferase (HAT) and histone deacetylase (HDAC) complexes and function in DNA repair and apoptosis.                                                                                                                                   | 3 | probably involved in deacetylation of nucleosomal histones. tumor suppressor protein |
| <b>CLDN22</b>   | 1  | 184,239,220-184,241,927 | Ubiquitous                                                                                    | claudin 22--> integral membrane proteins and components of tight junction strands and also play critical roles in maintaining cell polarity and signal transductions -->major role in tight junction-specific obliteration of the intercellular space, through calcium- independent cell-adhesion activity | 3 | no further information                                                               |
| <b>BC038563</b> | 0  | 184,415,891-184,425,668 | no further information                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |   | 4                                                                                    |

c.e. = coding exons, pri.= prioritization

Region: Chr6:29,2M - 29,3M

| name            | c.e. | position                  | Expression                                               | function                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | pri. | Comment                                                                                                                                                                                 |
|-----------------|------|---------------------------|----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>OR14J1</b>   | 1    | 29,274,467-<br>29,275,431 |                                                          | olfactory receptor                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 5    |                                                                                                                                                                                         |
| <b>OR5V1</b>    | 1    | 29,323,008-<br>29,324,054 |                                                          | olfactory receptor                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 5    |                                                                                                                                                                                         |
| <b>OR12D3</b>   | 1    | 29,341,201-<br>29,343,068 |                                                          | olfactory receptor                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 5    |                                                                                                                                                                                         |
| <b>OR12D2</b>   | 1    | 29,364,416-<br>29,365,447 |                                                          | olfactory receptor                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 5    |                                                                                                                                                                                         |
| <b>OR11A1</b>   | 1    | 29,393,282-<br>29,395,509 |                                                          | olfactory receptor                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 5    |                                                                                                                                                                                         |
| <b>OR10C1</b>   | 1    | 29,407,793-<br>29,408,730 |                                                          | olfactory receptor                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 5    |                                                                                                                                                                                         |
| <b>OR2H1</b>    | 1    | 29,426,230-<br>29,432,097 |                                                          | olfactory receptor                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 5    |                                                                                                                                                                                         |
| <b>6M1-18</b>   | 0    | 29,395,419-<br>29,424,848 |                                                          | mRNA for olfactory receptor                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 5    |                                                                                                                                                                                         |
| <b>MAS1L</b>    | 1    | 29,454,545-<br>29,455,679 | no further information                                   | family of G protein-coupled receptors (GPCRs) related to the MAS1 oncogene. expressed in specific subpopulations of sensory neurons that detect painful stimuli. Some MRGs could be specifically activated in neuropeptides such as NPFF and NPAF, which are analgesic in vivo.may regulate nociceptor function and/or development, including the sensation or modulation of pain. | 2    | 6p21.2p22.1 duplication in a boy with epilepsy and developmental delay(includes genes:GABBR1, BRD2 and GRM4)                                                                            |
| <b>AK097713</b> | 0    | 29,497,197-<br>29,501,344 | no further information                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 4    |                                                                                                                                                                                         |
| <b>GABBR1</b>   | 18   | 29,570,006-<br>29,596,005 | Brain                                                    | GABA B receptor 1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 2    | Positive Disease Associations: schizophrenia, sleep apnea. 6-years-old boy with psychomotor retardation, mild dysmorphic features and behavioral disturbances associated with epilepsy. |
| <b>SNORD32B</b> | 0    | 29,550,029-<br>29,550,104 | no further information                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 4    |                                                                                                                                                                                         |
| <b>UBD</b>      | 2    | 29,523,390-<br>29,527,702 | thymus, tonsil, lymphoblasts, lymphnode, salivary gland, | stimulates TNF-alpha and interferon-gamma                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 3    | no further information                                                                                                                                                                  |

| pancreatic islets, fetal liver |   |                       |                        |                                                                                                    |   |                                                                                                                                                                                                             |
|--------------------------------|---|-----------------------|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|---|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>MOG</b>                     | 8 | 29,624,809-29,640,147 | Brain                  | may be involved in completion and maintenance of the myelin sheath and in cell-cell communication. | 1 | Target antigen in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. Developmental pattern of MOG expression in the rat central nervous system coincides with the late stages of myelination |
| <b>ZFP57</b>                   | 4 | 29,640,171-29,644,931 | no further information |                                                                                                    | 4 |                                                                                                                                                                                                             |
| <b>DKFZp762B16.2</b>           | 0 | 29,694,378-29,716,826 | no further information |                                                                                                    | 4 |                                                                                                                                                                                                             |
| <b>IFITM4P</b>                 | 0 | 29,718,585-29,718,925 | no further information |                                                                                                    | 4 |                                                                                                                                                                                                             |
| <b>HLA-F</b>                   | 7 | 29,691,117-29,695,072 | no further information | major histocompatibility complex                                                                   | 4 |                                                                                                                                                                                                             |
| <b>LOC554223</b>               | 4 | 29,759,100-29,760,483 | no further information | major histocompatibility complex                                                                   | 4 |                                                                                                                                                                                                             |
| <b>HCG4</b>                    | 0 | 29,758,809-29,760,850 | no further information |                                                                                                    | 4 |                                                                                                                                                                                                             |
| <b>BC068238</b>                | 0 | 29,760,375-29,763,298 | no further information |                                                                                                    | 4 |                                                                                                                                                                                                             |
| <b>HLA-G</b>                   | 6 | 29,794,756-29,798,899 | no further information | major histocompatibility complex                                                                   | 4 |                                                                                                                                                                                                             |
| <b>HLA-G2.2</b>                | 5 | 29,795,613-29,798,899 | no further information | major histocompatibility complex                                                                   | 4 |                                                                                                                                                                                                             |
| <b>HLA-G3</b>                  | 4 | 29,795,613-29,798,899 | no further information | major histocompatibility complex                                                                   | 4 |                                                                                                                                                                                                             |
| <b>HLA-H</b>                   | 0 | 29,855,529-29,858,262 | no further information | major histocompatibility complex                                                                   | 4 |                                                                                                                                                                                                             |
| <b>HLA-A</b>                   | 8 | 29,910,331-29,913,653 | no further information | major histocompatibility complex                                                                   | 4 |                                                                                                                                                                                                             |
| <b>HCG4P6</b>                  | 0 | 29,892,369-29,893,428 | no further information |                                                                                                    | 4 |                                                                                                                                                                                                             |
| <b>BC035647</b>                | 0 | 29,894,106-29,897,502 | no further information |                                                                                                    | 4 |                                                                                                                                                                                                             |
| <b>HCG2P7</b>                  | 0 | 29,866,808-29,870,429 | no further information |                                                                                                    | 4 |                                                                                                                                                                                                             |
| <b>HCG9</b>                    | 0 | 29,942,892-29,946,169 | no further information |                                                                                                    | 4 |                                                                                                                                                                                                             |
| <b>HLA-F</b>                   | 0 | 29,974,217-           | no further information | major histocompatibility complex                                                                   | 4 |                                                                                                                                                                                                             |

|                   |   |                           |                                                |                                                                                                                                                                                                                                 |   |                                                                                                        |
|-------------------|---|---------------------------|------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                   |   | 29,977,731                |                                                |                                                                                                                                                                                                                                 |   |                                                                                                        |
| <b>UNQ6501</b>    | 0 | 29,979,875-<br>29,981,277 | no further information                         |                                                                                                                                                                                                                                 | 4 |                                                                                                        |
| <b>NCRNA00171</b> | 2 | 30,003,207-<br>30,029,417 | no further information                         |                                                                                                                                                                                                                                 | 4 |                                                                                                        |
| <b>BC035647</b>   | 0 | 29,894,106-<br>29,897,502 | no further information                         |                                                                                                                                                                                                                                 | 4 |                                                                                                        |
| <b>ZNRD1</b>      | 4 | 30,029,036-<br>30,032,685 | no further information                         | 1 of several genes in the HLA-A/HLA-F region                                                                                                                                                                                    | 4 |                                                                                                        |
| <b>PPP1R11</b>    | 3 | 30,034,932-<br>30,038,106 | Ubiquitous                                     | specific inhibitor of protein phosphatase-1 (PP1) with a differential sensitivity toward the metal-independent and metal-dependent forms of PP1. The gene is located within the major histocompatibility complex class I region | 3 | no further information                                                                                 |
| <b>RNF39</b>      | 4 | 30,038,043-<br>30,043,628 | Brain                                          | protein that plays a role in an early phase of synaptic plasticity                                                                                                                                                              | 1 | no further information                                                                                 |
| <b>TRIM31</b>     | 9 | 30,070,674-<br>30,080,867 | no further information                         | protein localizes to both the cytoplasm and the nucleus. Its function has not been identified                                                                                                                                   | 4 |                                                                                                        |
| <b>DQ587154</b>   | 1 | 30,093,187-<br>30,095,185 | no further information                         |                                                                                                                                                                                                                                 | 4 |                                                                                                        |
| <b>TRIM40</b>     | 5 | 30,104,510-<br>30,116,512 | highly expressed in the gastrointestinal tract | promotes neddylation of IKK and is downregulated in gastrointestinal cancers                                                                                                                                                    | 3 | no further information                                                                                 |
| <b>TRIM10</b>     | 8 | 30,119,723-<br>30,128,711 | Ubiquitous                                     | member of the tripartite motif (TRIM) family. The TRIM motif includes three zinc-binding domains, a RING, a B-box type 1 and a B-box type 2, and a coiled-coil region.                                                          | 3 | Studies in mice suggest that this protein plays a role in terminal differentiation of erythroid cells. |
| <b>TRIM15</b>     | 7 | 30,130,983-<br>30,140,466 | Ubiquitous                                     | member of the tripartite motif (TRIM) family. The TRIM motif includes three zinc-binding domains, a RING, a B-box                                                                                                               | 3 |                                                                                                        |

|                                                           |    |                       |                        |                                                                                                                                                                                                                                |   |                                                                         |
|-----------------------------------------------------------|----|-----------------------|------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|-------------------------------------------------------------------------|
| <b>TRIM26</b>                                             | 10 | 30,152,234-30,181,153 | Ubiquitous             | type 1 and a B-box type 2, and a coiled-coil region.<br>member of the tripartite motif (TRIM) family. The TRIM motif includes three zinc-binding domains, a RING, a B-box type 1 and a B-box type 2, and a coiled-coil region. | 3 | The RING domain suggests that the protein may have DNA-binding activity |
| <b>HLA-B</b><br>c.e. = coding exons, pri.= prioritization | 7  | 30,227,339-30,234,728 | no further information | major histocompatibility complex                                                                                                                                                                                               | 4 |                                                                         |

Region: Chr6:56,9M - 69,2M

| name            | c.e. | position              | Expression                            | function                                                                                                                 | pri. | Comment                |
|-----------------|------|-----------------------|---------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|------------------------|
| <b>BEND6</b>    | 5    | 56,819,773-56,892,138 | no further information                | BEN domain containing                                                                                                    | 4    |                        |
| <b>KIAA1586</b> | 4    | 56,911,384-56,920,021 | blood, liver, uterus                  | nucleic acid binding                                                                                                     | 4    | no further information |
| <b>ZN451</b>    | 14   | 56,954,828-57,035,098 | blood, immune cells,                  | may be involved in transcriptional regulation. coactivator for steroid receptors                                         | 3    |                        |
| <b>KIAA0576</b> | 0    | 56,956,236-56,967,91  | no further information                |                                                                                                                          | 4    |                        |
| <b>KIAA1702</b> | 0    | 56,965,019-56,969,401 | no further information                |                                                                                                                          | 4    |                        |
| <b>BC032020</b> | 0    | 56,979,709-57,037,011 | no further information                |                                                                                                                          | 4    |                        |
| <b>BAG2</b>     | 3    | 57,037,104-57,050,010 | immune cells, uterus, prostate, ovary | BCL2-associated athanogene-->compete with Hip for binding to the Hsc70/Hsp70 ATPase domain and promote substrate release | 3    |                        |

|                                                                                   |    |                       |                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                  |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| -->Inhibits the chaperone activity of HSP70/HSC70 by promoting substrate release. |    |                       |                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                  |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>RAB23</b>                                                                      | 6  | 57,053,591-57,086,257 | ubiquitous, esp. Uterus, thyroid, blood, thalamus, bronchial epithelial cells           | Ras-related protein-->may be involved in small GTPase mediated signal transduction and intracellular protein transportation                                                                                      | 2 | Mutations cause opposing transformations in neural cell fate: Shh mutant embryos lack ventral cell types throughout the spinal cord, whereas opb mutant embryos lack dorsal cell types specifically in the caudal spinal cord.<br>15 independent families with Carpenter syndrome(mild MR) identified 5 different mutations in the RAB23 gene Carpenter Syndrome(acrocephaly, peculiar facies, brachydactyly, and syndactyly in the hands, and preaxial polydactyly, syndactyly of the toes, variable severity of craniosynostosis. In older patients obesity, mental retardation, and hypogonadism) |
| <b>CR606171</b>                                                                   | 0  | 57,125,324-57,128,144 | no further information                                                                  |                                                                                                                                                                                                                  | 4 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>PRIM2</b>                                                                      | 14 | 182,422-57,513,375    | 93%brain, blood, immune cells, ciliary ganglion, prostate                               | DNA primase polypeptide (no further information)                                                                                                                                                                 | 2 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>DQ5877631</b>                                                                  | 0  | 58,264,385-58,264,413 | no further information                                                                  |                                                                                                                                                                                                                  | 4 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>DQ596042</b>                                                                   | 0  | 58,264,404-58,264,435 | no further information                                                                  |                                                                                                                                                                                                                  | 4 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>GUSBL2</b>                                                                     | 0  | 58,272,361-58,287,724 | no further information                                                                  |                                                                                                                                                                                                                  | 4 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>KHDRBS2</b>                                                                    | 9  | 62,389,865-62,996,100 | brain: esp fetal brain, prefrontal cortex, amygdala, subthalamic nucleus, blood, muscle | RNA-binding protein that plays a role in the regulation of alternative splicing and influences mRNA splice site selection and exon inclusion. May function as an adapter protein for Src kinases during mitosis. | 2 | no further information                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |

|                  |    |                       |                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                       |   |                                                                                                                                  |
|------------------|----|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>PTP4A1</b>    | 5  | 64,281,920-64,293,488 | fetal brain, adrenal cortex, pancreas, muscle, lung, liver                                                   | protein tyrosine phosphatase type -->regulatory roles in a variety of cellular processes. Overexpression conferred a transformed phenotype, which implicated its role in the tumorigenesis.affects cell motility and tumor metastasis | 3 | Studies in rat suggested that this gene may be an immediate-early gene in mitogen-stimulated cells                               |
| <b>LGSN</b>      | 5  | 63,985,857-64,029,88  | fetal brain, cingulate cortex, sup.cerv. Ganglion, blood, appendix, heart, muscle, bronchial epithelial cell | lensin, lens protein with glutamine synthetase--> pseudo-glutamine synthetase because it has no glutamine synthesis activity and may function as a chaperone protein.                                                                 | 3 | This protein is localized to the lens and may be associated with cataract disease                                                |
| <b>PHF3</b>      | 15 | 64,356,432-64,424,405 | Ubiquitous.                                                                                                  | PHD finger protein                                                                                                                                                                                                                    | 3 | Expression is significantly reduced or lost in glioblastomas, glioblastoma cell lines, anaplastic astrocytomas, and astrocytomas |
| <b>EYS</b>       | 40 | 64,429,876-66,417,118 | Retina                                                                                                       | multiple epidermal growth factor (EGF)-like and LamG domains. The protein is expressed in the photoreceptor layer of the retina                                                                                                       | 3 | gene is mutated in autosomal recessive retinitis pigmentosa                                                                      |
| <b>CR600797</b>  | 0  | 64,527,231-64,532,556 | no further information                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                       | 4 |                                                                                                                                  |
| <b>ZC3H11A</b>   | 1  | 66,011,354-66,014,959 | blood, immune cells, subthalamic nucleus, ciliary ganglion                                                   | Zinc finger CCCH domain-containing protein                                                                                                                                                                                            | 4 | no further information                                                                                                           |
| <b>UNQ9424</b>   | 0  | 66,200,487-66,289,697 | no further information                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                       | 4 |                                                                                                                                  |
| <b>MCART3P</b>   | 0  | 66,497,772-66,499,375 | no further information                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                       | 4 |                                                                                                                                  |
| <b>LOC648232</b> | 0  | 68,590,881-68,599,051 | no further information                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                       | 4 |                                                                                                                                  |

c.e. = coding exons, pri.= prioritization

Region: Chr6:164,6M - 165,9M

| name            | c.e. | Position                | expression                                                                                                                                                                             | function                                                                                                                                        | pri. | Comment                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|-----------------|------|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>AK090788</b> | 0    | 165,206,864-165,235,542 | no further information                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                 | 4    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <b>C6orf118</b> | 9    | 165,693,155-165,723,111 | no information                                                                                                                                                                         | hypothetical protein (no further information)                                                                                                   | 4    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <b>PDE10A2</b>  | 22   | 165,740,779-166,075,584 | caudatus nucleus(very high), fetal brain, lymphoblasts, blood, kidney; OMIM:highest levels in fetal brain and kidney, in putamen and caudate nucleus of adult brain,thyroid and testis | Cyclic nucleotide phosphodiesterase--> plays a role in signal transduction by regulating the intracellular concentration of cyclic nucleotides. | 2    | Inhibition promotes cyclic nucleotide signaling, increases striatal activation, and decreases behavioral activity. Highly expressed in medium spiny neurons of the striatum, at the confluence of the corticostriatal glutamatergic and the midbrain dopaminergic pathways, both believed to be involved in the physiopathology of schizophrenia. These data support further investigation of selective targeting of PDE signaling pathways in MSN subpopulations because this may represent a promising novel approach for treating brain disorders involving dysfunctional glutamatergic and dopaminergic neurotransmission. |

c.e. = coding exons, pri.= prioritization

## Region: Chr8:107,8M – 108,7M

| name          | c.e. | position                | expression                                                     | function                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | pri. | Comment |
|---------------|------|-------------------------|----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|---------|
| <b>ANGPT1</b> | 9    | 108,261,711-108,510,254 | blood, trigeminal ganglion, immune cells, appendix, fetal lung | angiopoietin 1 precursor-->important roles in vascular development and angiogenesis. It plays a critical role in mediating reciprocal interactions between the endothelium and surrounding matrix and mesenchyme and inhibits endothelial permeability. also contributes to blood vessel maturation and stability, and may be involved in early development of the heart. | 3    |         |

c.e. = coding exons, pri.= prioritization

## Region: Chr9:100,8M – 100,9M

| name          | c.e. | position                | expression                                                                                               | function                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | pri. | Comment |
|---------------|------|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|---------|
| <b>NANS</b>   | 6    | 100,818,682-100,845,364 | blood, immune cells, prostate, lung                                                                      | N-acetylneuraminic acid phosphate synthase -->functions in the biosynthetic pathways of sialic acids                                                                                                                                                                                                                                      | 3    |         |
| <b>TRIM14</b> | 6    | 100,846,637-100,881,488 | blood, immune cells, liver, pancreas                                                                     | member of the tripartite motif (TRIM) family. The protein localizes to cytoplasmic bodies and its function has not been determined                                                                                                                                                                                                        | 4    |         |
| <b>CORO2A</b> | 11   | 100,883,258-100,935,174 | temporal lobe, cingulate cortex, prostate, testis<br>bronchial epithelial cells, testis, liver, placenta | coronin, actin binding protein-->may facilitate formation of heterotrimeric or multiprotein complexes. involved in a variety of cellular processes, including cell cycle progression, signal transduction, apoptosis, and gene regulation. suggesting that this protein may also be an actin-binding protein that regulates cell motility | 2    |         |

c.e. = coding exons, pri.= prioritization

## 8.6 Tabelle aller Varianten

| Gen          | rs Nummer    | Wildtyp | Variante                 | Prävalenz       | Aminosäurenaustausch bei Variante in Exon | Patient                                                                                                                              |
|--------------|--------------|---------|--------------------------|-----------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>FMNL2</b> | rs4664114    | T       | C                        | 0,432 +/- 0,171 | Asn->Asn                                  | MR70, 53153, 58432, 65110                                                                                                            |
| <b>FMNL2</b> | rs4664592    | A       | G                        | 0,494 +/- 0,055 |                                           | MR70, 53153, 58432, 65110                                                                                                            |
| <b>FMNL2</b> | rs4664593    | G       | A                        | 0,494 +/- 0,053 |                                           | MR70, 53153, 58432, 65110                                                                                                            |
| <b>FMNL2</b> | rs1155779    | G       | A                        | 0,448 +/- 0,153 | Leu->Leu                                  | MR007, MR046, ER50211, 58342, 50211                                                                                                  |
| <b>FMNL2</b> | rs34263259   | /       | C                        | unknown         |                                           | MR007, MR046, ER50211, 58342, 50211                                                                                                  |
| <b>FMNL2</b> | rs76409968   | T       | G                        | 0,219 +/- 0,248 |                                           | MR046, ER50211, 50211, 53153, 58432, 60412                                                                                           |
| <b>FMNL2</b> | rs70974869   | /       | T                        | unknown         |                                           | MR007, MR016, MR046, MR077, ER50211, 50211, 53153, 58432, 60412                                                                      |
| <b>FMNL2</b> | rs6713836    | A       | G                        | 0,379 +/- 0,214 |                                           | MR70, 65110                                                                                                                          |
| <b>FMNL2</b> | rs16831399   | C       | T                        | 0,255 +/- 0,250 | His->His                                  | MR07, MR16, MR77                                                                                                                     |
| <b>FMNL2</b> | rs2118376    | A       | G                        | 0,364 +/- 0,223 |                                           | MR046                                                                                                                                |
| <b>FMNL2</b> | rs13023975   | C       | T                        | unknown         |                                           | 60412, 65110                                                                                                                         |
| <b>FMNL2</b> | rs70974877   | /       | CAAAACAAAA<br>CAAAACAAAA | unknown         |                                           | 65110                                                                                                                                |
| <b>FMNL2</b> | STR (nxCAAA) | /       | CAAA                     | unknown         |                                           | MR007(6/6), MR016(5/5), MR046(5/5), MR70(6/6), (MR077(6/6), ER50211(6/6), 50211(6/6), 53153(5/5), 58432(5/5), 60412(9/9), 65110(9/9) |

|                 |             |   |       |                 |                                                                          |
|-----------------|-------------|---|-------|-----------------|--------------------------------------------------------------------------|
| <b>FMNL2</b>    | rs16831451  | C | T     | 0,161 +/- 0,234 | MR077                                                                    |
| <b>FMNL2</b>    | rs56191709  | C | T     | unknown         | MR16, MR46                                                               |
| <b>FMNL2</b>    | rs2346532   | C | T     | unknown         | MR07, MR16, MR46, MR70, MR77, ER50211, 50211, 53153, 58432, 60412, 65110 |
| <b>FMNL2</b>    | rs7604573   | C | T     | 0,461 +/- 0,135 | MR07, MR70, ER50211, 50211, 53153, 58432, 65110                          |
| <b>FMNL2</b>    | rs9989874   | A | C     | unknown         | MR16, MR46                                                               |
| <b>FMNL2</b>    | rs1561267   | C | A/G/T | 0,311 +/- 0,243 | MR07, MR16, MR46, MR70, ER50211, 50211, 53153, 58432, 60412, 65110       |
| <b>ACMSD</b>    | rs186472993 | A | G     | unknown         | MR06                                                                     |
| <b>NR4A2</b>    | rs35479735  | / | C     | unknown         | MR77, 65110                                                              |
| <b>CXCR4</b>    | rs2228014   | C | T     | 0,116 +/- 0,211 | Ile->Ile<br>MR16, 58951                                                  |
| <b>DL492456</b> | rs12691943  | A | G     | 0,269 +/- 0,249 | MR16, MR46, MR77, ER13171, ER65306, 56940, 58951, 60412                  |
| <b>DL492456</b> | rs61753538  | A | G     | unknown         | MR46, 56940                                                              |
| <b>DL492456</b> | rs6733578   | C | T     | 0,334 +/- 0,235 | MR16, MR46, ER13171, ER65306, 40479, 56940, 58951, 60412                 |
| <b>DL492456</b> | rs35998722  | C | T     | 0,500 +/- 0,000 | MR46, 56940                                                              |
| <b>DL492456</b> | rs35211371  | A | G     | 0,375 +/- 0,217 | ER13171                                                                  |

|                |             |   |   |                 |          |                                                                    |
|----------------|-------------|---|---|-----------------|----------|--------------------------------------------------------------------|
| <b>TBR1</b>    | rs890076    | G | A | unknown         |          | MR013b, MR16, MR71a, MR77, ER50211, 40479, 53153,                  |
| <b>UBXN4</b>   | rs3213889   | A | G | 0,494 +/- 0,054 |          | 60412                                                              |
| <b>UBXN4</b>   | rs1050115   | A | G | 0,248 +/- 0,250 | Glu->Glu | 60412, ER65306                                                     |
| <b>UBXN4</b>   | rs16831997  | C | T | 0,294 +/- 0,246 |          | 40479, 58951                                                       |
| <b>UBXN4</b>   | rs7609188   | C | G | unknown         |          | 40479, 58951                                                       |
| <b>UBXN4</b>   | rs62170084  | A | G | unknown         | Ser->Ser | 40479                                                              |
| <b>SLC4A10</b> | rs41267437  | A | G | 0,500 +/- 0,000 |          | MR13b, MR46                                                        |
| <b>SLC4A10</b> | rs2084543   | C | T | 0,164 +/- 0,235 | Asp->Asp | MR13b                                                              |
| <b>SLC4A10</b> | rs41267441  | A | C | 0,209 +/- 0,247 |          | MR13b                                                              |
| <b>SLC4A10</b> | rs116473207 | T | A | unknown         |          | 40479, MR71a                                                       |
| <b>SLC4A10</b> | rs6754546   | A | G | 0,397 +/- 0,202 |          | MR16, MR70, MR77, ER50211, 50211, 53153                            |
| <b>TANC1</b>   | rs72951453  | A | G | 0,160 +/- 0,233 |          | MR46, MR70, MR77                                                   |
| <b>TANC1</b>   | rs12466551  | A | G | 0,047 +/- 0,146 | Asn->Ser | MR13b, MR16, MR46, MR70, MR71a, MR77, ER50211, 40479, 50211, 53153 |
| <b>TANC1</b>   | rs12988603  | C | T | 0,270 +/- 0,249 | Asn->Asn | MR13b, MR16, ER50211, 50211                                        |

|                |            |    |       |                 |          |                                                                    |
|----------------|------------|----|-------|-----------------|----------|--------------------------------------------------------------------|
| <b>TANC1</b>   | rs6748288  | C  | T     | 0,047 +/- 0,145 | Asn->Asn | MR13b, MR16, MR46, MR70, MR71a, MR77, ER50211, 40479, 50211, 53153 |
| <b>TANC1</b>   | rs62171128 | C  | T     | 0,180 +/- 0,240 | Asp->Asp | MR13b, ER50211, 50211                                              |
| <b>TANC1</b>   | rs13389867 | G  | A/C/T | 0,268 +/- 0,249 |          | MR71a, 40479                                                       |
| <b>TANC1</b>   | rs13430891 | A  | T     | 0,346 +/- 0,231 |          | MR46, MR71a, MR70, MR77, 40479                                     |
| <b>TANC1</b>   | rs3214491  | /  | C     | unknown         |          | MR13b, MR16, MR46, MR70, MR71a, MR77, ER50211, 40479, 50211, 53153 |
| <b>TANC1</b>   | rs2303334  | C  | G     | 0,500 +/- 0,000 |          | MR13b, MR16, MR46, MR77, 40479, 53153                              |
| <b>TANC1</b>   | rs2303335  | A  | T     | 0,255 +/- 0,250 |          | MR13b, MR16, MR46, MR77, 40479, 53153                              |
| <b>TANC1</b>   | rs2288110  | A  | C     | 0,497 +/- 0,041 | Thr->Thr | MR70, MR71a                                                        |
| <b>TANC1</b>   | rs67270488 | CA | TG    | 0,500 +/- 0,000 | Ala->Ala | MR70, MR71a                                                        |
| <b>TANC1</b>   | rs3821296  | A  | G     | 0,496 +/- 0,045 | Thr->Thr | MR70, MR71a                                                        |
| <b>TANC1</b>   | rs3821301  | A  | C     | 0,396 +/- 0,203 |          | ER50211, 50211                                                     |
| <b>RAPGEF4</b> | rs80323710 | /  | C     | unknown         |          | MR46, MR48, MR57, MR70, MR71a, MR79, 22771, 53152, 53425, 80528    |
| <b>RAPGEF4</b> | rs7585729  | C  | T     | 0,042 +/- 0,138 |          | MR46, MR48, MR57, MR70, MR71a, MR79, 22771, 53152, 53425, 80528    |
| <b>RAPGEF4</b> | rs6433382  | A  | G     | 0,473 +/- 0,113 |          | 22771, 53152, 80528                                                |

|                |             |   |   |                 |          |                                                                                       |
|----------------|-------------|---|---|-----------------|----------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>RAPGEF4</b> | rs56164818  | A | T | 0,202 +/- 0,245 |          | MR46, 53425                                                                           |
| <b>RAPGEF4</b> | rs72908146  | C | G | 0,210 +/- 0,247 |          | MR46, 53425                                                                           |
| <b>RAPGEF4</b> | rs3754766   | C | G | 0,478 +/- 0,102 |          | 22771, 53152, 80528                                                                   |
| <b>RAPGEF4</b> | rs77475561  | C | T | 0,219 +/- 0,248 |          | 53425                                                                                 |
| <b>RAPGEF4</b> | rs17852174  | C | T | unknown         | Thr->Met | MR57                                                                                  |
| <b>NXPH2</b>   | rs10803570  | A | G | 0,443 +/- 0,158 | Tyr->Tyr | MR16, MR70, MR77, ER13171, 58951, 65306,                                              |
| <b>RNF39</b>   | rs9261304   | C | G | 0,500 +/- 0,000 | Pro->Pro | ER54766, 80718                                                                        |
| <b>RNF39</b>   | rs115631878 | A | G | 0,139 +/- 0,224 |          | 57712                                                                                 |
| <b>RNF39</b>   | rs2074479   | C | T | 0,370 +/- 0,219 | Ser->Pro | ER54766, 80718                                                                        |
| <b>RNF39</b>   | rs2301751   | A | G | 0,092 +/- 0,194 |          | ER54766, 80718                                                                        |
| <b>RNF39</b>   | rs2301752   | A | G | 0,172 +/- 0,238 | Ala->Thr | ER54766, 80718                                                                        |
| <b>RNF39</b>   | rs2301753   | A | C | 0,361 +/- 0,224 | Ala->Glu | ER54766, 80718                                                                        |
| <b>RNF39</b>   | rs2301754   | A | G | unknown         | Glu->Glu | ER54766, 80718                                                                        |
| <b>MOG</b>     | rs3130250   | A | G | 0,098 +/- 0,198 | Ser->Ser | MR22b, MR31, MR38, MR93, MR106, ER13171, ER54766, ER59296, 53926, 57712, 80528, 80718 |

|             |              |    |                                                   |                 |                     |                                                                                 |
|-------------|--------------|----|---------------------------------------------------|-----------------|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| <b>MOG</b>  | rs1318631    | G  | A                                                 | 0,301 +/- 0,245 |                     | MR22b, ER13171, ER54766, ER59296, 80528                                         |
| <b>MOG</b>  | rs3095291    | C  | G                                                 | 0,500 +/- 0,000 |                     | MR22b, MR38, MR93, MR106, ER13171, ER54766, ER59296, 53926, 57712, 80528, 80718 |
| <b>MOG</b>  | rs76573413   | T  | C                                                 | 0,027 +/- 0,114 |                     | 53926                                                                           |
| <b>MOG</b>  | rs141316400  | A  | G                                                 | unknown         |                     | 53926                                                                           |
| <b>PCLO</b> | rs62622792   | A  | G                                                 | unknown         |                     | 55478                                                                           |
| <b>PCLO</b> | rs61741659   | A  | G                                                 | 0,290 +/- 0,247 | Asp->Gly            | MR53, 65110                                                                     |
| <b>PCLO</b> | rs144574814  | G  | A                                                 | unknown         | splice site changes | MR57                                                                            |
| <b>PCLO</b> | rs77721383   | /  | TCAGCCTCTT<br>GGTCCTGCTA<br>AGCCTCCAGC<br>TCAGCAC | unknown         | splice site changes | MR39, MR79                                                                      |
| <b>PCLO</b> | rs6972461    | T  | C                                                 | 0,204 +/- 0,246 | Ser->Pro            | 51917, 55478, 63307                                                             |
| <b>PCLO</b> | rs2877       | G  | C                                                 | 0,322 +/- 0,239 | Ser->Thr            | MR39, MR53, MR57, MR79, ER13171, ER54766, 55478, 63307, 65110                   |
| <b>PCLO</b> | polymorphism | // | TT                                                | unknown         | splice site changes | MR39, MR79                                                                      |
| <b>PCLO</b> | rs10487648   | T  | G                                                 | 0,074 +/- 0,178 | Phe->Leu            | MR57, 51917                                                                     |
| <b>PCLO</b> | rs10954696   | C  | T                                                 | 0,443 +/- 0,159 | Val->Ile            | MR57, ER54766, 51917, 65110, 80829                                              |
| <b>PCLO</b> | rs976714     | C  | T                                                 | 0,429 +/- 0,175 | Ala->Thr            | MR57, ER54766, 51917, 65110, 80829                                              |

|             |              |     |     |                 |                     |                                   |
|-------------|--------------|-----|-----|-----------------|---------------------|-----------------------------------|
| <b>PCLO</b> | rs10694231   | /   | GAT | unknown         |                     | MR39, MR57, ER13171, 63307, 80829 |
| <b>PCLO</b> | rs12707531   | G   | T   | 0,500 +/- 0,000 |                     | MR57                              |
| <b>PCLO</b> | polymorphism | G   | A   |                 | splice site changes | MR53                              |
| <b>PCLO</b> | polymorphism | A   | G   | unknown         | Tyr->Cys            | 65110                             |
| <b>PCLO</b> | rs17156844   | T   | C   | 0,493 +/- 0,057 | His->His            | ER13171, ER54766, 80829           |
| <b>PCLO</b> | rs74745996   | /// | TAA | unknown         |                     | MR57, 51917                       |
| <b>PCLO</b> | rs73171307   | A   | C   | 0,027 +/- 0,114 |                     | MR57                              |
| <b>PCLO</b> | rs2715150    | T   | C   | 0,495 +/- 0,048 |                     | MR57, 80829                       |
| <b>PCLO</b> | rs2522833    | A   | C   | 0,495 +/- 0,051 | Ser->Ala            | MR57, ER54766, 51917, 80829       |
| <b>PCLO</b> | rs12668093   | C   | T   | 0,394 +/- 0,204 | Gly->Gly            | 51917                             |
| <b>PCLO</b> | rs12667348   | A   | G   | 0,496 +/- 0,044 |                     | ER54766, 51917, 65110             |
| <b>PCLO</b> | rs57607795   | C   | A   | 0,500 +/- 0,000 |                     | MR39                              |
| <b>PCLO</b> | rs62465931   | C   | T   | Unknown         |                     | MR39                              |

## **9 Danksagung**

Mein Dank gilt zunächst Professor André Reis für das Vermitteln und Ermöglichen meiner Doktorarbeit am Institut für Humangenetik.

Ganz besonders möchte ich mich bei Privatdozent Dr. Abou Jamra bedanken, zum einen für die Bereitstellung des Themas, zum anderen für die intensive Betreuung. Er nahm sich viel Zeit, um anstehende Probleme klären zu helfen, seine wissenschaftliche Begeisterung wirkte ansteckend und motivierte immer wieder von neuem.

Hervorheben darf ich auch das harmonische Zusammenwirken mit meiner Mit-Doktorandin Karolin Eberlein.

Ein herzlicher Dank gilt zudem allen Mitarbeitern des Instituts, für die fortwährende Hilfsbereitschaft, das angenehme Arbeitsklima und die Unterstützung in wissenschaftlichen Krisenzeiten.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern sowie meinen Brüdern für die moralische und tatkräftige Unterstützung in allen Lebenslagen bedanken.