

Aus dem Medizinischen Zentrum für Humangenetik
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Karl-Heinz Grzeschik
Arbeitsgruppe für Molekulare Analyse erblicher Erkrankungen
Leiterin: Prof. Dr. Manuela C. Koch

Assoziationsstudien und Kandidatengenanalysen bei Neuralrohrdefekten

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
(Dr. rer. physiol.)

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Karolin Stegmann
aus Hamburg

Marburg, Juni 2000

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. H. F. Kern
Referentin: Frau Prof. Dr. M. C. Koch
Koreferent:

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Genetische Epidemiologie und klinische Ausprägung	4
1.2	Embryologie	5
1.2.1	Das Modell der multiplen Verschlussstellen	7
1.3	Ursachen von Neuralrohrdefekten	9
1.3.1	Folsäurestoffwechsel	11
1.3.2	Entwicklungsgene	15
1.4	Fragestellung der vorliegenden Arbeit	21
1.4.1	Assoziationsstudien zu <i>MTHFR</i> -Polymorphismen	21
1.4.2	Mutationsuchen in Entwicklungsgenen	22
2	Material und Methoden	23
2.1	Material	23
2.1.1	Chemikalien	23
2.1.2	Enzyme	23
2.1.3	Kitsysteme	23
2.1.4	Geräte	24
2.1.5	Software	24
2.2	Probanden und Kontrollen	25
2.3	Methoden	26
2.3.1	Molekularbiologische Standardmethoden	26
2.3.2	PCR-Optimierung	26
2.3.3	SSCA (Single-stranded conformational analysis)	27
2.3.4	Sequenzierung	27
2.3.5	Direkter Nachweis bekannter Mutationen	28
2.3.5.1	ARMS (Amplification refractory mutation system)	28
2.3.5.2	RFLP (Restriction fragment length polymorphism)	28
2.3.6	Statistische Methoden	28
2.3.6.1	Fall-Kontroll-Vergleich	29
2.3.6.2	Familien-Analyse	29
2.3.6.3	Mutter-Kind-Paare	30
2.3.7	Sicherheitsmaßnahmen	31
2.4	Untersuchung der einzelnen Kandidatengene	31
2.4.1	<i>MTHFR</i>	32
2.4.2	<i>SLUG</i>	34
2.4.3	<i>CART1</i>	36
2.4.4	<i>NOGGIN</i>	37
2.4.5	<i>TWIST</i>	38
2.4.6	<i>AP2α</i>	39
2.4.7	<i>MSX2</i>	41

3	Ergebnisse	42
3.1	Assoziationsstudien zu <i>MTHFR</i>-Polymorphismen	42
3.1.1	677C→T	42
3.1.1.1	Fall-Kontroll-Vergleich	42
3.1.1.2	Familien-Analyse	43
3.1.1.3	Mutter-Kind-Paare	43
3.1.2	1298A→C	44
3.1.2.1	Fall-Kontroll-Vergleich	44
3.1.2.2	Familien-Analyse	45
3.1.2.3	Mutter-Kind-Paare	46
3.2	Mutationssuchen in Entwicklungsgenen	47
3.2.1	<i>SLUG</i>	47
3.2.2	<i>CART1</i>	49
3.2.3	<i>NOGGIN</i>	52
3.2.4	<i>TWIST</i>	54
3.2.5	<i>AP2α</i>	55
3.2.6	<i>MSX2</i>	58
3.3	Gen-Gen-Interaktion	61
4	Diskussion	63
4.1	Heterogene Ätiologie	63
4.2	Kandidatengenansatz	64
4.3	Die thermolabile <i>MTHFR</i>	65
4.3.1	677C→T	68
4.3.2	1298A→C	70
4.3.3	Die Rolle der Mutter	71
4.3.4	Populationsspezifische Unterschiede	72
4.3.5	Der Einfluß der Umwelt	74
4.3.6	Selektionsvorteil der thermolabilen <i>MTHFR</i>	75
4.3.7	Der protektive Mechanismus der Folsäure	75
4.3.8	Homocystein als NRD-Risikofaktor	76
4.3.9	Methodisches: Fall-Kontroll-Studien	76
4.3.9.1	Reduzierung der ätiologischen Heterogenität	76
4.3.9.2	Wahl der Kontrollgruppe	77
4.3.9.3	Gruppengröße	78
4.3.9.4	Statistischer Test	79
4.3.10	Ausblick	81
4.3.10.1	Kein Ausschluß der <i>MTHFR</i> als NRD-Risikofaktor	81
4.3.10.2	Cystathionin-β-Synthase (CBS)	81

4.4	Entwicklungsgene	82
4.4.1	Methodisches: PCR-SSCA	83
4.4.2	Transkriptionsfaktoren und Krankheiten	85
4.4.3	Sequenzvarianten der untersuchten Entwicklungsgene.....	87
4.4.3.1	<i>SLUG</i>	87
4.4.3.2	<i>CART1</i>	88
4.4.3.3	<i>NOGGIN</i>	89
4.4.3.4	<i>TWIST</i>	90
4.4.3.5	<i>AP2α</i>	91
4.4.3.6	<i>MSX2</i>	93
4.4.4	Mutation, Variante, Polymorphismus	95
4.4.4.1	Nicht-synonyme Sequenzveränderungen.....	96
4.4.4.2	Synonyme und nicht-kodierende Sequenzveränderungen	97
4.4.5	Die Maus als Modell.....	98
4.4.6	Ausblick	100
4.4.6.1	Entwicklungsgene als NRD-Risikofaktoren	100
4.4.6.2	Tiermodelle.....	100
4.5	Ausblick	101
5	Zusammenfassungen	102
5.1	Zusammenfassung.....	102
5.1.1	Stichwörter.....	103
5.2	Abstract	103
5.2.1	Key words	104
6	Abkürzungen	105
7	Literatur	107
8	Lebenslauf	122
9	Verzeichnis der akademischen Lehrer	123
10	Danksagung	124
11	Ehrenwörtliche Erklärung	125
12	Publikationen	126
12.1	Originalarbeiten	126
12.2	Poster	126
12.3	Vortrag.....	126

1 Einleitung

1.1 Genetische Epidemiologie und klinische Ausprägung

Die Aufklärung genetischer Krankheitsursachen ist ein wichtiger Teil der medizinisch-biologischen Forschung. Sie ist entscheidend für das Verständnis der Ätiologie und damit Voraussetzung für verbesserte Prävention, gezielte Therapie und genetische Beratung. Außerdem liefern Untersuchungen gestörter Prozesse immer Erkenntnisse über den ungestörten Prozeß und tragen auf diese Weise zu unserem Verständnis der Biologie des Menschen bei.

Neuralrohrdefekte (NRD) sind angeborene Fehlbildungen des Gehirns und Rückenmarks. Weltweit werden pro Jahr schätzungsweise 400.000 Kinder mit NRD geboren (Larsen 1997). Dabei schwankt die Prävalenz mit der ethnischen Bevölkerungsgruppe und der geographischen Lage. In Europa finden sich die höchsten Prävalenzen in Nordirland (7:1.000 Neugeborene), die niedrigsten in Skandinavien (0,5:1.000) (Elwood et al. 1992; Stoll 1995). In Deutschland liegt die Prävalenz bei Geburt mit etwa 1:1.000 im mittleren Bereich (Koch und Fuhrmann 1984; Queißer-Luft et al. 1996). In den letzten Jahren ließ sich eine Abnahme der NRD-Prävalenz verzeichnen, die nicht allein auf eine zunehmende Anwendung der Pränataldiagnostik (Ultraschall und Amniozentese) zurückzuführen ist (Roberts et al. 1995).

Je nach Lokalisation und Ausmaß der Fehlbildung unterscheidet man verschiedene Formen von NRD (Tab. 1-1, Abb. 1-2; Moore und Persaud 1996; Botto et al. 1999). Im Bereich der Wirbelsäule spricht man von Spina bifida (SB, lat. „Spaltwirbel“). Die häufigste Form (55% aller NRD) ist die Spina bifida aperta (SBA), bei der durch einen Wirbelspalt Meningen und Rückenmark hervortreten. Je nachdem, ob nur Meningen oder auch Rückenmark in den Spalt verlagert sind, unterscheidet man verschiedene anatomische Varianten (Meningocele, Meningomyelocele). Fast immer liegt der Spalt dorsal. In Abhängigkeit von der Höhe des Defekts (thorakal, lumbal, sakral) weisen SBA-Patienten eine inkomplette Querschnittslähmung mit Entleerungsstörungen von Blase und Mastdarm auf. Die sensible und motorische Innervation der unteren Extremitäten ist beeinträchtigt. Zusätzlich haben die meisten Patienten eine Arnold-Chiari-Fehlbildung und ein Tethered Cord. Trotz gesteigerter Überlebenschancen durch verfeinerte Operationstechniken und Antibiotikatherapie erreichen nur 60% der Betroffenen das 2. Lebensjahr. Die meisten Patienten sind später rollstuhlpflichtig.

Die leichteste Form – und im eigentlichen Sinn kein NRD – ist die Spina bifida occulta (SBO). Bei dieser Form ist das Rückenmark nicht fehlgebildet, lediglich die Verschmel-

zung einzelner Wirbelbögen im lumbosakralen Bereich ist ausgeblieben. Die SBO ist meist symptomlos und tritt bei etwa 10% der Bevölkerung auf (Moore und Persaud 1996).

Im Bereich des Gehirns ist die häufigste Form die Anencephalie (35-45% aller NRD), bei der das Schädeldach und wesentliche Teile des Vorderhirns fehlen. Betroffene Kinder sterben vor oder kurz nach der Geburt. Von Craniorhachischisis spricht man, wenn sich bei einem Anencephalus die Fehlbildung weiter in den Bereich des Rückenmarks erstreckt. Eine seltene craniale NRD-Form ist die Encephalocoele, ein von Haut bedeckter Hirnprolaps durch einen Defekt des knöchernen Schädels. Er kann frontal, parietal oder okzipital liegen (Abb. 1-2).

Tabelle 1-1 NRD-Phänotypen

Phänotyp	Lokalisation	Defekt	Ursache	Verschlußstelle				
				3	2	4	1	5
Craniorhachischisis	craniospinal	offen	primäre Neurulation		x	x	x	
Anencephalie	cranial	offen	primäre Neurulation		x	x		
Encephalocoele	cranial	geschlossen	fokaler Mesoderm-Defekt	x	x	x		
SBA	spinal	offen	primäre Neurulation				x	x
SBO	spinal	geschlossen	sekundäre Neurulation / Verkalkungsstörung?					

Bei den phänotypischen Unterformen sind verschiedene Verschlußstellen (1-5) betroffen.

Anencephalie: Meroacranium = 2, Holoacranium = 2 + 4.

Encephalocoele: frontale Encephalocoele = 3/2, parietale Encephalocoele = 2/4, okzipitale Encephalocoele = 4.

SBA: cervicothorakale SBA = 1 (cranial + Mitte), thorakolumbale SBA = 1 (Mitte + caudal), lumbosakrale

SBA = 1 (caudal) + 5.

Erläuterungen zu den Verschlußstellen in Kap. 1.2.1. Literatur: Van Allen et al. 1993

1.2 Embryologie

Das Neuralrohr, der Vorläufer von Gehirn und Rückenmark, entsteht in der dritten und vierten Schwangerschaftswoche (18.-26. embryonaler Tag, Embryonalstadium 8-12). Es bildet sich in einem Faltungsprozeß (Neurulation) aus der Neuralplatte (Abb. 1-1). Die Neurulation ist ein komplexer Vorgang, bei dem koordinierte Gewebeumstrukturierungen nach exaktem Zeitplan stattfinden. Das angrenzende Oberflächenectoderm und Mesoderm stehen in engem Zusammenhang mit der Bildung des Neuralrohrs und beeinflussen durch direkten Kontakt und sezernierte Signalmoleküle die Neurulation (Kelly und Melton 1995; Larsen 1997; DeSesso et al. 1999).

Die primäre Neurulation beginnt am 18. Tag der Embryonalentwicklung (Stadium 8) mit der Verdickung des Ectoderms zur Neuralplatte. Die lateralen Ränder der Neuralplatte (Neuralfalten) wölben sich hoch, wandern aufeinander zu und verschmelzen in der dorsalen Mittellinie miteinander (22.-24. Tag, Stadium 10-11). Die Zellen des Neuroepithels verändern dabei ihre Gestalt von quaderförmig in der Neuralplatte zu keilförmig im

Neuralrohr (Schoenwolf und Smith 1990). Kurz vor (cranial) oder nach (spinal) dem Neuralrohrschluß wandern dorsolateral die Neuralleistenzellen aus. Mit der Fusion der Neuralfalten geht eine Ablösung vom Oberflächenectoderm einher. Das entstandene Neuralrohr verlagert sich in das darunterliegende Mesoderm, darüber schließt sich das Oberflächenectoderm. Die primäre Neurulation endet mit dem Verschluss des Neuroporus anterior (24. Tag, Stadium 11) und des Neuroporus posterior (26. Tag, Stadium 12), den letzten Verbindungen zwischen dem Lumen des Neuralrohrs und der Amnionhöhle.

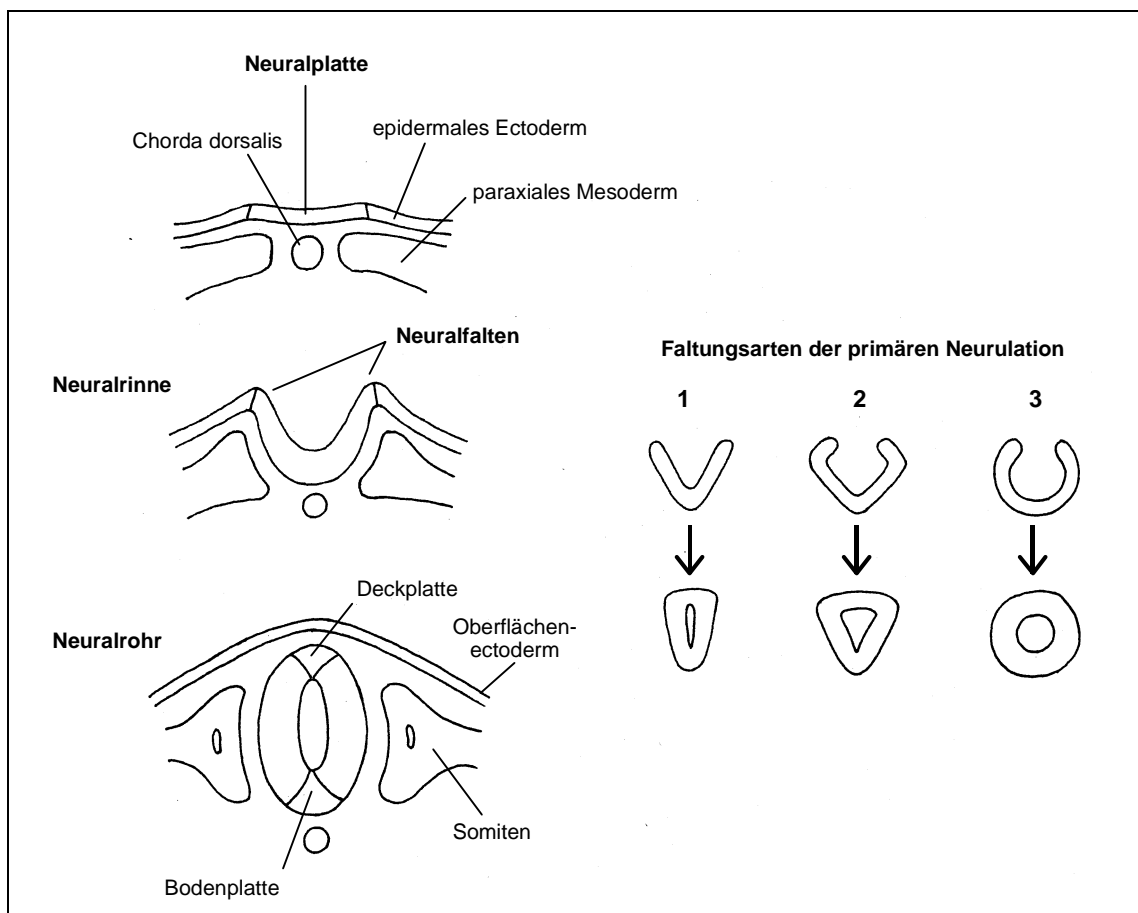


Abbildung 1-1 Primäre Neurulation - schematischer Transversalschnitt

Aus der Neuralplatte entsteht durch Hochwölben der Neuralfalten die Neuralrinne, die sich zum Neuralrohr schließt. Spinal findet die Neurulation von rostral nach caudal in drei Faltingsarten statt (Shum und Copp 1996). **1** (cervico-thorakal): ein Wendepunkt in der Mitte der Neuralplatte, Lumen V-förmig, nach Verschluss schlitzförmig. **2** (thorako-lumbal): ein Wendepunkt in der Mitte, zwei dorsolaterale Wendepunkte, Lumen diamantförmig. **3** (sakral): kein Wendepunkt, gesamtes Neuroepithel gebogen, Lumen kreisförmig.

Caudal des Neuroporus posterior folgt die Neuralentwicklung einem anderen Mechanismus. Diese sogenannte sekundäre Neurulation beginnt am 26. Tag (Stadium 12). Es kommt dabei nicht zur Neuralfaltung, sondern zur nachträglichen Kanalisation mesenchymaler Vorläuferzellen des Rückenmarks. Der caudale Neuroporus liegt etwa auf Höhe des zweiten Sakralwirbels (S2). Daher könnte eine rein sakral gelegene SBA auf einen Defekt der sekundären Neurulation zurückzuführen sein. Die meisten NRD liegen jedoch oberhalb von S2, so daß es sich wahrscheinlich um Defekte der primären Neurulation handelt.

1.2.1 Das Modell der multiplen Verschlussstellen

Ursprünglich hat man sich den Neuralrohrschluß nach dem Reißverschluß-Modell vorgestellt: von einer einzigen Initiationsstelle ausgehend und kontinuierlich nach cranial und caudal fortschreitend. Untersuchungen an Mäusen haben aber gezeigt, daß es vier Initiationsstellen gibt (Golden und Chernoff 1993). Die einzelnen Verschlussstellen haben eine unterschiedliche Sensitivität für teratogene Noxen und unterliegen wahrscheinlich der Kontrolle verschiedener Entwicklungsgene. Aufgrund fetalpathologischer Beobachtungen geht man beim Menschen von fünf unabhängigen Verschlussstellen aus (Van Allen et al. 1993). Nach diesem hypothetischen Modell resultieren die verschiedenen Formen von NRD aus dem spezifischen Defekt jeweils einer oder mehrerer Verschlussstellen (Tab. 1-1, Abb. 1-2)

Eine Reihe von Studien konnten menschliche NRD-Fälle plausibel den postulierten Verschlussstellen zuordnen (Van Allen et al. 1993; Golden und Chernoff 1995; Martínez-Frías et al. 1996; Oostra et al. 1998). Dabei erstreckten sich die NRD entweder über den Bereich einer oder mehrerer Verschlussstellen (SBA, Anencephalie, Craniorhachischisis) oder betrafen die Neuroporen zwischen zwei Verschlussbereichen (Encephalocelen). In einzelnen Bevölkerungsgruppen scheinen NRD bestimmter Verschlussbereiche gehäuft vorzukommen. So treten frontoethmoidale Encephalocelen (Verschlussstelle 3) fast ausschließlich bei Thais auf, okzipitale Encephalocelen (Verschlussstelle 4) und cervicale SBA (Verschlussstelle 1 cranial) bei Sikhs (Flatz und Sukthomya 1970; Hall et al. 1988). Außerdem ergeben sich für die nach Verschlussstellen klassifizierten NRD unterschiedliche Geschlechtsverhältnisse (Seller 1995a; Abb. 1-2). Diese Korrelationen zu Phänotyp, Ethnie und Geschlecht sprechen für das Modell der multiplen Initiationsstellen.

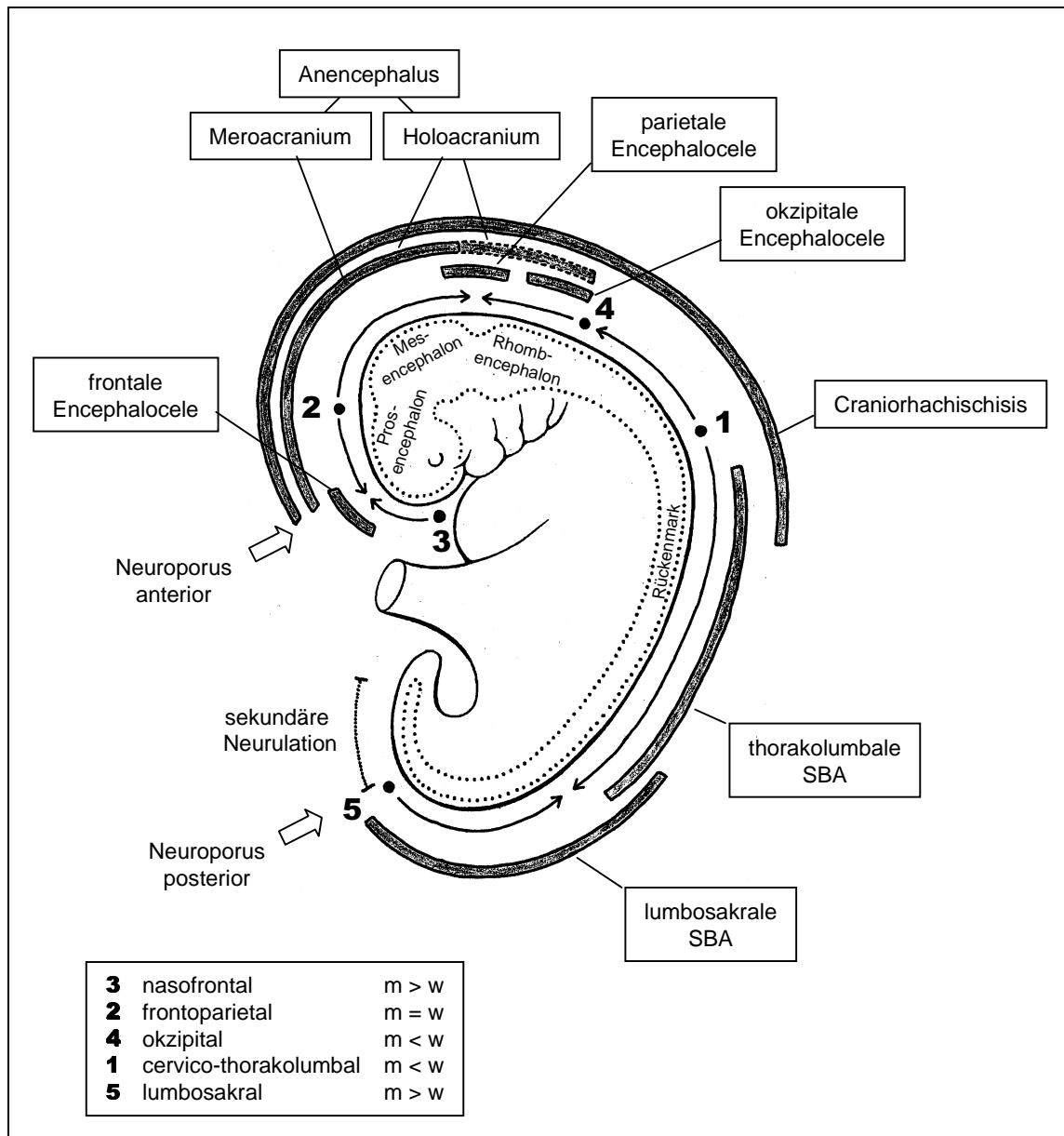


Abbildung 1-2 Die fünf postulierten Verschlussstellen beim Menschen

Menschlicher Embryo am 29. embryonalen Tag (Stadium 13), nach komplettem Verschluss des Neuralrohrs. Die Punkte 1-5 stellen die fünf beim Menschen postulierten Initiationsstellen dar, an denen der Verschluss beginnt und in die von den Pfeilen angedeuteten Richtungen fortschreitet (Golden und Chernoff 1993; Seller 1995). Verschlussstellen 1 und 2 sind bidirektional, Verschlussstellen 3, 4 und 5 sind unidirektional. Der Mechanismus im Verschlussbereich 4 unterscheidet sich von der sonstigen primären Neurulation. Es bildet sich hier eine Membrandecke, so daß das Oberflächenectoderm verschmilzt, während die Neuralfalten darunter offen bleiben. Daher gilt Verschlussbereich 4 eher als weiterer rostraler Neuroporus. m/w = männlich/weiblich: NRD in den fünf Verschlussbereichen zeigen unterschiedliche Geschlechtsverteilung.

An Mäusen hat man beobachtet, daß die primäre Neurulation im Bereich der Verschlußstelle 1 wiederum morphologisch heterogen ist (Abb. 1-1). Die Faltungsform des Neuroepithels unterscheidet sich entlang der rostro-caudalen Achse und geht graduell in die sekundäre Neurulation über (Shum und Copp 1996).

Insgesamt ist die Entwicklung des Neuralrohrs also heterogen mit verschiedenen Verschlußstellen und unterschiedlichen Faltungsarten abhängig von der anatomischen Lage. Dieser morphologischen Heterogenität liegen wahrscheinlich celluläre, biochemische und genetische Unterschiede zugrunde. Daher muß man davon ausgehen, daß auch die verschiedenen NRD-Phänotypen unterschiedliche genetische Ursachen haben.

1.3 Ursachen von Neuralrohrdefekten

Die Ursachen von NRD sind noch weitgehend ungeklärt. Selten treten NRD im Rahmen von Syndromen mit Mendelschem Erbgang (Meckel-Gruber-Syndrom, Waardenburg-Syndrom, Currarino-Trias, Jarcho-Levin-Syndrom) oder chromosomalen Anomalien (Trisomie 13 und 18) auf. Die meisten NRD (70-80%) sind nicht-syndromal und sporadisch (Hall und Solehdin 1998a). Man geht davon aus, daß sporadische NRD eine multifaktorielle Genese haben, daß also sowohl Umwelt- wie auch genetische Faktoren an der Manifestation beteiligt sind. Zu den Umweltfaktoren gehören mütterliche Einflüsse durch Ernährung (Folsäure, Alkohol), Stoffwechsel (Diabetes), Medikamente (Anti-Epileptika wie Valproat) und Temperatur (Hyperthermie durch Fieber oder Sauna) (Lindhout und Schmidt 1986; Milunsky et al. 1992; Fleming et al. 1997). Die von Teratogenen ausgelösten NRD liegen häufig im Bereich spezifischer Verschlußstellen. Folsäuremangel betrifft die Verschlußstellen 2, 4 und 1 (caudal), Alkohol die Verschlußstellen 2 und 1 und Valproat die Verschlußstelle 5 (Van Allen et al. 1993).

Besondere Aufmerksamkeit hat der präventive Effekt von Folsäure auf sich gezogen, dessen Mechanismus trotzdem noch immer ungeklärt ist. Folsäure ist ein Vitamin der B-Gruppe und kommt vor allem in rohem Obst (Apfelsine, Avocado) und Gemüse (Spinat, Weißkohl, Salat) vor. Der Name kommt von lateinisch *folium* („Blatt“), weil Folsäure zuerst aus Spinatblättern isoliert wurde. Mehrere Studien haben belegt, daß eine perikonzeptionelle Folsäure-Einnahme (0,4 mg/d oral) das NRD-Risiko um bis zu 70% senkt, auch bei Müttern, die bereits ein Kind mit NRD haben (MRC Vitamin Study Research Group 1991; Czeizel und Dudás 1992; Berry et al. 1999). Seit 1998 werden deshalb in den USA auf Beschluß der Regierung Getreideprodukte mit 1,4 mg/kg Folsäure angereichert. In Deutschland wird Frauen mit Kinderwunsch zu einer medikamentösen Folsäureprophylaxe geraten.

Eindeutige genetische Faktoren sind bisher noch nicht identifiziert, aber ihr Vorhandensein läßt sich aus epidemiologischen Beobachtungen schließen. Ein erster Hinweis auf eine genetische Prädisposition ist die Abhängigkeit der Prävalenz von der ethnischen Zugehörigkeit, die auch bei einer Veränderung der Umgebung erhalten bleibt. So haben Sikhs auch dann ein höheres NRD-Risiko, wenn sie nach Kanada ausgewandert sind (Hall et al. 1988). Ein zweiter Hinweis ist das signifikant erhöhte Wiederholungsrisiko für Verwandte. Geschwister und Kinder eines NRD-Patienten haben ein empirisches Krankheitsrisiko von 3%, das ist etwa 30fach höher als das der Allgemeinbevölkerung (Koch und Fuhrmann 1985). Aus diesem Wiederholungsrisiko für Verwandte ersten Grades läßt sich das relative Risiko λ_1 berechnen, das ein Maß für den genetischen Beitrag zu einer komplexen Krankheit ist (Risch und Merikangas 1996):

$$\lambda_n = \frac{\text{Krankheitshäufigkeit bei Verwandten n-ten Grades}}{\text{Krankheitshäufigkeit in der Bevölkerung}} \Rightarrow \lambda_1(\text{NRD}) = \frac{0,03}{0,001} = 30$$

Damit ist λ_1 für NRD wesentlich kleiner als bei Krankheiten mit rein genetischer Ursache wie cystische Fibrose ($\lambda_1 > 500$), aber größer als bei anderen komplexen Krankheiten wie Diabetes Typ 2 ($\lambda_1 = 3,5$) (Lander und Schork 1994). Einen dritten Hinweis auf die Beteiligung genetischer Faktoren liefern Untersuchungen an betroffenen Geschwister- und Zwillingspaaren. Die Konkordanz in Höhe und Ausprägung des NRD ist bei eineiigen Zwillingen signifikant höher als bei zweieiigen (Hall et al. 1988; Seller 1990). Es sind allerdings auch Familien mit zwei betroffenen, phänotypisch diskordanten Geschwistern (z.B. Anencephalie und SBA) beschrieben (Koch und Fuhrmann 1985).

Sehr wahrscheinlich sind NRD polygen verursacht, das heißt mehrere Gene sind an der Ätiologie beteiligt. Jedes einzelne Gen leistet dabei nur einen kleinen Beitrag. Ein NRD entsteht erst durch die Interaktion mehrerer genetischer und äußerer Faktoren. Verschiedene NRD-Phänotypen könnten durch verschiedene Kombinationen der Faktoren entstehen. Um die genetische Komponente einer Krankheit zu entschlüsseln, gibt es mehrere mögliche Ansätze, die aber bei NRD nicht alle anwendbar sind. Parametrische Kopplungsanalysen erfordern die Spezifikation eines präzisen genetischen Modells einschließlich der Dominanz/Rezessivität und dem Grad der Penetranz, so daß sie sich vor allem für monogene Erkrankungen eignen. Nichtparametrische Kopplungsanalysen wie Geschwisterpaaranalysen scheiden aus praktischen Gründen aus. Denn familiäre NRD sind so selten, daß es fast nicht möglich ist, eine ausreichende Zahl großer Familien mit mehreren Betroffenen zu rekrutieren. Bevorzugt wird daher in der NRD-Erforschung der sogenannte Kandidatengenansatz.

Kandidatengene sind Gene, bei denen aufgrund einer bekannten Eigenschaft (Funktion, Expressionsmuster, chromosomale Lokalisation, Strukturmotiv) eine Beteiligung an der Pathogenese vermutet werden kann. Diese Gene werden gezielt untersucht. Mutations-suchen in Kandidatengen haben das Ziel, Sequenzveränderungen zu finden, die ausschließlich oder gehäuft bei NRD-Patienten auftreten. Eine solche Assoziation deutet auf eine ursächliche Beteiligung der Mutation hin. Ein Kausalzusammenhang wird wahr-scheinlicher, wenn die Mutation zu einer Aminosäureveränderung führt, insbesondere in konservierten und daher vermutlich funktional wichtigen Bereichen des Proteins. Eine andere Möglichkeit sind Assoziationsstudien mit polymorphen Markern, die ent-weder nahe am oder im Kandidatengen liegen. Diese Marker sind selbst nicht krank-heitsauslösend. Stellt sich aber eine Assoziation mit dem Krankheitsphänotyp heraus, deutet dies auf eine ursächliche Mutation in der Nähe hin, die mit dem polymorphen Marker im Kopplungsungleichgewicht steht (Lander und Schork 1994).

Die zur Zeit für NRD diskutierten Kandidatengene lassen sich in zwei Gruppen einteilen: erstens Gene, deren Genprodukte am Folsäurestoffwechsel beteiligt sind, zweitens Entwicklungsgene, deren Untersuchung im Tiermodell auf eine Funktion in der Neuro-lation hinweist.

1.3.1 Folsäurestoffwechsel

Die Reduktion des NRD-Risikos durch perikonzeptionelle Folsäureeinnahme ist nicht auf einen alimentären Folsäuremangel bei den betroffenen Müttern zurückzuführen (van der Put et al. 1997a). Außerdem zeigten Mütter betroffener Kinder erhöhte Homo-cystein-Spiegel (Steegers-Theunissen et al. 1994; Mills et al. 1995). Homocystein ist eine Aminosäure, deren Stoffwechsel Folsäure-abhängig ist (Abb. 1-3). Daher vermutet man einen Stoffwechseldefekt bei der Mutter, dem Kind oder beiden, der durch erhöhte Fol-säurezufuhr ausgeglichen wird.

Wissenschaftler haben deshalb in den letzten Jahren begonnen, Gene des Folsäurestoff-wechsels auf eine Beteiligung an der NRD-Ätiologie zu untersuchen. Dazu gehören die Enzyme Cystathionin- β -Synthase (CBS), Methyltetrahydrofolat-Homocystein-Methyl-transferase (MTR, auch „Methioninsynthase“), Methyltransferase-Reduktase (MTRR) Methyltetrahydrofolat-Dehydrogenase (MTHFD) und Methyltetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR) sowie die Folatrezeptoren FR α und FR β (Tab. 1-2).

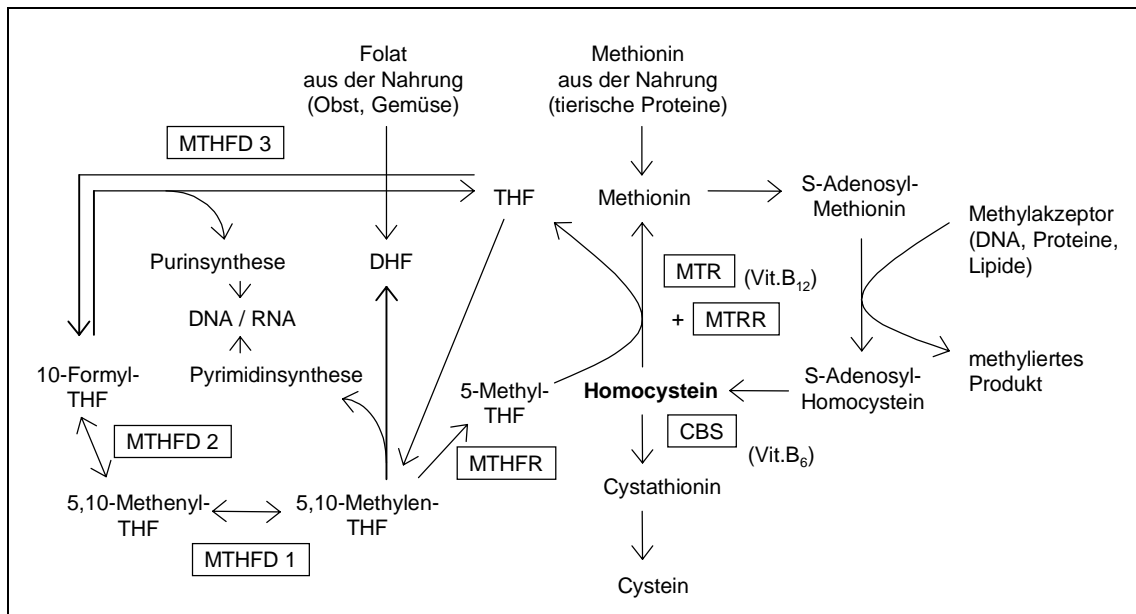


Abbildung 1-3 Vereinfachte Darstellung des Folsäure-/Homocysteinstoffwechsels

THF = Tetrahydrofolat, MTHFD = Methylentetrahydrofolat-Dehydrogenase (trifunktional: MTHFD1 = 5,10-Methylentetrahydrofolat-Dehydrogenase EC 1.5.1.5, MTHFD2 = 5,10-Methylentetrahydrofolat-Cyclohydrolase EC 3.5.4.9 und MTHFD3 = 10-Formyltetrahydrofolat-Synthase EC 6.3.4.3), MTHFR = Methylentetrahydrofolat-Reduktase (EC 1.5.1.20), MTR = 5-Methyltetrahydrofolat-Homocystein-S-Methyltransferase (auch „Methioninsynthase“, EC 2.1.1.13), CBS = Cystathionin- β -Synthase (EC 4.2.1.22)

Folsäure ist ein Vitamin, das als Coenzym eine Schlüsselfunktion bei der DNA-Synthese und im C_1 -Stoffwechsel hat. Im Blut liegt Folsäure hauptsächlich in Form von 5-Methyl-THF vor, das von der MTHFR gebildet wird (Abb. 1-3). 5-Methyl-THF liefert die Methylgruppe für die von der MTR katalysierten Methylierung von Homocystein zu Methionin. Dabei wird die Methylgruppe vorübergehend auf Cobalamin (Vitamin B_{12}) übertragen, einen Cofaktor der MTR, der von der MTRR im aktiven Zustand stabilisiert wird. Das aus dieser Reaktion entstehende Methionin ist notwendig zur Proteinsynthese. In seiner aktivierten Form, S-Adenosyl-methionin, ist es der wichtigste Methylgruppendonor bei Transmethylierungsreaktionen, unter anderem von DNA, Proteinen und Lipiden. Eine ausreichende Methionin-Konzentration im Embryo könnte daher notwendig sein, damit die Entwicklung des Neuralrohrs normal verläuft. Nach Abgabe der Methylgruppe entsteht wieder Homocystein. Homocystein kann entweder von der MTR zu Methionin remethyliert oder von der CBS in einer Transsulfurierung zu Cystathionin katabolisiert werden. Ein weiteres Enzym in diesem Stoffwechsel ist die MTHFD, die drei hintereinandergeschaltete Reaktionen bei der stufenweisen Umwandlung von THF katalysiert. Diese Stufen werden zur *de novo*-DNA-Synthese benötigt, die bei der Embryonalentwicklung essentiell ist. 5,10-Methylen-THF dient als Coenzym bei der Thymidylatsynthese, 10-Formyl-THF bei der Purinsynthese.

Tabelle 1-2 Untersuchungen von Kandidatengenens des Folsäurestoffwechsels

Gen	DNA	AS	M/P	n	A	Bemerkung	Literatur
MTHFR	677C→T	A222V	P	1155	?	4 x pos., 8 x neg.	s. Text
	1068C→T	S353S	P	143	?	1 x pos., 1 x neg.	Morrison et al. 1998 Trembath et al. 1999
	1298A→C	A430E	P	151	(-)	1 x pos., 2 x neg.	Trembath et al. 1999 van der Put et al. 1998
MTR	polym. Marker		P	73	-	kein LD	Brody et al. 1999
	2756A→G	D919G	P	356	-	pos. bei Müttern mit <i>MTHFR</i> 677TT?	Brody et al. 1999 Morrison et al. 1998 Shaw et al. 1999 van der Put et al. 1997b
MTRR	3778C→A	R→R	P	122	-	-	Trembath et al. 1999
	insGAA	PolyA	P	122	-	-	Trembath et al. 1999
	66A→G	I22M	P	56	-	pos. bei Müttern mit Vit. B ₁₂ -Mangel?	Wilson et al. 1999
CBS	919G→A	G307S	P	83	-	-	Ramsbottom et al. 1997
	844ins68	-	P	206	-	-	Morrison et al. 1998 Ramsbottom et al. 1997 Richter et al. 2000
MTHFD	878G→G	R293H	M	117	-	1 Pat. mit fam. SBA und nichtbet. Fam.-Mitglieder	Hol et al. 1998
FRα	1958G→A	R653Q	P	117	-	-	Hol et al. 1998
	TGA→TAA	-	M	166	(?)	1 Pat. de novo	Trembath et al. 1999
	keine Seq.veränderungen			~200	-	-	Barber et al. 1998 Heil et al. 1999
FRβ	5nt-Repeat	Intron 1	P	166	-	-	Trembath et al. 1999
	keine Seq.veränderungen			39	-	-	Heil et al. 1999

AS = Aminosäure; M/P = Mutation/Polymorphismus; n = Gesamtzahl der untersuchten NRD-Patienten bzw. NRD-Familien (z.T. geschätzt); A = statistische Assoziation mit NRD (Polymorphismus) oder ausschließliches Vorkommen bei Betroffenen (Mutation); ? = widersprüchliche Beobachtungen; LD = Linkage Disequilibrium (Kopplungsungleichgewicht).

Bei MTHFD, MTHFR, MTR, MTRR und CBS handelt es sich also um Enzyme, die entscheidend sind bei der Aufrechterhaltung der intracellulären Methionin-Konzentration und bei der Bereitstellung von Folsäurederivaten zur DNA-Synthese. Defekte in diesen Enzymen führen zu einem Anstieg von Homocystein und könnten durch Erhöhung der Folsäurekonzentration korrigiert werden.

Folatrezeptoren sind Membranproteine mit GPI-Anker, die 5-Methyl-THF binden und ins Zellinnere schleusen. Die humanen Folatrezeptoren treten in drei verschiedenen Isoformen auf (FR α , FR β , FR γ), die sich in der Folataffinität und dem Expressionsmuster unterscheiden. Der physiologisch wichtigste Rezeptor ist FR α . Er wird selektiv in Trophoblasten exprimiert und ist für den Folat-Transport über die Placenta verantwortlich. Mäuse, denen das homologe Gen (*Fbp1*) fehlt, entwickeln letale NRD (Piedrahita et al. 1999). Wurden die Mäuse mit Folsäure supplementiert, ließ sich der Phänotyp verhindern.

Bisher sind die Gene von *MTHFR*, *MTR*, *MTRR*, *CBS* und *MTHFD* sowie von *FR α* und *FR β* auf einen Zusammenhang mit NRD untersucht worden (Tab. 1-2). Bei *MTR*, *CBS* und *FR β* fand man nur Polymorphismen, die mit der gleichen Häufigkeit auch in den Kontrollgruppen vorkamen. In *FR α* trugen von insgesamt über 350 untersuchten Patienten nur zwei eine Punktmutation, die zudem nicht zu einem Aminosäureaustausch führten. In *MTHFD* entdeckte man bei einem SBA-Patienten eine Missense-Mutation im Linker-Bereich zwischen den katalytischen Domänen. Diese Mutation trat nicht in Kontrollpersonen, aber in gesunden Familienmitgliedern auf. Bisherige Untersuchungen haben also keinerlei Anhaltspunkte dafür geliefert, daß diese Gene entscheidend an der NRD-Entstehung beteiligt sind.

Eine Reihe von Studien haben das Gen der *MTHFR* untersucht und kommen zu widersprüchlichen Ergebnissen. Zwei Polymorphismen werden kontrovers als genetische Risikofaktoren für NRD diskutiert. Der Basenaustausch 677C→T in Exon4 führt auf Aminosäureebene zum Austausch von Alanin zu Valin in der stark konservierten katalytischen Domäne und kodiert eine thermolabile Enzymvariante. Die *MTHFR*-Aktivität ist bei 677CT-Heterozygoten leicht und bei 677TT-Homozygoten deutlich vermindert (Frosst et al. 1995). Die reduzierte Enzymaktivität geht einher mit einem erhöhten Homocystein- und einem erniedrigten Folsäurespiegel im Plasma. Durch Folsäurezufuhr ließ sich der erhöhte Homocystein-Spiegel bei Erwachsenen mit thermolabiler *MTHFR* wieder normalisieren (Blom 1998). Einige Studien haben eine Assoziation des 677TT-Genotyps mit NRD gefunden (van der Put et al. 1995; Ou et al. 1996; de Franchis et al. 1998a; Shields et al. 1999), andere haben diese Assoziation nicht gefunden (Björke-Monsen et al. 1997; Mornet et al. 1997; Morrison et al. 1998; Shaw et al. 1998; van der Put et al. 1998; Boduroglu et al. 1999; Christensen et al. 1999).

Der zweite Polymorphismus im *MTHFR*-Gen, 1298A→C in Exon7, bewirkt einen Aminosäureaustausch von Glutaminsäure zu Alanin in der mutmaßlich regulatorischen Domäne (Viel et al. 1997). 677CC Wildtyp-Homozygote mit einem 1298CC homozygot oder 1298AC heterozygot aberranten Genotyp zeigten eine leicht erniedrigte *MTHFR*-Aktivität bei normalen Homocystein- und Folat-Plasmaspiegeln (van der Put et al. 1998). Eine Assoziation von 1298A→C mit NRD ist bisher nicht nachgewiesen worden. Allerdings beschrieb eine Studie ein erhöhtes NRD-Risiko für 677CT/1298AC kombiniert Heterozygote und erklärte 1298A→C zu einem zusätzlichen genetischen Risikofaktor (van der Put et al. 1998).

1.3.2 Entwicklungsgene

NRD treten bei verschiedenen Tierarten spontan auf, zum Beispiel bei Kühen, Schafen und Katzen (Elwood et al. 1992). Zur wissenschaftlichen Untersuchung züchtet man verschiedene Labortiere (Maus, Huhn, *Xenopus laevis*) mit NRD. Die NRD in Labortieren sind entweder

spontan entstanden oder wurden künstlich durch operative Eingriffe und genetische Manipulation erzeugt. Durch chemische Substanzen (z.B. ENU) oder Röntgenstrahlen lassen sich ungezielt neue Mausmutanten mit unbekanntem Genveränderungen induzieren. Bei gezielt genetisch manipulierten Mäusen (Knock-out (KO), Transgen, Knock-in) werden dagegen bekannte Gene durch rekombinante Techniken verändert. Diese tierexperimentellen Untersuchungen dienen dazu, den Pathomechanismus von NRD aufzuklären und die beteiligten Gene zu identifizieren. Wenn ein Entwicklungsgen zur Zeit der Neurulation ein spezifisches Expressionsmuster zeigt und seine Ausschaltung, Fehlfunktion oder Überexpression NRD auslöst, geht man davon aus, daß es eine Rolle in der Neurulation spielt. Möglicherweise ist das homologe Gen beim Menschen für eine normale Neuralentwicklung ebenfalls essentiell und eine Veränderung in diesem Gen könnte zu NRD führen. Deshalb untersucht man solche Kandidatengene auf Mutationen bei NRD-Patienten. Die Übertragung von Erkenntnissen aus dem Tiermodell auf den Menschen baut darauf, daß Gene und ihre Funktion evolutionär konserviert wurden. Das ist zwar in vielen Fällen belegt, muß aber im Einzelfall nicht zutreffen. Als Mindestvoraussetzung für eine konservierte Funktion gilt eine konservierte Sequenz.

In vielen Fällen ist die Übertragung von Erkenntnissen aus dem Tiermodell auf den Menschen gelungen. Ein Beispiel ist die ADR-Mausmutante, ein Modell für Myotonie. Sie trägt einen genetischen Defekt im Chloridkanal des Skelettmuskels. Beim Menschen haben sich Mutationen im Chloridkanal-Gen inzwischen als Ursache von Myotonie erwiesen (Koch et al. 1992). Auch andere Organismen haben erfolgreich als Modelle gedient. Bei kongenitalen Herzfehlbildungen sind Gene mutiert, die zuvor in der Herzentwicklung von Maus, Huhn oder *Drosophila* identifiziert wurden (Brand et al. 1999). Es gibt allerdings kein Tiermodell, das der Situation beim Menschen voll entspricht. Mäuse sind das beliebteste Modell, weil sie in ihrer Embryonalentwicklung und ihrem Genom dem Menschen sehr ähnlich sind (Wynshaw-Boris 1996). Bei NRD gibt es aber grundlegende Unterschiede zwischen beiden Spezies. So sind beim Menschen die meisten NRD nicht-syndromal, bei Mäusen syndromal (Harris und Juriloff 1997). Bei Mäusen ist Exencephalie (Verschlußstelle 2) der mit Abstand häufigste NRD, beim Menschen dagegen SBA (Verschlußstelle 1 und 5).

Tabelle 1-3 Gene, deren homozygote Mutation bei Mäusen NRD auslösen

Gen	Genprodukt	Typ der Mutation (Mausmutante)	NRD		NLD andere präventiv FB		
			cranial	spinal			
<i>Ap2α</i>	Transkriptionsfaktor	KO	x	-	-	x	
<i>apoB</i>	Transportlipoprotein	KO	x	-	-	x	
<i>Cart1</i>	Transkriptionsfaktor	KO	x	-	-	x	Folsäure
<i>Macs</i>	Signaltransduktion	KO	x	-	-	-	
<i>Msx2</i>	Transkriptionsfaktor	transgen	x	-	x	x	
<i>p53</i>	Tumorsuppressor	KO	x	-	-	x	
<i>RARα/γ</i>	Kernrezeptor	KO	x	-	-	x	
<i>Shh</i>	Signalprotein	ektopische Expression	x	-	-	x	
<i>twist</i>	Transkriptionsfaktor	KO	x	-	-	x	
<i>Lp</i>	unbekannt	spontan (<i>loop tail</i>)	x	x	-	-	
<i>Brca1</i>	Tumorsuppressor	KO	x	x	-	x	
<i>ct</i>	unbekannt	spontan (<i>curly tail</i>)	x	x	-	-	Inositol
<i>Mlp</i>	Signaltransduktion	KO	x	x	-	-	
<i>Noggin</i>	Signalprotein	KO	x	x	-	x	
<i>opb</i>	unbekannt	spontan (<i>open brain</i>)	x	x	-	x	
<i>Pdgfra</i>	Transmembran-Rez.	spontan (<i>Patch</i>)	x	x	x	x	
<i>Pax3</i>	Transkriptionsfaktor	spontan (<i>Spotch Sp^d</i>)	x	x	x	-	Folsäure
<i>ptc</i>	Transmembran-Rez.	KO	x	x	x	x	
<i>Axd</i>	unbekannt	spontan (<i>axial defects</i>)	-	x	-	x	Methionin
<i>Tgfβ</i>	Signalprotein	KO	-	x	-	x	
<i>Pax1 / Pdgfra</i>	TF / TM-Rez.	spontan (<i>undulated / Patch</i>)	-	x	-	-	
<i>T</i>	Transkriptionsfaktor	spontan (<i>Brachyury</i>)	-	x	-	x	

NLD = Neuralleistendefekt, FB = Fehlbildungen, TF = Transkriptionsfaktor, TM-Rez. = Transmembran-Rezeptor
 Literatur: Übersicht: Copp 1998; Juriloff und Harris 2000; Harris und Juriloff 1999, 1997. *Msx2*: Winograd et al. 1997; *Brca1*: Gowen et al. 1996; *ptc*: Goodrich et al. 1997; *TGFβ*: Sanford et al. 1997; *Patch*: Soriano 1997; *undulated/Patch*: Helwig et al. 1995; *Brachyury*: Beddington et al. 1992.
 ergänzende Information: Jackson Laboratory (<http://www.informatics.jax.org>)

Nur wenige Mausmutanten entwickeln eine isolierte lumbosakrale SBA. Trotz der unterschiedlichen phänotypischen Ausprägungen gibt es jedoch Parallelen. So löst Valproat in beiden Spezies NRD aus, bei der Maus Exencephalie und beim Menschen SBA (Copp et al. 1990). Beim Schluß des Neuralrohrs sind viele Entwicklungsgene beteiligt, die in genau abgestimmter Weise arbeiten müssen (Tanabe und Jessell 1996; Bronner-Fraser und Fraser 1997; Spörle und Schughart 1997). Theoretisch kann jedes dieser Gene betroffen sein. Diese Komplexität spiegelt sich wider in der Vielzahl von Gendefekten, die bei der Maus NRD auslösen. Inzwischen sind über 60 Mausmutanten mit NRD beschrieben, bei mehr als der Hälfte ist das betroffene Gen kloniert (Copp 1998; Juriloff und Harris 2000). Eine Auswahl von Mausmutanten und den betroffenen Genen zeigt Tab. 1-3. Die biochemische Funktion der Proteine, die von den mutierten Genen kodiert werden, ist kaum bekannt, ihre Bedeutung während der Neurulation ungeklärt. Zu den betroffenen Genprodukten gehören Transkriptionsfaktoren, Signaltransduktionsmoleküle, Transportmoleküle und Tumorsuppressoren.

Pax3 ist ein Beispiel dafür, daß Erkenntnisse aus Expressions- und Funktionsanalysen an Tiermodellen tatsächlich wertvolle Hinweise auf eine Funktion beim Menschen geben können. *Pax3* gehört zu einer Familie von Homöobox-Genen, die mit den Segmentationsgenen von *Drosophila* verwandt sind. Zur Zeit der Neurulation wird *Pax3* spezifisch in der dorsalen Hälfte des Neuralrohrs exprimiert und spielt eine Rolle bei der dorso-ventralen Musterbildung im Neuralrohr und bei der Neuralleistenentwicklung (Goulding et al. 1991). Mäuse mit Mutationen in *Pax3* (*Spotch*) entwickeln NRD (Epstein et al. 1991). Beim Menschen verursachen *PAX3*-Mutationen das Waardenburg-Syndrom (WS), ein autosomal dominant vererbtes Syndrom mit Defekten der Neuralleisten-Abkömmlinge (Tassabehji et al. 1992). In einigen WS-Familien tritt zusätzlich eine SBA auf, so daß beiden Phänotypen möglicherweise *PAX3*-Mutationen als gemeinsame Ursache zugrundeliegen. Tatsächlich hat man bei einer Patientin mit WS Typ 1 und SBA eine *PAX3*-Nonsense-Mutation gefunden. Allerdings waren alle Familienmitglieder mit WS und ohne SBA ebenfalls Mutationsträger (Hol et al. 1995). Offensichtlich war die *PAX3*-Mutation die Ursache für das WS und spielte für die SBA höchstens eine prädisponierende Rolle. Weitere Kopplungs- und Assoziationsanalysen haben ausgeschlossen, daß *PAX3* ein wichtiges NRD-Risikogen ist (Chatkupt et al. 1995; Trembath et al. 1999).

Tabelle 1-4 Beim Menschen untersuchte Kandidatengene aus Tiermodellen für NRD

Gen	DNA	AS	M/P	n	A	Bemerkung	Literatur
MACS	polym. Marker	-	-	43	-	kein LD	Stumpo et al. 1998
p53	polym. Marker	-	-	78	-	kein LD	Melvin et al. 1997
BRCA1	polym. Marker	-	-	78	-	kein LD	Melvin et al. 1997
	1186A→G	Q356R	P	61	-	-	Morrison et al. 1998
	4956A→G	S1613G	P	62	-	-	Morrison et al. 1998
MLP	polym. Marker	-	-	43	-	kein LD	Stumpo et al. 1998
PAX3	polym. Marker	-	-	31	-	keine Kopplung	Chatkupt et al. 1995
	polym. Marker	-	-	78	-	kein LD	Melvin et al. 1997
	del5 (Ex 5)	frame-shift	M	39	-	1 Patientin (+ WS 1) und nichtbetr. Fam.mitglieder	Hol et al. 1995
	del2q35-36.2	-	M	2	?	+ WS Typ 3	Nye et al. 1998
	245C→A	T→K	P	122	-	-	Trembath et al. 1999
PAX1	472G→C	Q115H	M	117	-	1 Patient und nichtbetr. Familienmitglieder	Hol et al. 1996
	C→T (Ex2)	G43G	P	117	-	-	Hol et al. 1996
	C→A (Ex6)	T315K	P	117	-	-	Hol et al. 1996
human T	+79T→C	-	P	93	(?)	Intron 7	Morrison et al. 1998 Trembath et al. 1999
	530A→G	N177G	P	81	-	-	Morrison et al. 1998
SHH	keine Seq.veränderung	-	-	51	-	-	Vargas et al. 1997

AS = Aminosäure; M/P = Mutation/Polymorphismus; n = Gesamtzahl der untersuchten NRD-Patienten bzw. NRD-Familien; A = statistische Assoziation mit NRD (Polymorphismus) oder ausschließliches Vorkommen bei Betroffenen (Mutation); ? = widersprüchliche Beobachtungen; LD = Linkage Disequilibrium (Kopplungsungleichgewicht); WS = Waardenburg-Syndrom

Die Untersuchungen an Mäusen lieferten auch ein Beispiel für die Interaktion unabhängiger Loci. Doppelmutanten mit homozygoter *undulated*-Mutation (*Pax1*) und heterozygoter *Patch*-Mutation (*Pdgfra*) entwickelten eine extreme Form der SBO, ein Phänotyp, der bei den Einzelmutanten nicht auftrat (Helwig et al. 1995). Auch beim Menschen sind einige Krankheiten mit digenem Erbgang bekannt. Beispiele sind Retinitis pigmentosa (*RDS/ROM1*; Kajiwarra et al. 1994) und Schwerhörigkeit (*DFNA2/DFNA12*; Balciuniene et al. 1998). Eine solche digene Vererbung ist auch bei NRD denkbar und würde das sporadische Auftreten erklären. Das bei dem Mausmodell beteiligte *Pax1*-Gen spielt aber bei menschlichen NRD keine entscheidende Rolle. Nur bei einer Patientin mit SBA fand man eine *PAX1*-Mutation. Diese Mutation führte zwar zu einem Aminosäureaustausch in der konservierten *paired*-Domäne, trat aber auch bei nicht betroffenen Mitgliedern der Familie auf. Zwei weitere Polymorphismen in *PAX1* waren nicht mit NRD assoziiert (Hol et al. 1996).

Tab. 1-4 gibt eine Übersicht über die aus Tiermodellen abgeleiteten Kandidatengene, die auf einen Zusammenhang zu NRD beim Menschen untersucht worden sind. Außer den erwähnten Mutationen in *PAX1* und *PAX3* hat man in den bisher untersuchten Entwicklungsgenen nur Polymorphismen gefunden, die nicht mit NRD korrelieren. Weitere Untersuchungen sollten sich also auf andere Gene konzentrieren. Zu den möglichen Kandidaten zählen *SLUG*, *CART1*, *NOGGIN*, *TWIST*, *AP2α* und *MSX2*. Es handelt sich um hochkonservierte Gene, deren Expressionsmuster und Funktionsanalysen im Tiermodell zeigen, daß sie in der Neurulation eine wichtige Rolle spielen (Tab. 1-5).

Tabelle 1-5 Kandidatengene aus Tiermodellen für NRD, die noch nicht beim Menschen untersucht sind

Gen	Genprodukt	Tiermodell	AS-Homologie	Expressionsmuster während Neurulation	Mutante	Phänotyp
<i>SLUG</i>	TF ZnF	Maus	95%	Neuralfalten	KO	-
		Huhn	94%	Neuralfalten	Antisense-Oligos	NRD
<i>CART1</i>	TF Homöobox	Maus	96%	craniales Mesenchym	KO	EX
<i>NOGGIN</i>	Signalpeptid	Maus	99%	Neuralfalten	KO	EX, SBA
<i>TWIST</i>	TF bHLH	Maus	95%	craniales Mesenchym	KO	EX
<i>AP2α</i>	TF HSH	Maus	99%	Neuralfalten	KO	EX
<i>MSX2</i>	TF Homöobox	Maus	92%	Neuralfalten	transgen KO	EX -

TF = Transkriptionsfaktor, bHLH = basisches Helix-Loop-Helix-Motiv, ZnF = Zinkfinger, HSH = Helix-Span-Helix, KO = Knock-out, EX = Exencephalie, SBA = Spina bifida aperta, - = kein NRD-Phänotyp
Erläuterungen und Literatur: s. Text

Die Untersuchungen an den Mausmutanten haben gezeigt, daß NRD durch Störung eines oder mehrerer Prozesse innerhalb der Neurulation ausgelöst werden können (Bennett et al. 1998; Harris und Juriloff 1999). Die hier ausgewählten Kandidatengene lassen sich vier solchen Prozessen zuordnen (A-D, Tab. 1-6). Sie betreffen die Interaktion mit anderen Geweben (Mesoderm, Neuralleiste) und die Entwicklungen innerhalb des Neuralrohrs (Apoptose, Differenzierung).

Tabelle 1-6 Mechanismen der NRD-Entstehung

	gestörter Mechanismus	beteiligte Gene
A	Unterstützung durch das Mesoderm	<i>Twist, Cart1</i>
B	Differenzierung und Auswanderung der Neuralleiste	<i>Slug, Ap2α</i>
C	Umstrukturierung der Mittellinie, einschließlich Apoptose	<i>Msx2</i>
D	Differenzierung innerhalb des Neuralrohrs	<i>Noggin</i>

Entscheidend bei der Aufwölbung der Neuralfalten ist die Unterstützung durch das umgebende Mesoderm (A). Ohne intaktes Mesoderm kann sich das Neuralrohr nicht normal entwickeln. Zu den Mesoderm-spezifischen Genen gehören *Twist* und *Cart1*. Sie werden zur Zeit der Neurulation im cranialen Mesenchym exprimiert. Knock-out-Mäuse zeigten Defekte des Kopf-Mesenchyms und entwickelten craniale NRD (Chen und Behringer 1995; Zhao et al. 1996). Interessanterweise ließen sich die NRD bei *Cart1*-KO-Mäusen durch pränatale Folsäurebehandlung reduzieren. Vielleicht handelt es sich um ein Modell für Folsäure-präventierbare NRD, die beim Menschen auf 70% aller NRD geschätzt werden.

Ein weiterer Prozeß, dessen Störung zu NRD führen kann, ist die Auswanderung der Neuralleistenzellen (B). Die ausbleibende Migration der Neuralleistenzellen aus der Spitze der Neuralfalten könnte die fusionsfähigen Zellen darunter blockieren. *Ap2 α* und *Slug* sind Gene, die spezifisch in den Neuralleistenzellen exprimiert werden. *Slug* ist ein Marker für prä-migratorische (Huhn, *Xenopus*) und migratorische (Maus, Huhn, *Xenopus*) Neuralleistenzellen. Funktionsanalysen wurden zunächst am Huhn durchgeführt. Die Behandlung mit *Slug*-Antisense-Oligonucleotiden verhinderte die Auswanderung der Neuralleistenzellen und den Verschluß des Neuralrohrs (Nieto et al. 1994). Nach chirurgischer Abtragung der Neuralfalten ging die anschließende Regeneration und Neufusion mit einer Hochregulation der *Slug*-Expression einher (Sechrist et al. 1995). Bei der Maus führte die Ausschaltung von *Slug* überraschenderweise nicht zu NRD (Jiang et al. 1998b). Möglicherweise hat hier ein anderes Mitglied der Genfamilie die Funktion übernommen.

Ap2α wird in den sich schließenden cranialen Neuralfalten, im angrenzenden Ectoderm und in den migrierenden Neuralleistenzellen exprimiert. *Ap2α*-KO-Mäuse entwickelten schwere craniale NRD (Schorle et al. 1996; Zhang et al. 1996). Der Zusammenhang zwischen gestörter Neuralleistenenwicklung und NRD scheint dabei komplexer zu sein als nach dem mechanistischen Modell angenommen, denn die Neuralleistenzellen blieben migrations- und differenzierungsfähig (Zhang et al. 1996).

Ein vierter Prozeß in der Neurulation ist die Umstrukturierung der Mittellinie (C), bei dem es zu einem entwicklungsbiologisch genau regulierten, programmierten Zelltod kommt. *Msx2* ist an dieser Apoptose-Regulation beteiligt. *Msx2*-Überexpression führte zu gesteigertem Zelltod im cranialen Neuralgewebe, die Mäuse entwickelten Exencephalie, Gesichtsspalten und Defekte der Neuralleisten-Abkömmlinge (Winograd et al. 1997). Beim Menschen sind bei Craniostyose Typ Boston Mutationen in *MSX2* gefunden worden (Jabs et al. 1993).

Schließlich können NRD auch auf eine Störung der Proliferation und Differenzierung innerhalb des Neuroectoderms zurückgehen (D). Diese Musterbildung entsteht aus dem Gleichgewicht von induktiven Signalen und ihren Antagonisten. Für die Differenzierung des dorsalen Neuralrohrs sind die zentralen Gegenspieler BMPs (Bone morphogenetic proteins) und Noggin. BMPs werden zuerst vom benachbarten epidermalen Ectoderm produziert und induzieren die Differenzierung der dorsalen Neuralzellen in die sogenannte Deckplatte. Später übernimmt diese die BMP-Produktion und bewirkt so die Differenzierung in Neurone vom dorsalen Typ. Noggin wird im dorsalen Bereich des Neuralrohrs und der Somiten exprimiert. Als sezerniertes Signalpeptid bindet und inaktiviert es BMPs und begrenzt damit ihre Wirkung. Bei Ausschaltung von *Noggin* in Mäusen blieb das Neuralrohr offen und zeigte gravierende Musterveränderungen. Die Mäuse hatten Exencephalie und SBA (McMahon et al. 1998). Aus den Tierexperimenten läßt sich also mit Sicherheit schließen, daß *Twist*, *Cart1*, *Slug*, *Ap2a*, *Msx2* und *Noggin* an der Neuralentwicklung beteiligt sind, auch wenn ihre genaue Funktion dabei noch unbekannt ist. Basierend auf einer starken Sequenzhomologie läßt sich postulieren, daß sie diese Funktion auch beim Menschen haben. Es ist daher denkbar, daß Mutationen in den entsprechenden humanen Genen zur genetischen NRD-Prädisposition beitragen.

1.4 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Diese Arbeit soll untersuchen, ob ausgewählte Kandidatengene als Risikofaktoren zur multifaktoriellen Genese von NRD beitragen. Die untersuchten Gene gelten als Kandidaten entweder aufgrund ihrer wichtigen Funktion im Folsäurestoffwechsel (*MTHFR*) oder aufgrund von

induzierten Mutanten bei Tiermodellen (Entwicklungsgene *SLUG*, *CART1*, *NOGGIN*, *TWIST*, *AP2 α* und *MSX2*).

1.4.1 Assoziationsstudien zu *MTHFR*-Polymorphismen

Eine der wenigen Tatsachen, die man im Zusammenhang mit der NRD-Entstehung beim Menschen sicher weiß, ist der präventive Effekt perikonzeptioneller Folsäuregaben. Mehrere umfangreiche, internationale Studien haben gezeigt, daß eine Folsäureeinnahme der Mutter in den ersten Schwangerschaftswochen das Risiko eines NRD bei ihrem Kind reduziert. Ein Schlüsselenzym des Folsäurestoffwechsels ist die Methylentetrahydrofolat-Reduktase (*MTHFR*). Deren thermolabile Variante hat eine erniedrigte Enzymaktivität, die zu einem Mangel an aktivierten C₁-Einheiten und damit zu gestörten Methylierungsreaktionen führen kann. Die Bereitstellung von C₁-Einheiten ist bei allen Wachstumsprozessen notwendig, auch bei der Entwicklung des Neuroectoderms einschließlich der Neurulation. Durch Folsäuregaben läßt sich die thermolabile *MTHFR* stabilisieren und ihre Aktivität steigern. Diese Zusammenhänge haben dazu geführt, daß die thermolabile *MTHFR* als möglicher NRD-Risikofaktor angesehen wird.

Nachdem die genetische Ursache der thermolabilen *MTHFR*, eine Homozygotie für den Basenaustausch 677C→T in Exon4 (A222V), geklärt war, konnte der Enzymdefekt auf einfache Weise getestet werden. In der Folge ist in Fall-Kontroll-Studien in Nordamerika und einigen europäischen Ländern eine Assoziation zwischen 677C→T und NRD untersucht worden. Die Ergebnisse waren widersprüchlich. In manchen Ländern wurde eine Assoziation des 677TT-Genotyps mit NRD gefunden (Irland, Holland, Italien), in anderen Ländern fand sich keine Assoziation (Kanada, USA, Norwegen, England, Frankreich, Türkei). In Deutschland gab es bisher noch keine Studie zu dieser Fragestellung. Die Ergebnisse aus anderen Ländern lassen sich nicht auf die deutsche Population übertragen, da sich Genotyp- und Allelfrequenzen unterscheiden und die genetischen Ursachen von NRD populationsspezifisch sein können. Daher soll die vorliegende Arbeit einen Beitrag dazu leisten, diesen wichtigen, bisher ungeklärten Aspekt für die deutsche Population zu erfassen, und die thermolabile Variante als NRD-Risikofaktor auf genetischer Ebene untersuchen. Neben dem Polymorphismus 677C→T soll auch der kürzlich als zusätzlicher Risikofaktor beschriebene Polymorphismus 1298A→C (A430E) auf eine Assoziation mit NRD geprüft werden. Da Fall-Kontroll-Studien aufgrund möglicher

Stratifikationseffekte angreifbar sind, soll zusätzlich eine familienbasierte Assoziationsstudie durchgeführt werden.

Die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen thermolabiler MTHFR und NRD ist von praktischer Relevanz, denn eine Assoziation hätte Auswirkungen auf die Vorsorgeberatung von Frauen mit Kinderwunsch. Frauen mit 677TT-Genotyp müßte dann gezielt zu einer Folsäureprophylaxe bereits vor Eintritt einer Schwangerschaft geraten werden.

1.4.2 Mutationssuchen in Entwicklungsgenen

In den letzten Jahren hat man durch Manipulation an bekannten Genen gezielt Tiermutanten erzeugt, von denen einige (z.T. überraschenderweise) einen NRD entwickelten. Diese Mutanten werden als Modelle für NRD beim Menschen angesehen. Die homologen humanen Gene sind Kandidaten für eine Beteiligung an der NRD-Entstehung beim Menschen. Diese Arbeit soll eine Auswahl dieser Gene auf ihre Rolle bei der Auslösung von humanen NRD untersuchen. Die zu untersuchenden Kandidatengene sind so gewählt, daß sie das Spektrum der an der Neurulation beteiligten Mechanismen repräsentieren. Dazu zählen extrinsische Kräfte wie die Unterstützung durch mesodermales Gewebe (*TWIST*, *CART1*) und intrinsische Kräfte wie Differenzierungsprozesse im Neuroectoderm (*NOGGIN*, *MSX2*) sowie die Auswanderung der Neuralleistenzellen (*SLUG*, *AP2 α*). *CART1* gilt zudem als wichtiges Kandidatengen für Folsäure-abhängige NRD, da Folsäure bei der entsprechenden Knock-out-Maus einen präventiven Effekt zeigte. Keines der gewählten Gene ist bisher beim Menschen auf einen Zusammenhang zu NRD analysiert worden.

Die Gene sollen mit Hilfe der Einzelstrang-Konformations-Analyse (SSCA) auf Sequenzveränderungen bei NRD-Patienten untersucht werden. Bereits bekannte Gen-Sequenzen bzw. Teilsequenzen sollen durch Datenbank-Recherche gefunden, zusammengesetzt und auf Inkongruenzen überprüft werden. Soweit noch nicht bekannt, soll die Exon-Intron-Struktur der humanen Gene bestimmt werden. Die Amplifikation jedes Gens soll so erfolgen, daß der gesamte kodierende Bereich einschließlich der Exon-Intron-Übergänge abgedeckt wird. Die amplifizierten Fragmente sollen dabei so entworfen werden, daß sich eine optimale Detektionssensitivität in der SSCA ergibt. Gefundene Sequenzveränderungen sollen auf eine Assoziation mit NRD getestet und in ihren möglichen Auswirkungen untersucht werden. Um eine Interaktion von Allelen verschiedener Gene zu prüfen, sollen die Genotypkombinationen aller Varianten zusammengestellt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Benutzte Chemikalien, Lösungen, Enzyme und Nucleinsäuren, die zu den Standardmaterialien eines molekularbiologischen S1-Labors gehören, werden hier nicht aufgeführt. Bei der Materialbestellung wurde eine Optimierung von hoher Qualität und niedrigen Kosten angestrebt.

2.1.1 Chemikalien

Hydrolink Long Ranger	FMC BioProducts, USA
MetaPhor Agarose	FMC BioProducts, USA

2.1.2 Enzyme

AmpliTaq	Perkin Elmer, USA
HotStarTaq	Qiagen, Hilden
Platinum Taq DNA Polymerase	Gibco BRL, USA
Taq DNA Polymerase	Amersham, UK
Vent DNA Polymerase	New England BioLabs, USA

2.1.3 Kitsysteme

Advantage-GC Genomic PCR Kit	Clontech, USA
Big Dye Terminator Kit	ABI, Weiterstadt
GeneAmp XL PCR Kit	Perkin Elmer, USA
Kristal Kit	Cambridge Mol. Tech.,
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden
TOPO TA Cloning	Invitrogen, USA

2.1.4 Geräte

Neben Geräten, die zur Grundausstattung eines S1-Labors gehören, wurden eingesetzt:

GeneAmp PCR System 9600 bzw. 2400	Perkin Elmer, USA
Trio Thermoblock TB1	Biometra, Göttingen
DGGE/SSCA-Kammer PhorU-2	Ingeny, Leiden, NL
Hoefer SE600 Elektrophorese Einheit	Amersham, Freiburg
automatischer Sequenzierer ABI 373 bzw. 310	Perkin Elmer, USA

2.1.5 Software

Textverarbeitung	Word 97, Microsoft FrameMaker 5.0, Adobe
Datenverwaltung	Excel 97, Microsoft Access 97, Microsoft
Primerdesign	Oligo 5.0, NBI
Statistik	StatXact 4, Cytel Software
Literaturverwaltung	EndNote 3.1, Niles Software
Grafik	PowerPoint 97, Microsoft CorelDraw 8, Eastman Kodak Photoshop 4.0, Adobe Illustrator 8.0, Adobe PageMaker 5.5, Adobe

2.2 Probanden und Kontrollen

Frau Prof. Dr. M.C. Koch (Marburg), Herr Dr. A. Ermert (Mainz), Frau Dr. E. Strehl (Erlangen), Frau Dr. E.T.K.M. Piecha-Ngo (Marburg) und Herr Dr. N. Kohlschmidt (Mainz) haben das Patientengut zusammengetragen. Im Rahmen einer Kooperation stellten Herr Dr. R.H. Finnell (Omaha, Nebraska) und Frau Dr. V. Capra (Genua) zusätzliche DNA-Proben von Probanden mit cranialen NRD zur Verfügung. Alle Personen wurden über die Intention dieser Studie informiert und ausschließlich nach Einverständniserklärung in die Untersuchungsgruppen aufgenommen. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Philipps-Universität Marburg geprüft und anerkannt.

Für diese Studie standen insgesamt 215 nicht miteinander verwandte Probanden mit nicht-syndromalem NRD sowie einige ihrer Eltern (128 Mütter, 99 Väter) zur Verfügung. Die NRD wurden in drei Kategorien zusammengefaßt: SBA (alle spinalen NRD außer SBO), Anencephalie (Anencephalie alleine oder in Kombination mit SB und Craniorhachischisis) und Encephalocele. Dies entspricht der üblichen und empfohlenen Einteilung (Elwood et al. 1992). Die meisten Probanden waren sporadische Fälle mit SBA. Eine Aufschlüsselung gibt Tab. 2-1.

Als Kontrollgruppe dienten 287 deutsche, repräsentativ rekrutierte, nicht verwandte männliche und weibliche Personen ohne NRD im Alter von 18 – 60 Jahren. Die einzelnen Untersuchungen umfaßten meistens weniger als die Gesamtzahl der Patienten und Kontrollen, weil die Proben über den gesamten Zeitraum gesammelt wurden.

Tabelle 2-1 Übersicht über das Probandenkollektiv und Aufschlüsselung nach verschiedenen Gesichtspunkten

		MR	Kooperation	gesamt
Probanden (Patienten + Feten)		188 (165 + 23)	27 (0 + 27)	215 (165 + 50)
Phänotyp	SBA	176	0	176
	Anencephalie + Craniorhachischisis	9	4	13
	Encephalocele	3	23	26
Auftreten	sporadisch	173	27	200
	familiär	15	0	15
	Geschwister	11		
	Eltern / Kind	1		
	Vetter 1°	1		
	Großeltern / Enkelkind	1		
	übrige Verwandtschaft	1		
Familienstruktur	Trios (Mutter, Vater, Kind)	98		
	zusätzliche Eltern-Kind-Paare	31		
	Patienten ohne Eltern	59		

MR = Marburger Patientengut

2.3 Methoden

2.3.1 Molekularbiologische Standardmethoden

Die folgenden Methoden sind Standardmethoden in der Molekularbiologie und wurden anhand der „Current Protocols in Human Genetics“ und der „Current Protocols in Molecular Biology“ durchgeführt (Ausubel et al. 1993; Dracopoli et al. 1997). Die Verwendung von Kits erfolgte nach Anleitung der Hersteller. Diese Techniken sollen deswegen hier nur aufgeführt aber nicht im einzelnen dargestellt werden.

- DNA-Isolierung aus Blut oder Gewebe durch Aussalzen und Ethanolfällung
- photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung
- Polymerasekettenreaktion (PCR)
- Restriktionsspaltung von PCR-Produkten
- Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose- und Polyacrylamidgelelektrophorese
- Visualisierung aufgetrennter DNA-Fragmente mit Ethidiumbromid oder Silbernitrat
- Extraktion von DNA aus Agarosegelen
- RNA-Isolierung aus Blut (RNeasy Blood Mini Kit)
- cDNA-Synthese (Superscript)
- Klonierung von PCR-Produkten in Plasmid-Vektoren (TOPO TA Cloning Kit)
- Transformation in *E. coli*
- Präparation von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse

2.3.2 PCR-Optimierung

Das Primerdesign erfolgte mit Hilfe der Programme Primer 0.5 (Whitehead Institute) und Oligo 5.0 (NBI). Alle PCRs wurden auf möglichst spezifische und hohe Ausbeute optimiert. Die optimalen Bedingungen (Annealing-Temperatur, Puffer, *Taq*-Polymerase, Zykluszahl) sind abhängig von der Sequenz, insbesondere dem GC-Gehalt der Primer und des Templates und mußten empirisch ermittelt werden (McPherson et al. 1991). Bei der Zusammensetzung des Reaktionspuffers wurde vor allem die Konzentration an Mg^{2+} -Ionen variiert. Ist sie zu hoch, entstehen unspezifische Produkte; ist sie zu gering, verringert sich die Ausbeute. Unspezifische PCR-Produkte wurden auch durch Zugabe denaturierend wirkender Agenzien (z.B. DMSO, Formamid, Betain, Glycerol) eliminiert (Sarkar et al. 1990; Henke et al. 1997). Dabei wurde darauf geachtet, daß die Zusätze das SSCA-Laufmuster nicht verschlechterten. *Taq*-Polymerasen verschiedener Hersteller

zeigten bei ansonsten gleichen Bedingungen unterschiedliche Ergebnisse und wurden bei der Optimierung miteinbezogen. Bei problematischen PCRs wurde die Hot Start- (Chou et al. 1992) oder die Touchdown-Methode (Don et al. 1991) angewendet. Die Zykluszahl wurde bei guter Ausbeute möglichst gering gehalten, da hohe Zykluszahlen die Gefahr bergen, daß anfänglich falsch eingebaute Nucleotide in weiteren Zyklen exponentiell vervielfältigt werden.

2.3.3 SSCA (Single-stranded conformational analysis)

Zur Mutationssuche in den ausgewählten Kandidatengen wurde die nichtradioaktive Einzelstrang-Konformations-Analyse eingesetzt (Orita et al. 1989; Chaubert et al. 1993). Das Prinzip der SSCA beruht darauf, daß die Migration einzelsträngiger DNA in der Elektrophorese abhängig ist von der Sekundärstruktur, die wiederum bestimmt wird durch die Nucleotidsequenz (Primärstruktur). Ein einziger Basenaustausch kann die Sekundärstruktur und damit das Laufmuster ändern. Die Sensitivität der SSCA nimmt bei sehr großen (> 400 bp) und sehr kleinen (< 130 bp) PCR-Produkten ab (Sheffield et al. 1993).

Das jeweilige Kandidatengen wurde aus genomischer DNA mit PCR so amplifiziert, daß überlappende Produkte von möglichst nicht mehr 260 bp entstanden. Diese wurden denaturiert und auf ein nicht-denaturierendes PAA-Gel (12%, 49:1) aufgetragen. Die SSCA-Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur und im Kühlraum (4°C) durchgeführt und die Gele anschließend silbergefärbt (Budowle et al. 1991). Aberrante Banden wurden ausgestochen, reamplifiziert und sequenziert.

Die SSCA-Bedingungen wurden zunächst allgemein optimiert (Gelkonzentration, Laufpuffer, Temperatur) und später für jedes PCR-Produkt feinadjustiert (aufgetragene Menge, Ladepuffer, Spannung, Laufzeit) (Glavac und Dean 1993; Hongyo et al. 1993). Um die Effizienz des Mutations-Screenings zu steigern, wurden für alle Arbeitsschritte 96-Lochplatten benutzt und Multiplex-SSCAs mit bis zu vier Produkten durchgeführt.

2.3.4 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruchmethode (Sanger et al. 1977). In die Sequenzreaktion mit dem Big Dye Kit (ABI) wurde in Doppelansätzen für beide Richtungen das gereinigte PCR-Produkt mit je einem Primer eingesetzt. Die Sequenzierung erfolgte auf einem automatischen Sequenziergerät (ABI 373 bzw. 310, Perkin Elmer) unter Benutzung der zugehörigen Software (Sequencher und Sequence Navigator von Gene Codes, Ann Arbor).

2.3.5 Direkter Nachweis bekannter Mutationen

2.3.5.1 ARMS (Amplification refractory mutation system)

Bekannte Punktmutationen können in einer PCR mit allelspezifischen Primern nachgewiesen werden. Darauf beruht der ARMS-Test, bei dem zwei PCR-Reaktionen parallel ausgeführt werden (Newton et al. 1989). In einem Ansatz befindet sich ein wildtypspezifischer Primer, im anderen ein mutationsspezifischer Primer. Ihre terminalen Basen sind komplementär zur Wildtyp- bzw. mutierten Sequenz. Der zweite Primer ist in beiden Ansätzen gleich. Ein Template generiert in dem einen und/oder anderen Ansatz ein Produkt, je nachdem ob es das Wildtyp- und/oder das mutierte Allel enthält. Mit dem ARMS-Test wurden die *MTHFR*-Polymorphismen haplotypisiert und die in den Entwicklungsgenen gefundenen Punktmutationen verifiziert.

2.3.5.2 RFLP (Restriction fragment length polymorphism)

Bekannte Punktmutationen, die eine Restriktionsschnittstelle verändern (einführen oder zerstören), wurden durch PCR mit flankierenden Primern und anschließenden Restriktionsverdau nachgewiesen. Auf diese Weise wurden die *MTHFR*-Polymorphismen 677C→T und 1298A→C untersucht. 677C→T führt eine neue *HinfI*-Schnittstelle ein, 1298A→C zerstört eine vorhandene *MboII*-Schnittstelle.

2.3.6 Statistische Methoden

Zur Entscheidung, ob ein genetisches Merkmal ein Risikofaktor ist, wurden übliche statistische Verfahren angewandt (Terwilliger und Ott 1994). Dabei wurde untersucht, ob die Unterschiede zweier Stichproben durch zufallsbedingte Streuung zu erklären waren (Nullhypothese H_0) oder ob tatsächlich ein Effekt vorlag (Alternativhypothese H_1). Mit einem statistischen Test (χ^2 , Fisher, McNemar, Cochran-Armitage) wurde aus den Beobachtungsdaten die jeweilige Testgröße errechnet und der zugehörige p-Wert ermittelt. Der p-Wert ist die Wahrscheinlichkeit, mit der sich die vorliegenden Ergebnisse (oder noch extremere) zufällig ergeben könnten, d.h. der p-Wert ist die Wahrscheinlichkeit, mit der man sich irrt, wenn man die Nullhypothese H_0 ablehnt. Wenn diese Wahrscheinlichkeit gering ist (kleiner als das zuvor vereinbarte Signifikanzniveau α), wird H_0 verworfen und das Ergebnis als statistisch signifikant bezeichnet. Meist (so auch in der vorliegenden Arbeit) setzt man $\alpha = 0,05$.

Außerdem wurden Odds Ratio (OR) und Konfidenzintervall (CI) berechnet. Die OR gibt an, um welchen Faktor das Krankheitsrisiko einer Person steigt, wenn sie Träger eines bestimmten Allels oder Genotyps ist. Bei Krankheiten mit niedriger Prävalenz (wie hier bei NRD) wird die OR gleich dem Relativen Risiko. Um die Genauigkeit der OR beurteilen zu können, wurde das zugehörige CI angegeben. Ein CI ist der Wertebereich, der mit einer vorgegebenen Vertrauenswahrscheinlichkeit ($1 - \alpha$) die wahre OR enthält. Ein großes CI ist Indiz für eine starke Variabilität der Daten. Enthält das CI die 1, ist das Ergebnis nicht signifikant. Da wie üblich eine Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$ gewählt wurde, werden 95% CI angegeben.

2.3.6.1 Fall-Kontroll-Vergleich

In Fall-Kontroll-Vergleichen wird geprüft, ob ein genetische Merkmal mit dem Krankheitsphänotyp assoziiert ist, das heißt ob es bei Betroffenen signifikant häufiger auftritt als bei Nicht-Betroffenen (Gambaro et al. 2000). Die Genotypfrequenzen von Betroffenen und Nicht-Betroffenen wurden mit dem Cochran-Armitage Trend-Test verglichen (Agesti 1991). Bei diesem Test werden alle drei Genotypen (homozygot wildtyp $-/-$, heterozygot $+/-$, homozygot mutiert $+/+$) miteinbezogen.

2.3.6.2 Familien-Analyse

Auch in familienbasierten Assoziationsstudien wird geprüft, ob ein spezifisches Allel bei erkrankten Personen überzufällig häufig auftritt. Es wurden Kernfamilien mit einem betroffenen Kind untersucht und aus den nicht transmittierten Allelen der beiden Eltern interne Kontrollen gebildet (Abb. 2-1). Dadurch waren Stratifikationseffekte wie bei Fall-Kontroll-Vergleichen mit externen Kontrollen ausgeschlossen.

Mit dem TDT (Transmission disequilibrium test; Spielman et al. 1993) wurde geprüft, ob ein bestimmtes Allel überzufällig häufig von heterozygoten Eltern an ihr betroffenes Kind transmittiert wurde (Tab. 2-2). Der TDT ist ein kombinierter Kopplungs-Assoziationstest. Er detektiert eine Assoziation nur, wenn Kopplung vorhanden ist, und umgekehrt. Sind genetischer Marker und Krankheit nicht gekoppelt oder nicht assoziiert, erwartet man eine Transmissionsrate von 50%. Die berechnete Prüfgröße ist χ^2 :

$$\chi^2 = \frac{(\text{Anzahl der transmittierten Allele} - \text{Anzahl der nicht transmittierten Allele})^2}{(\text{Anzahl der transmittierten Allele} + \text{Anzahl der nicht transmittierten Allele})} = \frac{(b - c)^2}{(b + c)}$$

Der p-Wert wurde nach dem exakten McNemar-Test berechnet. Bei der Analyse von Haplotypen mehrerer Polymorphismen wurde der multiallelische TDT angewendet und als Teststatistik T_{mhet} berechnet (Kaplan et al. 1997).

Ein signifikantes TDT-Ergebnis bedeutet, es liegt Kopplung *und* Assoziation vor. Ein nichtsignifikantes TDT-Ergebnis bedeutet, es liegt keine Kopplung *oder* keine Assoziation vor.

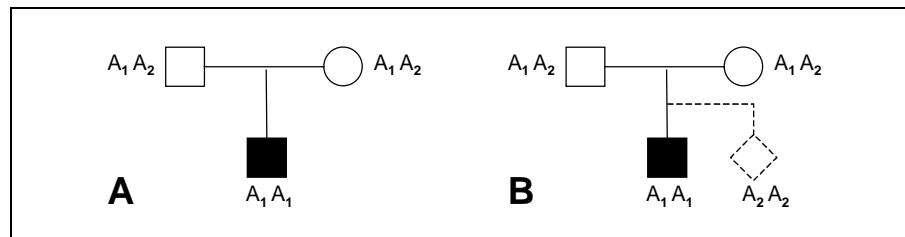


Abbildung 2-1 Familienbasierte Assoziationsstudie

(A) Trios aus Mutter, Vater und betroffenem Kind wurden genotypisiert. **(B)** Die transsmittierten Allele A_1A_1 dienen als Fälle, die nicht transsmittierten Allele A_2A_2 als fiktive interne Kontrollen. Damit entstammten die Kontrollen exakt derselben Population wie die Fälle, anders als bei Fall-Kontroll-Studien mit realen Kontrollpersonen.

Tabelle 2-2 Vierfeldertafel im TDT

		nicht-transsmittierte Allele		
		A_1	A_2	gesamt
transsmittierte Allele	A_1	a	b	a + b
	A_2	c	d	c + d
gesamt		a + c	b + d	2n

Bei n Familien wurde für die 2n Eltern untersucht, welches der beiden Markerallele A_1 und A_2 sie jeweils an ihr betroffenes Kind transsmittiert hatten und welches nicht. Von den insgesamt 4n Allelen werden 2n transsmittiert und 2n nicht transsmittiert. Homozygote Eltern (a + d) sind nicht informativ. Unter der Nullhypothese wird erwartet, daß heterozygote Eltern beide Allele gleich häufig transsmittieren (b = c).

2.3.6.3 Mutter-Kind-Paare

Um zu beurteilen, ob eine bestimmte Mutter-Kind-Genotypkombination überzufällig häufig vorkam, wurde die beobachtete Genotypverteilung mit erwarteten Werten verglichen. Die Erwartungswerte wurden aufgrund der Genotypverteilung in der Kontrollgruppe unter Hardy-Weinberg-Gleichgewicht berechnet. Beobachtete und erwartete Genotypfrequenzen wurden mit einem χ^2 -Test verglichen.

2.3.7 Sicherheitsmaßnahmen

Bei allen gentechnischen Arbeiten wurden die Vorschriften des Gentechnikrechts eingehalten. Die Materialverarbeitung und die Auswertung von personengebundenen Daten wurde durch zufallsbedingte Identifikationsnummern verschlüsselt und gemäß Datenschutzgesetz gehandhabt.

2.4 Untersuchung der einzelnen Kandidatengene

Im *MTHFR*-Gen wurden zwei bekannte Punktmutationen durch RFLP-Analyse untersucht. Die Entwicklungsgene *SLUG*, *CART1*, *NOGGIN*, *TWIST*, *AP2 α* und *MSX2* wurden mit SSCA auf unbekannte Mutationen gescreent. Dazu wurde der gesamte kodierende Bereich einschließlich der Spleißstellen in überlappenden Fragmenten mit PCR amplifiziert. Tab. 2-3 stellt die jeweilige Größe der untersuchten Personengruppen zusammen.

Tabelle 2-3 Anzahl der untersuchten Probanden und Kontrollen

Gen	Patienten	Feten	Kontrollen
<i>MTHFR</i>	148	18	174
<i>SLUG</i>	145	5	136
<i>CART1</i>	152	21	166
<i>NOGGIN</i>	150	20	239
<i>TWIST</i>	130	0	0
<i>AP2α</i>	150	20	146
<i>MSX2</i>	150	50	232

2.4.1 MTHFR

Im Gen der MTHFR wurden gezielt zwei bereits beschriebene Polymorphismen untersucht: 677C→T in Exon4 (Frosst et al. 1994) und 1298A→C in Exon7 (van der Put et al. 1998). Beide verändern Restriktionsschnittstellen und ließen sich durch Restriktionsverdau des entsprechenden PCR-amplifizierten Fragments nachweisen (Abb. 2-2). Durch 677C→T entsteht eine *Hinfl*-Schnittstelle, so daß das 198 bp große PCR-Produkt in zwei Fragmente (175 und 23 bp) gespalten wird. Durch 1298A→C wird eine von vier *MboII*-Schnittstellen im 163 bp großen PCR-Produkt zerstört, so daß statt zwei Fragmenten (56 und 18 bp) ein Fragment (84 bp) entsteht. Die Verdaufragmente wurden durch Gelelektrophorese aufgetrennt: das *Hinfl*-verdaute 677-Fragment in einem 8%igen nichtdenaturierenden PAA-Gel, das *MboII*-verdaute 1298-Fragment in einem 5%igen MetaPhor-Agarose-Gel. Die Färbung erfolgte in beiden Fällen mit Ethidiumbromid.

Zur Haplotypisierung kombiniert Heterozygoter (677CT-1298AC) wurde eine genetische Stammbaumanalyse durchgeführt. Bei uninformativer oder nicht vorhandener Familie wurde ein neuentwickelter ARMS-Test angewendet (Abb. 2-3). Dazu wurde mit allelspezifischen Primern in zwei Ansätzen das 677T- oder das 677C-Allel amplifiziert. Der in beiden Fällen eingesetzte reverse Primer 7r umfaßte die Stelle 1298. Das resultierende PCR-Produkt (etwa 2,1 kb) wurde als Template in eine Semi-nested PCR mit den die 1298-Stelle flankierenden Primern 7f und 7r eingesetzt. Die Base an der Stelle 1298 wurde, wie oben beschrieben, durch *MboII*-Verdau bestimmt.

Für einen Fall-Kontroll-Vergleich an der Stelle 677C/T (1298A/C) wurden 137 (148) SBA-Patienten und 153 (174) Kontrollpersonen genotypisiert und haplotypisiert, für eine Familien-Analyse 72 (77) Trios (Mutter, Vater, betroffenes Kind) und für die Analyse der kombinierten Genotypverteilung 106 (110) Mutter-Kind-Paare.

Tabelle 2-4 Primer zur Untersuchung der *MTHFR* Polymorphismen 677C→T und 1298A→C

Primer	Sequenz 5' → 3'	Annealing	Literatur
4f	tgaaggagaaggtgtctgcggga	60°C	Frosst et al. 1994
4r	aggacggtgcggtgagagtg		
7f	ctttggggagctgaaggactactac	57°C	van der Put et al. 1998
7r	cactttgtgaccattccggtttg		
ARMS 677C wt	agcacttgaaggagaaggtgtctgcgggaac	59°C	Stegmann et al. 1999a
ARMS 677T mut	agcacttgaaggagaaggtgtctgcgggaat		

Annealing = Anlagerungstemperatur in der PCR

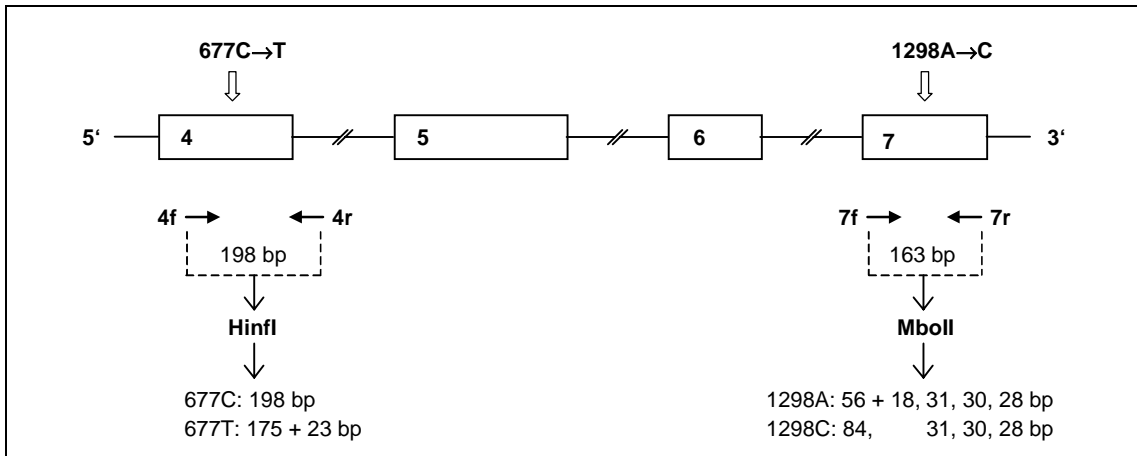


Abbildung 2-2 Nachweis der MTHFR-Polymorphismen 677C→T und 1298A→C

Beide Polymorphismen wurden durch flankierende Primer amplifiziert (4f + 4r bei 677C/T bzw. 7f + 7r bei 1298A/C) und die PCR-Produkte einem Restriktionsverdau (*HinfI* bei 677C/T bzw. *MboII* bei 1298A/C) unterworfen. Die Verdaufragmente wurden gelelektrophoretisch getrennt (8% PAA bei 677C/T bzw. 5% MetaPhor bei 1298A/C) und mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

Literatur zur genomischen Struktur: Goyette et al. 1998

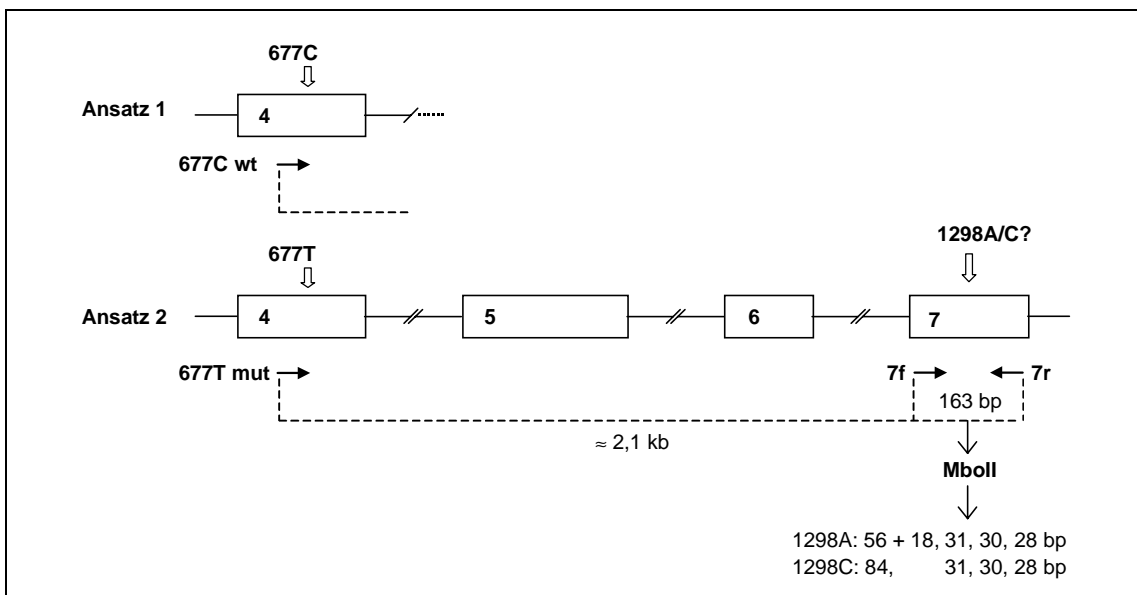


Abbildung 2-3 ARMS-Test zur Haplotypisierung MTHFR 677CT-1298AC-Heterozygoter

Die allelspezifischen Primer wurden so konzipiert, daß die letzte Base am 3'-Ende komplementär war entweder zur Wildtyp-Sequenz 677C (ARMSwt) oder zur mutierten Sequenz 677T (ARMSmut). Zusätzlich wurde zur Erhöhung der Spezifität an der vorletzten Base ein AC-Mismatch eingeführt. Die allelspezifische PCR (ARMS 677wt/mut + 7r) ergab ein Produkt von etwa 2,1 kb, das als Template in eine Semi-nested PCR (7f + 7r) eingesetzt wurde. Das Produkt der Semi-nested PCR wurden in einem *MboII*-Restriktionsverdau analysiert.

2.4.2 SLUG

SLUG kodiert einen Zinkfinger-Transkriptionsfaktor der Snail-Familie und besteht aus drei Exons (Cohen et al. 1998; Stegmann et al. 1999b). Die fünf im Tandem angeordneten Zinkfinger werden von Exon 2 und 3 kodiert. Unmittelbar vor der Zinkfingerdomäne befindet sich ein 29 Aminosäuren langer Abschnitt, der typisch ist für die Slug-Unterfamilie (Sefton et al. 1998).

Für die Mutationssuche wurden neun PCR-Fragmente von 169 bis 267 bp Größe generiert und mit SSCA analysiert (Abb. 2-5, Tab. 2-5).

Zur Verifizierung der gefundenen Mutation 1548C→A (D119E) wurde ein ARMS-Test entwickelt. Dabei wurde mit allelspezifischen Primern in zwei Ansätzen entweder das Wildtyp- oder das mutierte Allel amplifiziert. (Abb. 2-4).

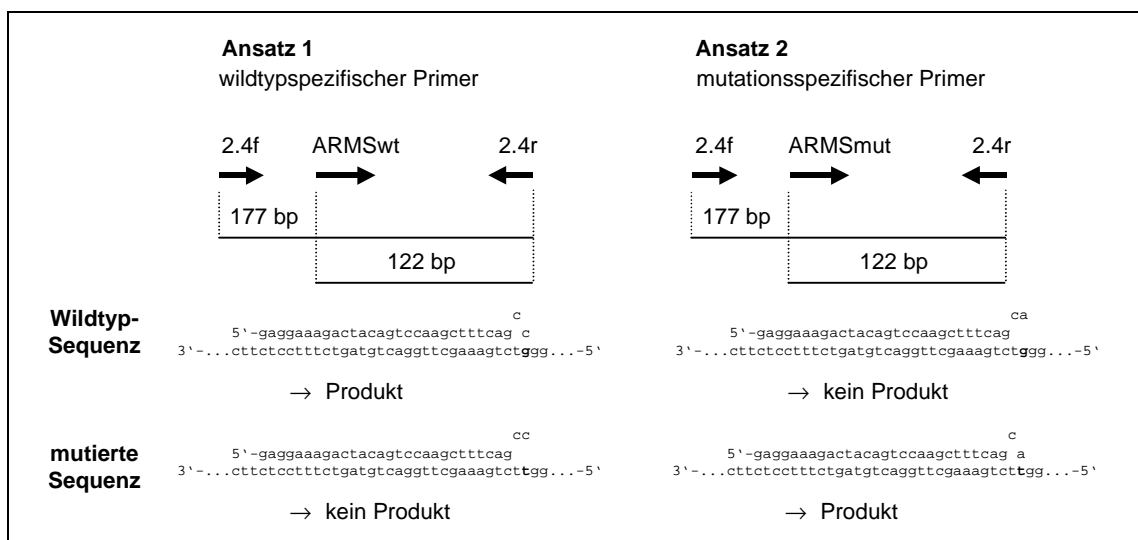


Abbildung 2-4 ARMS-Test zum alternativen Nachweis der *SLUG*-Mutation 1548C→A (D119E)

Die letzte Base am 3'-Ende der allelspezifischen ARMS-Primer war komplementär zur Wildtyp-Sequenz 1548C (ARMSwt) oder zur Mutation 1548A (ARMSmut). Zur Erhöhung der Spezifität wurde an der vorletzten Base ein zusätzliches CT-Mismatch eingeführt.

Jeder Ansatz enthielt drei Primer: 2.4f, 2.4r und einen allelspezifischen Primer (ARMSwt oder ARMSmut). 2.4f und 2.4r generierten ein 177 bp großes Kontrollfragment. Das 122 bp große allelspezifische Fragment entstand nur dann, wenn das Template die zum ARMS-Primer passende Sequenz hat.

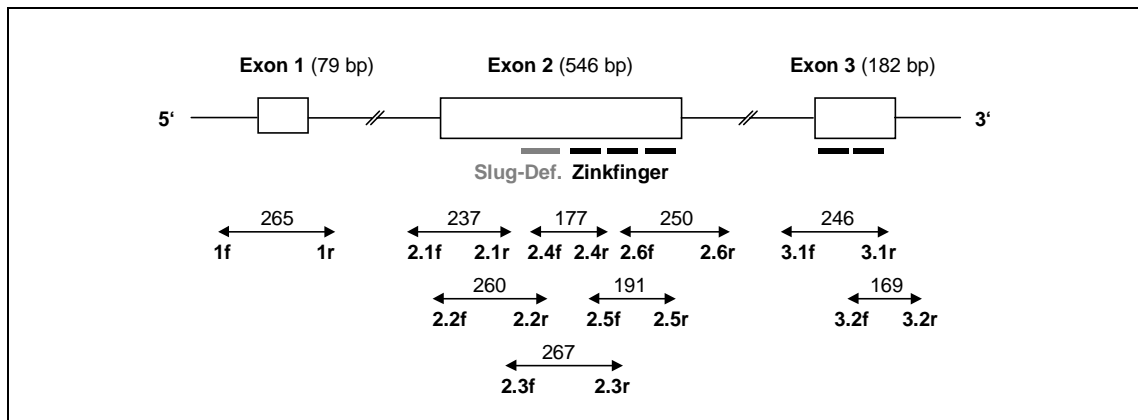


Abbildung 2-5 *SLUG*-Genstruktur, Lage der zum SSCA-Screen verwendeten Primer und Größe der PCR-Produkte

Die fünf Zinkfinger werden von Exon 2 und 3 kodiert. Unmittelbar vor dem Zinkfingerbereich liegt die sogenannte Slug-definierende Region, ein 29 Aminosäuren langer Abschnitt, der bei den Homologen aller Vertebraten konserviert ist und die Slug-Subfamilie von den übrigen Mitgliedern der Snail-Familie unterscheidet. Literatur: Cohen et al. 1998; Stegmann et al. 1999b. Acc.No. AF084243.

Tabelle 2-5 *SLUG*-Primerpaare für den SSCA-Screen

Primer	Sequenz 5' → 3'	Primer	Sequenz 5' → 3'	Annealing	Zusatz
SLU1f	gatgctgtagggaccgccgtg	SLU1r	ggaaaacagttgaatctttggc	55°C	-
SLU2.1f	tgctaaatatctttccagtgtg	SLU2.1r	agagaggccattgggtag	55°C	-
SLU2.2f	ttcccagtgattatttccc	SLU2.2r	tcctcttcactcactaatggg	54°C	-
SLU2.3f	tggcctctctcctctttc	SLU2.3r	ctgaaagattttctagactggg	55°C	-
SLU2.4f	atctgacacctcctccaag	SLU2.4r	tgcagctgcttatgtttggcc	58°C	-
SLU2.5f	acctattcaactttttctgg	SLU2.5r	aaccagggctctggaaaac	52°C	-
SLU2.6f	ccagtctagaaaatctttcagc	SLU2.6r	cacaacttcattgcaaatcc	53°C	Mg ²⁺
SLU3.1f	tgctgcttctcattatttaa	SLU3.1r	tctggagaaggttttggag	52°C	-
SLU3.2f	tcattctgcagaccattctg	SLU3.2r	gcttcggagtgaagaaatgc	56°C	-

2.4.3 *CART1*

CART1 kodiert einen Homöodomänen-Transkriptionsfaktor. Bisher war nur die cDNA-Sequenz bekannt (Gordon et al. 1996). Zur Bestimmung der genomischen Struktur wurden PCR-Fragmente generiert, die die Introns enthielten. Sie wurden in Vektoren kloniert, TOP10-Zellen damit transformiert und die Exon-Intron-Übergänge mit vektorspezifischen Primern sequenziert. In der SSCA wurde der kodierende Bereich von *CART1* in 8 überlappenden PCR-Produkten untersucht (Tab. 2-6).

Tabelle 2-6 *CART1*-Primerpaare für den SSCA-Screen und die Amplifizierung der Introns

Primer	Sequenz 5' → 3'	Primer	Sequenz 5' → 3'	Anneal.	Produkt
CART1f	agcgctctccagtttctgtg	CART1r	ctccagaggacctcctgc	56°C	139 bp
CART2f	atggagtttctgagcgagaag	CART2.1r	gctgctgtcctgacagggcg	57°C	225 bp
CART15f	aaagcgtctgcaggcaaat	CART15r *	tcgctcccacttttctcctt	59°C	206 bp
CART16f *	cctgagaactgttgtttttcct	CART16r	cgtatcacatttatcccccaagt	56°C	184 bp
CART3f	aggacagccccttcacaccga	CART4r	cggtgcctccgtttcttac	57°C	156 bp
CART17f	gaagggagagctggatgaac	CART17r *	atcccatccatcaaggcctc	56°C	230 bp
CART10f	cggacagattccagttacac	CART11r	acatggcccatgaaatattg	57°C	211 bp
CART16f	gaggtcttccagtatcgag	CART12r-2	tccacacacagcagcttattg	56°C	167 bp
CARTi-13f	gtgcgcttggagaggacc	CARTi-13r	cacgggagacattcggagac	67°C	Intron 1
CARTi-5f	actcattaccggatgtg	CARTi-7r	tcgcttggtgtatttggc	54°C	Intron 2
CARTi-8f	atcagttttgccaaggac	CARTi-11r	ctgtccgaggcgagtgag	57°C	Intron 3

* = intronisch; Anneal. = Annealing: Anlagerungstemperatur in der PCR

2.4.4 NOGGIN

NOGGIN ist ein Signalpeptid von 232 Aminosäuren, das von einem einzigen Exon kodiert wird (Valenzuela et al. 1995). Für den SSCA-Screen wurden sechs überlappende PCR-Produkte zwischen 154 und 219 bp generiert (Abb. 2-6, Tab. 2-7).

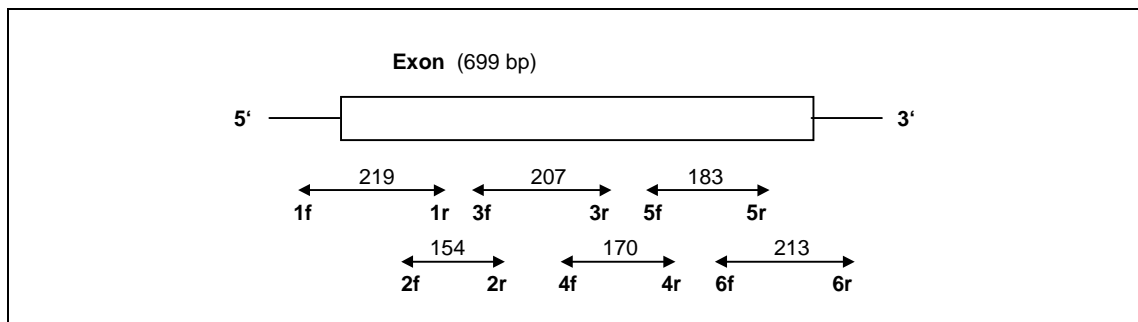


Abbildung 2-6 *NOGGIN*-Genstruktur, Lage der zum SSCA-Screen verwendeten Primer und Größe der PCR-Produkte

Literatur: Valenzuela et al. 1995. Acc.No. U31202.

Tabelle 2-7 *NOGGIN*-Primerpaare für den SSCA-Screen

Primer	Sequenz 5' → 3'	Primer	Sequenz 5' → 3'	Annealing	Zusatz
NOG1f	agcgcggcggcgccgcgggctcg	NOG1r	gaggtccaccaggggcaggttg	58°C	DMSO 10%
NOG2f	agcactatctccacatccgc	NOG2r	atgaagcctgggtcgtagtg	58°C	DMSO 10%
NOG3f	acccaaggaaaaggatctg	NOG3r	ctagccctttgatctcgctc	55°C	DMSO 10%
NOG4f	gagctggaccagctgctg	NOG4r	tacagcacggggcagaat	57°C	DMSO 10%
NOG5f	aagctgcccaggaaattaca	NOG5r	gaggtgcacggacttggac	59°C	DMSO 10%
NOG6f	gcagctgcttcagtaagcg	NOG6r	aggatcaagtgtccgggtg	58°C	DMSO 10%

2.4.5 TWIST

TWIST ist ein basischer Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktor, der von einem einzigen Exon kodiert wird (Bourgeois et al. 1996). Das *TWIST*-Gen ist extrem GC-reich. Daher wurden für die SSCA bereits veröffentlichte Primer verwendet. Die PCR-Produkte waren größer als für eine optimale Detektionssensitivität angestrebt. Ein Produkt wurde deshalb vor der SSCA durch Restriktionsverdau mit *RsaI* gespalten (Abb. 2-7, Tab. 2-8).

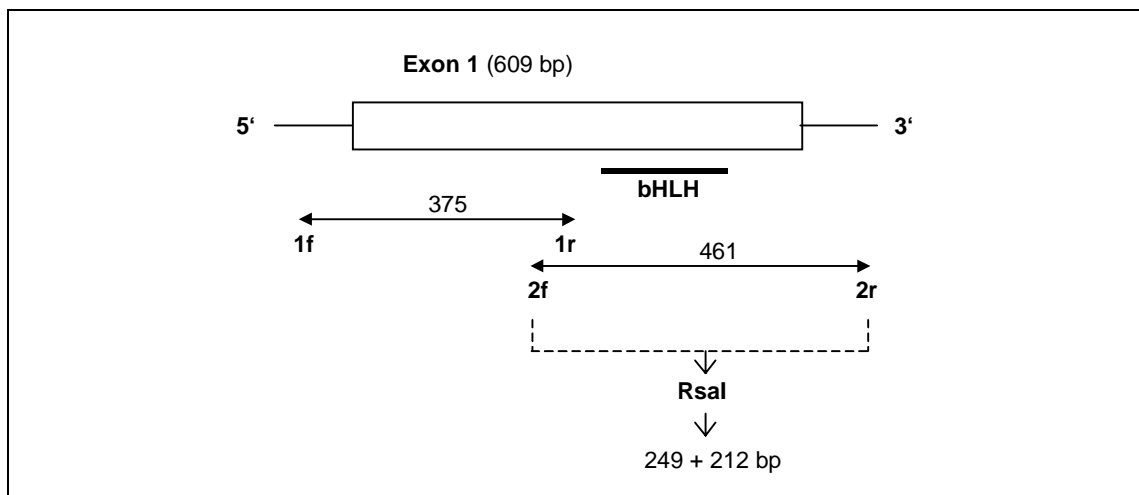


Abbildung 2-7 *TWIST*-Genstruktur, Lage der zum SSCA-Screen verwendeten Primer und Größe der PCR-Produkte

Das Produkt aus 2f + 2r wurde vor der SSCA mit *RsaI* in zwei Fragmente von 249 und 212 bp Größe gespalten. Acc.No. U80998

Tabelle 2-8 *TWIST*-Primerpaare für den SSCA-Screen

Primer	Sequenz 5' → 3'	Annealing	Zusatz	Literatur
TWIST1f	gaggcgccccgctcttctcc	61°C	DMSO 10%	Howard et al. 1997
TWIST1r	agctcctcgtaagactgaggac			
TWIST2f	gcaagcgcggaagaagtct	63°C	DMSO 5%	El Ghouzzi et al. 1997
TWIST2r	gggtgcagcggcgcggtc			

2.4.6 *AP2 α*

AP2 α kodiert einen Transkriptionsfaktor und besteht aus 7 Exons, die sich über einen genomischen Bereich von 18 kb erstrecken (Bauer et al. 1994). Exon2 kodiert die Prolin- und Glutamin-reiche Transaktivierungsdomäne am N-Terminus. Exon 4 bis 7 kodieren eine basische Helix-Span-Helix(HSH)-Domäne am C-Terminus, die die Homodimerisierung und DNA-Bindung vermittelt (Williams und Tjian 1991). Durch alternatives Spleißen entstehen zwei verschiedene Transkripte: das Gesamtlängen-Protein *AP2 α A* und das verkürzte Protein *AP2 α B* mit einem alternativen C-Terminus (Buettner et al. 1993). Dem alternativen B-Protein fehlt der größte Teil der HSH-Domäne, so daß es nicht an DNA binden kann und wahrscheinlich eine inhibierende Funktion hat. Für die SSCA wurden Primer so gelegt, daß 18 überlappende PCR-Produkte zwischen 152 und 250 bp entstanden und beide Transkripte vollständig abgedeckt waren (Abb. 2-8, Tab. 2-9).

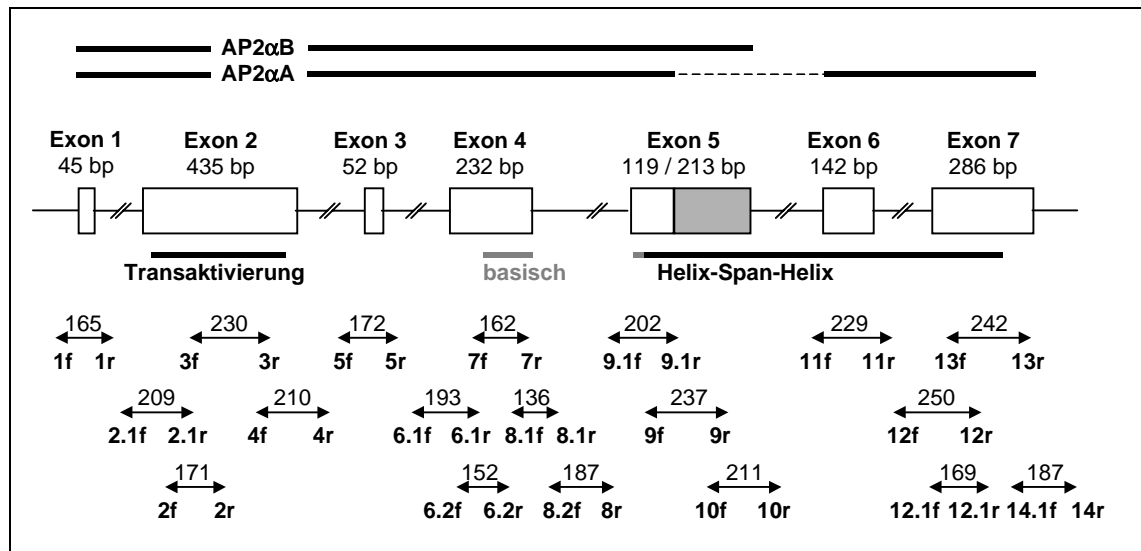


Abbildung 2-8 AP2α-Genstruktur, Lage der zum SSCA-Screen verwendeten Primer und Größe der PCR-Produkte

AP2αA ist das vollständige Protein. Durch Überlesen der Spleißstelle in Exon 5 entsteht alternativ das verkürzte Transkript AP2αB. Die Prolin- und Glutamin-reiche Transaktivierungsdomäne wird von Exon 2 kodiert. Die Helix-Span-Helix-Domäne besteht aus zwei α-Helices mit einem 82 Aminosäure langen Abschnitt (*Span*) dazwischen und vermittelt die Homodimerisierung. Sie wird von Exon 5 bis 7 kodiert. Unmittelbar davor (kodiert von Exon 4 und 5) liegt eine Arginin- und Lysin-reiche basische Domäne, die für die DNA-Bindung notwendig ist. Literatur: Bauer et al. 1994. Acc.No. X77343.

Um optimale SSCA-Laufmuster zu erhalten, wurden für das PCR-Produkt 12 je nach Untersuchungstemperatur verschiedene Alternativen eingesetzt: 12f + 12r bei Raumtemperatur, 12.1f + 12.1r im Kühlraum. Das PCR-Produkt 7f + 7r überlappte vollständig mit angrenzenden Produkten, wurde aber wegen des besonders aussagekräftigen SSCA-Laufmusters zusätzlich untersucht.

Tabelle 2-9 AP2α-Primerpaare für den SSCA-Screen

Primer	Sequenz 5' → 3'	Primer	Sequenz 5' → 3'	Annealing	Zusatz
AP1f	gtagaggtgagaccgag	AP1r	gaggaggagaggagggtc	56°C	-
AP2.1f	tgtcaagtggattttgtgtgg	AP2.1r	aagtatgggggctggaagtc	56°C	-
AP2f	ttctaggaccgtcacgacg	AP2r	ttgcgactggggtagatag	52°C	-
AP3f	gactccagccccatactt	AP3r	ctgtagtcctgcgaggatc	53°C	DMSO 5%
AP4f	gctgcctcaccagctgtc	AP4r	ccaggatcctttctggggt	56°C	-
AP5f	ctcccatcttcaggaata	AP5r	tcctgtaaggacatgcttg	56°C	-
AP6.1f	agaatttcagagccggacg	AP6.1r	tgtaaataggatggcggag	54°C	DMSO 5%
AP6.2f	ctgtccaagtccaacagcaa	AP6.2r	gccaccgtgacctgtactt	55°C	-
AP7f	ctccgcatccctattaaca	AP7r	agacactcgggtggtgagag	56°C	-
AP8.1f	ctgttcagttccgggtcg	AP8.1r	ctcactccgggagactcc	51°C	DMSO 5%
AP8.2f	acccgagtgtctcaacgc	AP8r	ctctacgctcttctccccg	54°C	DMSO 10%
AP9.1f	ttaatgtggtgcagagaacct	AP9.1r	tagcaagtggattcgcttacc	55°C	-
AP9f	gctgccaacgttacccctg	AP9r	aaagaaggaagaaggatggagg	53°C	-
AP10f	atggcaaaaagaacatttgc	AP10r	atggtcacgcatttctaaacg	54°C	DMSO 5%
AP11f	cccactcttctctctctcgc	AP11r	cgaagacacagagaccccat	60°C	-
AP12f	ctgtctgtctctggggtcttg	AP12r	gtcaagcagctctggatgc	57°C	-
AP12.1f	ctgcccatagtggagcctta	AP12.1r	gaggttgaagtgggtcaagc	57°C	-
AP13f	tggctcaggaccgatctc	AP13r	ctctttgtcactgcttttggc	56°C	-
AP14.1f	ggccatggacaaaatgtacc	AP14r	ggaagggttgcctgatccc	50°C	-

2.4.7 MSX2

MSX2 ist ein Homöobox-Gen, das einen Transkriptionsfaktor kodiert und aus 2 Exons besteht (Jabs et al. 1993). Exon1 kodiert die Transaktivierungsdomäne, Exon2 die Homöodomäne.

Der gesamte kodierende Bereich wurde in sechs überlappenden PCR-Fragmenten von 208 bis 252 bp Größe amplifiziert und mittels SSCA auf Sequenzabweichungen untersucht (Abb. 2-9, Tab. 2-10).

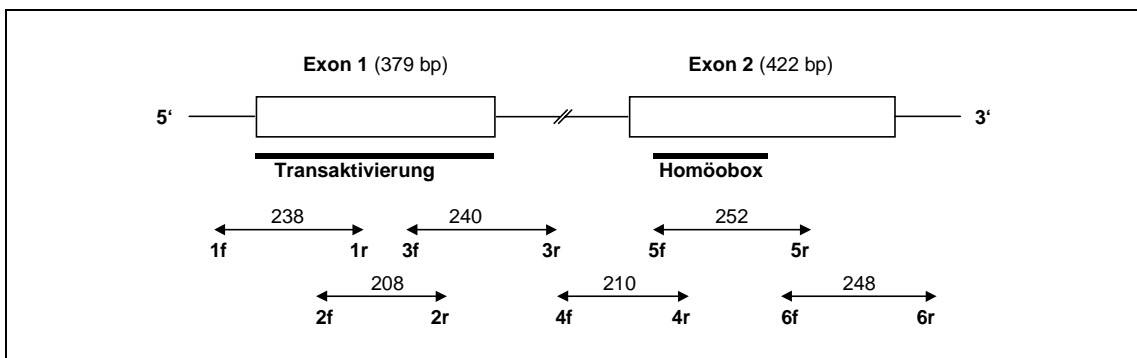


Abbildung 2-9 MSX2-Genstruktur, Lage der zum SSCA-Screen verwendeten Primer und Größe der PCR-Produkte

Exon1 kodiert die Transaktivierungsdomäne (127 AS), Exon2 die Homöodomäne (60 AS).

Literatur: Jabs et al. 1993. Acc.No. AH004951

Tabelle 2-10 MSX2-Primerpaare für den SSCA-Screen

Primer	Sequenz 5' → 3'	Primer	Sequenz 5' → 3'	Annealing	Zusatz
MSX1f	aagtttgagtcgccgctg	MSX1r	tcttgtcggacatgagcg	55°C	DMSO 5%
MSX2f	tcaaggtctccagcctgc	MSX2r	gaattttccgacttgaccga	54°C	DMSO 5%
MSX3f	tggatgaagcccttcgagac	MSX3r	accaggagtccagagggc	55°C	DMSO 15%
MSX4f	agagatgacgggggagatg	MSX4r	ggagaggactgtttctgacgg	57°C	DMSO 5%
MSX5f	acaagaccaatcggaagcc	MSX5r	ggagactgaagctggaggg	55°C	-
MSX6f	gaaaagctgaaaatggctgc	MSX6r	agggagaggaaaccctttga	54°C	-

3 Ergebnisse

3.1 Assoziationsstudien zu *MTHFR*-Polymorphismen

3.1.1 677C→T

Koch MC, Stegmann K, Ziegler A, Schröter B, Ermert A (1998) Evaluation of the *MTHFR* C677T allele and the *MTHFR* gene locus in a German spina bifida population. *Eur J Pediatr* 157: 487-492

Der Polymorphismus 677C→T in Exon4 des *MTHFR*-Gens wurde mittels PCR und *Hinf*I-Restriktionsverdau (Kap. 2.4.1) bei insgesamt 468 Personen (137 SBA-Patienten, 106 Müttern, 72 Vätern und 153 Kontrollen) bestimmt. Ein repräsentatives Beispiel für die Analyse des *MTHFR* 677C/T-Genotyps zeigt Abb. 3-1.

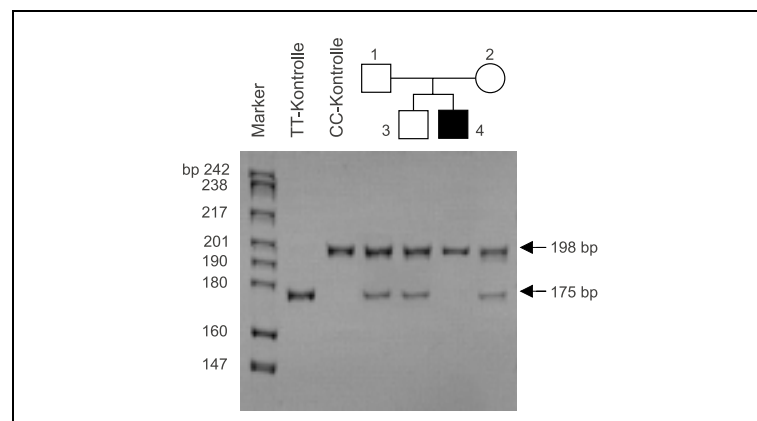


Abbildung 3-1 *Hinf*I-Analyse des *MTHFR* 677C/T Polymorphismus

Genotypen eines SBA-Patienten und seiner Familie im Vergleich zu homozygoten 677TT- und 677CC-Kontrollen.

198 bp = C-Allel, 175 bp = T-Allel (23 bp-Fragment nicht auf dem Gelbild).

3.1.1.1 Fall-Kontroll-Vergleich

Die Verteilung der *MTHFR* 677C/T-Genotypen bei 137 SBA-Patienten und 153 gesunden Kontrollpersonen ist in Tab. 3-1 dargestellt. Es lag kein statistisch signifikanter Unterschied in der Genotypverteilung zwischen beiden Gruppen vor ($p > 0,2$).

Tabelle 3-1 *MTHFR* 677C/T Genotyp- und Allelfrequenzen

untersuchte Personen	Anzahl	Genotyp			Allelfrequenz	
		CC	CT	TT	C	T
SBA-Patienten	137	58 (42%)	60 (44%)	19 (14%)	0,64	0,36
Kontrollen	153	75 (49%)	61 (40%)	17 (11%)	0,69	0,31

OR = 0,82; 95% CI = [0,58; 1,62]; $p = 0,28$ (Cochran-Armitage Trend-Test)

3.1.1.2 Familien-Analyse

72 Trios (Mutter, Vater, Kind mit SBA) wurden auf die 677C/T-Alleltransmissionsraten untersucht (Tab. 3-2). Von den insgesamt 144 genotypisierten Elternteilen waren 70 heterozygot (informativ). Diese 70 heterozygoten Eltern gaben 34mal das T-Allel und 36mal das C-Allel an ihr betroffenes Kind weiter. Die Transmissionsrate des T-Allels war also nicht höher als erwartet ($p > 0,8$).

Tabelle 3-2 TDT für *MTHFR* 677C/T bei 72 Trios

		nicht-transmitierte Allele	
		C	T
transmitierte Allele	C	61	34
	T	36	13

Untersucht wurden 72 Trios mit 144 einzelnen Eltern, von denen 70 (34 + 36) heterozygot waren. $\chi^2 = 0,0571$, $p = 0,81$ (exakter Test nach McNemar).

3.1.1.3 Mutter-Kind-Paare

Um zu untersuchen, ob eine Genotypkombination bei Mutter-Kind-Paaren gehäuft vorkam, wurden 106 Mütter und ihre betroffenen Kinder für *MTHFR* 677C/T genotypisiert. Der Vergleich der beobachteten Verteilung mit den erwarteten Werten ergab keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,5$).

Tabelle 3-3 *MTHFR* 677C/T Genotypkombinationen bei 106 Mutter-Kind-Paaren

Genotyp Mutter	Patient	beobachtet		erwartet	*
		n	%	%	
TT	TT	4	3,4	3,0	*
TT	CT	6	5,7	6,6	
CT	TT	11	10,4	6,6	
CT	CT	25	23,6	21,4	
CT	CC	18	17,0	14,8	
CC	CT	11	10,4	14,8	
CC	CC	31	29,2	32,9	

$\chi^2 = 5,01$; $p > 0,5$ (χ^2 -Test „goodness of fit“)

* 677TT homozygote Mutter-Kind-Paare versus erwartete homozygote Kontrollpaare: OR = 1,32; 95% CI = [0,28; 6,05].

3.1.2 1298A→C

Stegmann K, Ziegler A, Ngo ETKM, Kohlschmidt N, Schröter B, Ermert A, Koch MC (1999a) Linkage disequilibrium of *MTHFR* genotypes 677C/T-1298A/C in the German population and associations studies in probands with neural tube defects (NTD). *Am J Med Genet* 87: 23-29

Für die kombinierte Analyse der *MTHFR*-Polymorphismen 677C→T und 1298A→C wurden die Gruppengrößen erhöht. Insgesamt wurden 527 Personen (166 Probanden, 110 Mütter, 77 Väter und 174 Kontrollen) für 677C/T und 1298A/C genotypisiert. Der 1298A/C Genotyp wurde mittels PCR und *Mbo*II-Restriktionsspaltung bestimmt (Kap. 2.4.1). Alle kombiniert heterozygoten Personen (677CT-1298AC) wurden haplotypisiert. Die Haplotypisierung ist exemplarisch in Abb. 3-2 dargestellt.

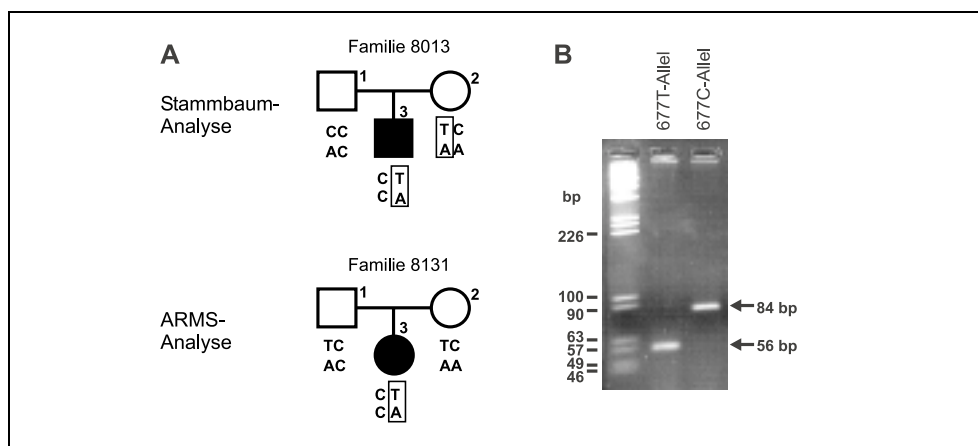


Abbildung 3-2 677C/T-1298A/C Haplotypisierung durch Stammbaumanalyse (A) oder ARMS-RFLP (B)

(A) Der heterozygote Patient 8013 hat das 677T-1298A Allel von seiner Mutter geerbt. (B) Für Patient 8131 war die Stammbaumanalyse nicht informativ, so daß die Haplotypisierung mit dem ARMS-RFLP-Test erfolgte. Das 677T-Allel zeigte das 56 bp *Mbo*II-Fragment der Wildtyp-Sequenz (1298A). Das 677C-Allel ergab im *Mbo*II-Verdau das 84 bp Fragment der mutierten Sequenz (1298C). Die kleineren *Mbo*II-Fragmente von 31-28 bp sind nicht auf dem Gelbild.

3.1.2.1 Fall-Kontroll-Vergleich

Die 677C/T und 1298A/C Genotypverteilungen und Allelfrequenzen bei NRD-Patienten (n = 148), Feten (n = 18) und Kontrollpersonen (n = 174) sind in Tab. 3-4 aufgeführt. Die Patienten bzw. Feten unterschieden sich in ihrer Genotypverteilung nicht signifikant von den Kontrollen (p > 0,11). Die Genotypkombinationen 677TT-1298AC, 677TT-1298CC und 677CT-1298CC wurden in keiner Gruppe beobachtet, das heißt keine Person trug insgesamt mehr als zwei Mutationen. 36 Patienten, 5 Feten und 28 Kontrollen waren kombiniert heterozygot (677CT-1298AC). Ihre Haplotypen wurden durch Stammbaumanalyse oder ARMS-RFLP-Test bestimmt (Abb. 3-2). Alle 69 Personen waren Compound-Heterozygote mit einem 677T-1298A und einem 677C-1298C Allel. Die Mutationen traten also immer auf zwei verschiedenen Allelen (*trans*) auf.

Tabelle 3-4 *MTHFR* 677C/T und 1298A/C Genotyp- und Allelfrequenzen

			<i>MTHFR</i> 677			Allelfrequenz	
			CC	CT	TT	C	T
Patienten	n =	148	62 (42%)	65 (44%)	21 (14%)	0,64	0,36
Feten	n =	18	7 (39%)	10 (56%)	1 (6%)	0,67	0,33
Kontrollen	n =	174	90 (52%)	64 (37%)	20 (11%)	0,70	0,30
<i>MTHFR</i> 1298	AA	66 (45%)	16 (11%)	29 (20%)	21 (14%)		
		9 (50%)	3 (17%)	5 (28%)	1 (6%)		
		88 (51%)	32 (18%)	36 (21%)	20 (11%)		
	AC	73 (49%)	37 (25%)	36 (24%)	-		
		9 (50%)	4 (22%)	5 (28%)	-		
		68 (39%)	40 (23%)	28 (16%)	-		
	CC	9 (6%)	9 (6%)	-	-		
		0 (0%)	0 (0%)	-	-		
		18 (10%)	18 (10%)	-	-		
	Allel- frequenz	A	0,69				
			0,75				
			0,70				
C		0,31					
		0,25					
		0,30					

3.1.2.2 Familien-Analyse

Um Stratifikationseffekte durch inadäquate Wahl der Kontrollgruppe auszuschließen, wurden Familien-Trios untersucht und mit einem multiallelischen TDT auf ein Kopplungsungleichgewicht zwischen den beiden *MTHFR*-Polymorphismen und dem NRD-Phänotyp getestet. Es wurden 77 Trios (154 Eltern und 77 SBA-Patienten) in die Familien-Analyse einbezogen (Tab. 3-5). Keiner der drei beobachteten Haplotypen (677C-1298A, 677C-1298C und 677T-1298A) wurde überzufällig häufig an das betroffene Kind vererbt ($p > 0,5$).

Tabelle 3-5 Multiallelischer TDT für *MTHFR* 677C/T-1298A/C Haplotypen bei 77 Trios

		nicht-transmitteerte Allele		
		677C 1298A	677C 1298C	677T 1298A
transmitteerte Allele	677C 1298A	9	17	22
	677C 1298C	18	20	13
	677T 1298A	19	23	13

$$T_{\text{mhet}} = 1,22; p = 0,54$$

3.1.2.3 Mutter-Kind-Paare

Bei 110 Mutter-Kind-Paaren wurde die Kombination der *MTHFR* 677-1298 Genotypen untersucht. Die Genotypverteilung der 36 empirisch möglichen Kombinationen (nach Ausschluß der drei nicht vorkommenden 677-1298-Kombinationen, Kap. 3.1.2.1) zeigt Tab. 3-6. Der Vergleich mit den Erwartungswerten ergab keine signifikante Abweichung ($p > 0,8$).

Tabelle 3-6 *MTHFR* 677C/T und 1298A/C Genotypkombinationen bei 110 Mutter-Kind-Paaren

Kind	Mutter					
	CC AA	CT AA	CC AC	TT AA	CC CC	CT CA
CC AA	3	5	3	0	0	0
CT AA	1	8	3	4	0	1
CC AC	4	3	11	0	5	6
TT AA	0	4	0	5	0	8
CC CC	0	0	2	0	4	3
CT CA	0	10	5	2	4	6

nominaler p-Wert = 0,84 (Monte-Carlo χ^2 -Test mit 10.000 Replikationen)

3.2 Mutationssuchen in Entwicklungsgenen

3.2.1 *SLUG*

Stegmann K, Boecker J, Kosan C, Ermert A, Kunz J, Koch MC (1999b) Human transcription factor *SLUG*: mutation analysis in patients with neural tube defects and identification of a missense mutation (D119E) in the Slug subfamily-defining region. *Mut Res Genomics* 406: 63-69

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. J. Kunz wurde die genomische Struktur des humanen *SLUG*-Gens aufgeklärt und Primer für den SSCA-Screen gelegt (Kap. 2.4.2). 150 NRD-Probanden wurden auf Mutationen in *SLUG* untersucht. Bei einer SBA-Patientin (80157) und ihrem Vater wurde ein aberrantes SSCA-Migrationsmuster gefunden, das bei ihrer Mutter, ihrem Bruder und 136 gesunden Kontrollen nicht auftrat (Abb. 3-3 A). Die anschließende Sequenzierung zeigte einen Basenaustausch von Adenin zu Cytosin an der Stelle 1548 (1548A→C). Ein ARMS-Test bestätigte, daß die Patientin und ihr Vater heterozygote Mutationsträger sind (Abb. 3-3 B). Die Mutation 1548A→C führt zum Austausch eines hochkonservierten Aspartatrestes gegen einen Glutamatrest in der vorhergesagten Aminosäuresequenz (D119E, Abb. 3-4). Die ausgetauschte Aminosäure liegt in der sogenannten Slug-definierenden Region, die charakteristisch ist für alle Slug-Homologe in Vertebraten. Eine Röntgenanalyse schloß eine Spina bifida occulta beim Vater der Patientin aus. Weder bei Patienten noch bei Kontrollen fanden sich Polymorphismen.

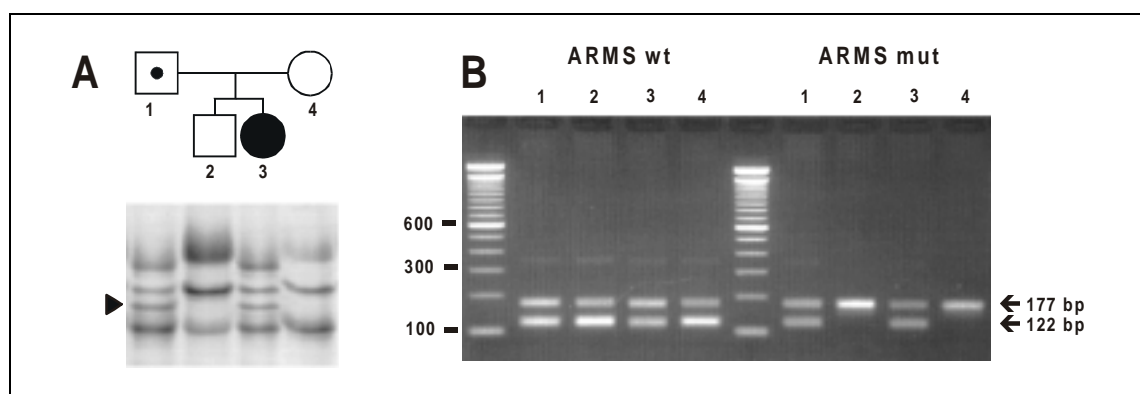


Abbildung 3-3 *SLUG*-Mutation 1548C→A (D119E): Identifikation durch SSCA (A) und alternativer Nachweis durch ARMS-Test (B)

A Die SSCA mit Primerpaar 2.4f + 2.4r zeigte bei der SBA-Patientin 80157 (3) und ihrem Vater (1) eine aberrante Bande (Dreieck). **B** Ein ARMS-Test bestätigte, daß Patientin und Vater heterozygote Mutationsträger sind. Neben dem 177 bp großen Kontrollfragment (Primer 2.4f + 2.4r) generierten allelspezifische Primer (ARMSwt bzw. ARMSmut + 2.4r) ein zusätzliches 122 bp großes Fragment. Alle Familienmitglieder zeigten das wildtypspezifische Fragment, aber nur Patientin (3) und Vater (1) das mutationspezifische Fragment.

3 Ergebnisse

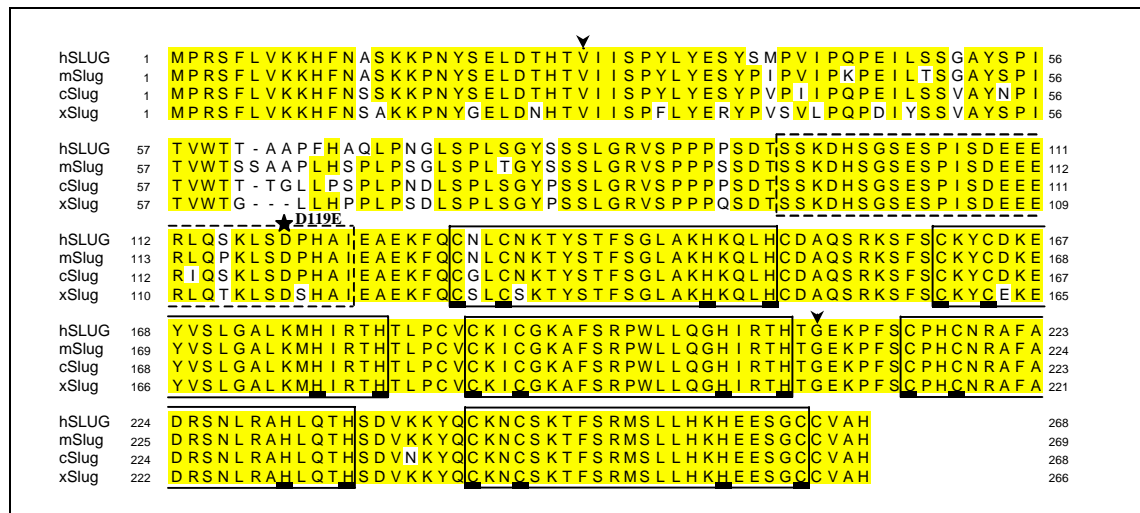


Abbildung 3-4 Homologe Slug-Proteine bei Vertebraten

Mensch	hSLUG	Acc.No. AF084243	Stegmann et al. 1999b
Maus	mSlug	Acc.No. U79550	Jiang et al. 1998a
Huhn	cSlug	Acc.No. X77572	Nieto et al. 1994
<i>Xenopus</i>	xSlug	Acc.No. X80269	Mayor et al. 1995

Verglichen mit Slug-Homologen anderer Vertebraten zeigt humanes SLUG sehr starke Ähnlichkeit in der Zinkfingerdomäne (mSlug 100% Identität, cSlug 99,3%, xSlug 98,5%) und starke Ähnlichkeit im übrigen Protein (mSlug 91%, cSlug 87%, xSlug 81%).

Identische Aminosäurereste sind grau hinterlegt. Die Kästen markieren die fünf konservierten Zinkfinger. Hervorgehoben sind die Cystein- und Histidinreste, die das Zinkion koordinieren. Gestrichelter Kasten = Slug-Subfamilie-definierende Region. Stern = Missense-Mutation D119E in Patientin 80157. Pfeilspitzen = Exon-Grenzen. Slug wird von drei Exons kodiert.

3.2.2 *CART1*

Stegmann K, Richter B, Röper B, Capra V, Finnell RH, Strehl E, Koch MC (2000) Analysis of developmental genes *CART1*, *TWIST*, and *NOGGIN* potentially involved in human neural tube defects (NTD). *Am J Hum Genet* (in Vorbereitung)

Bisher war nur die cDNA-Sequenz des humanen *CART1*-Gens bekannt (Gordon et al. 1996). Auch von homologen Genen bei Ratte und *Xenopus* war die genomische Struktur nicht bekannt (Zhao et al. 1993). Deshalb wurde zunächst die genomische Struktur des humanen *CART1* aufgeklärt.

CART1 besteht aus vier Exons. Die drei Introns wurden mit PCR amplifiziert, kloniert und die Exon-Intron-Übergänge sequenziert (Tab. 3-7). Die Übergänge Exon2-Intron2, Intron2-Exon3 entsprachen vollständig der Consensus-Sequenz AGgt...agG. Die Intron1-Übergänge wiesen Abweichungen von der Consensus-Sequenz auf, die in etwa 10% der Fälle vorkommen (Krawczak et al. 1992). Intron3 hat eine Größe von rund 1,7 kb und liegt zwischen Nucleotid 801 und 1002. Die genauen Übergänge werden zur Zeit noch bestimmt.

Für die SSCA wurden Primer gelegt, die den größten Teil des kodierenden Bereichs von *CART1* abdeckten (Kap. 2.4.3). In den Mutationsscreen wurden 173 NRD-Betroffene einbezogen. Es wurden vier Polymorphismen gefunden (Tab. 3-8, Abb. 3-5). Alle Polymorphismen traten auch bei gesunden Kontrollpersonen auf (Tab. 3-9). Die Genotypverteilung bei den Patienten war nicht signifikant verschieden von der bei den Kontrollen ($p > 0,1$). Kein Patient trug mehr als eine Mutation. Nur eine Kontrollperson trug zwei Polymorphismen (-19G→A und 48A→G). Die allelspezifische Sequenzierung der aberranten Banden (1f + 1r) zeigte, daß die beiden Polymorphismen in *trans* vorkamen. Bei einer weiteren Kontrollperson wurde in Exon1 eine Sequenzabweichung gefunden, die bei den Patienten nicht auftrat (190C→T: R64C). Von den insgesamt 12 Patienten, die eine Sequenzveränderung trugen, wurden auch ihre Familienangehörigen auf diese Veränderung getestet. 3/8 Vätern, 6/10 Müttern und 4/5 Geschwistern waren ebenfalls Mutationsträger. Die beiden gefundenen Missense-Polymorphismen betrafen konservierte Aminosäuren im insgesamt weniger konservierten Bereich vor der Homöodomäne (Abb. 3-6).

Tabelle 3-7 Exon-Intron-Übergänge in *CART1*

	Position nach nt *	Größe	Exon-Ende	Intron	Exon-Anfang
Intron 1	381	3,3 kb	AGC AGC G	gtgagtcgct ... ctgggtacag	TG AAC TAT
Intron 2	686	3,2 kb	AGG GTC CAG	gtaggagcca ... aaataattag	GTT TGG TTT

* bezogen auf die cDNA-Sequenz der Datenbank (Acc.No. NM_006982)

Tabelle 3-8 Polymorphismen in *CART1*

Lage	Art	Bezeichnung nt	AS	Primerpaar	gefunden bei Probanden	gefunden bei Kontrollen
5'-UTR	Transition	-19G→A	-	1f + 1r	+	+
Exon 1	Transition	48A→G	K16K	1f + 1r und 2f + 2r	+	+
Exon 1	Missense	182A→G	H61L	2f + 2r und 15f + 15r	2	+
Exon 1	Missense	191G→T	R64L	2f + 2r und 15f + 15r	1	+

nt = Nukleotidebene; AS = Aminosäureebene; + = Polymorphismus wurde bei mehreren Personen gefunden (Verteilung in Tab. 3-9). Die Missense-Varianten traten bei folgenden Patienten auf: 182A→G (H61L) bei SBA-Patientin 80349 und 80444, 191G→T (R64L) bei SBA-Patient 80218.

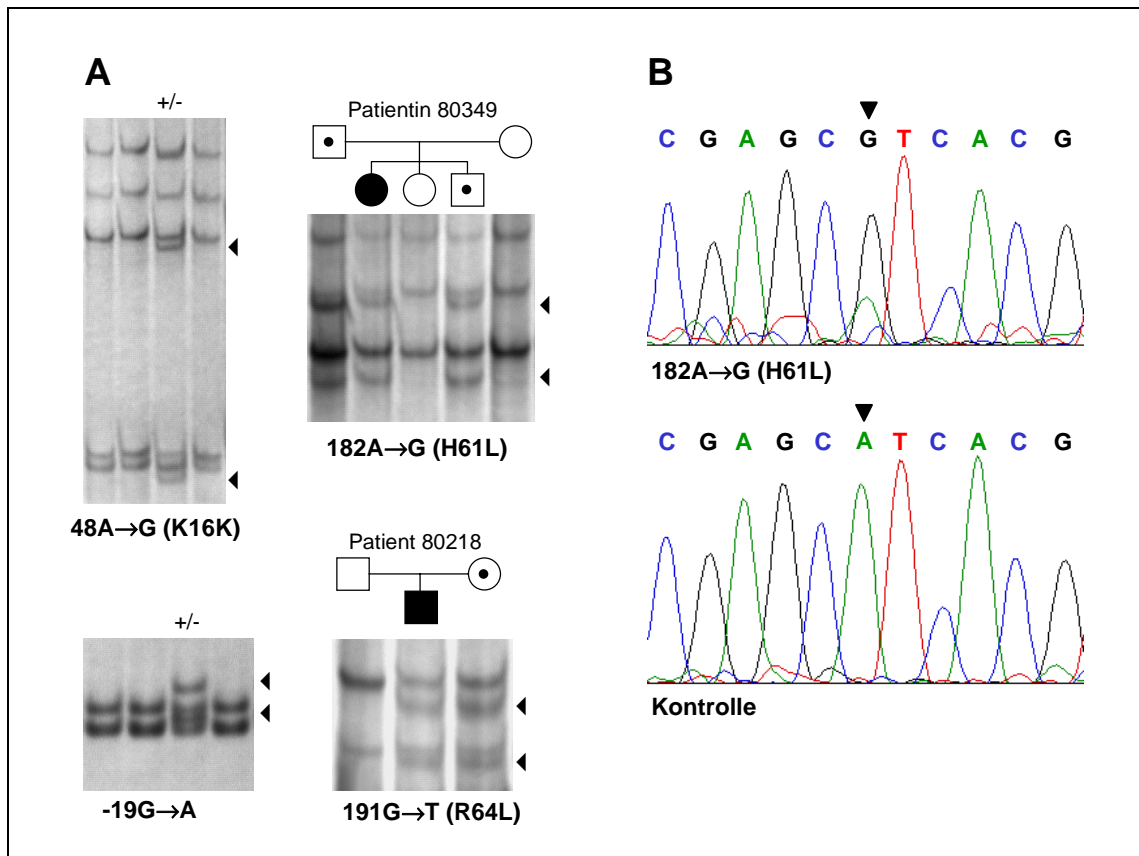


Abbildung 3-5 *CART1*-Polymorphismen in SSCA (A) und Sequenzierung (B)

A Beispiele für die von den *CART1*-Polymorphismen hervorgerufenen abnormen SSCA-Muster. (+/-) = heterozygot. **B** Sequenzierung der abnormen Bande von Patientin 80349 im Vergleich zur Normalkontrolle zeigte den Austausch G→A an der Stelle 182 (Dreieck), der in der vorhergesagten Aminosäuresequenz zum Austausch von Histidin zu Leucin an der Stelle 61 führt.

Tabelle 3-9 Genotypverteilungen und Allelfrequenzen bei *CART1*-Polymorphismen

Polymorphismus	SBA-Patienten (n = 152)			Feten (n = 21)			Kontrollen (n = 166)		
	(-/-)	(+/-)	(+/+)	(-/-)	(+/-)	(+/+)	(-/-)	(+/-)	(+/+)
5'-UTR -19G→A	146	6	0	21	0	0	162	4	0
	96,05%	3,95%		100%			97,59%	2,41%	
Allelfrequenzen:	G = 0,98, A = 0,02			G = 1,00, A = 0,00			G = 0,99, A = 0,01		
Statistik:	0,60 [0,12; 2,60] 0,64			1,00 [0,08; ∞] 1,00					
Exon 1 48A→G (K16K)	149	3	0	20	1	0	163	3	0
	98,03%	1,97%		95,24%	4,76%		98,19%	1,81%	
Allelfrequenzen:	A = 0,99, G = 0,01			A = 0,98, G = 0,02			A = 0,99, G = 0,01		
Statistik:	0,91 [0,12; 6,93] 1,00			0,37 [0,03; 20,28] 0,76					
Exon 1 182A→G (H61L)	150	2	0	21	0	0	163	3	0
	98,68%	1,32%		100%			98,19%	1,81%	
Allelfrequenzen:	A = 0,99, G = 0,01			A = 1,00, G = 0,00			A = 0,99, G = 0,01		
Statistik:	1,38 [0,16; 16,72] 1,00			1,00 [0,05; ∞] 1,00					
Exon 1 191G→T (R64L)	151	1	0	21	0	0	160	6	0
	99,34%	0,66%		100%			96,39%	3,61%	
Allelfrequenzen:	G = 1,00, T = 0,00			G = 1,00, T = 0,00			G = 0,98, T = 0,02		
Statistik:	5,64 [0,67; 262,1] 0,15			1,00 [0,14; ∞] 0,97					

(-/-) = homozygot wildtyp; (+/-) = heterozygot; (+/+) = homozygot mutiert.
Statistik: OR [95% CI] p-Wert (Cochran-Armitage Trend-Test).

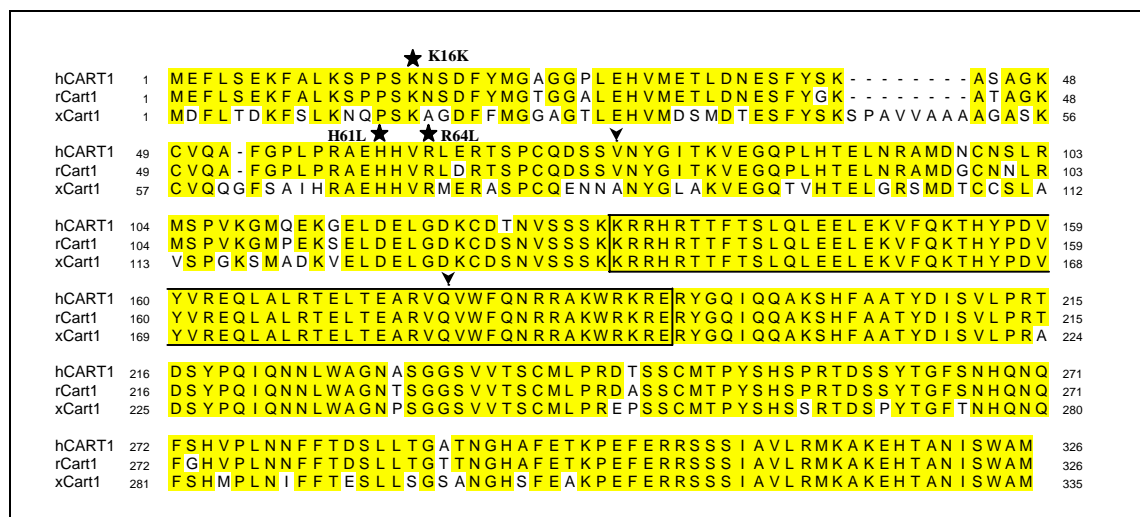


Abbildung 3-6 Homologe Cart1-Proteine bei Vertebraten

Mensch	hCART1	Acc.No. NM_006982	Gordon et al. 1996
Ratte	rCart1	Acc.No. L14018	Zhao et al. 1993
<i>Xenopus</i>	xCart1	Acc.No. U15276	

Der Vergleich von humanem CART1 mit homologen Proteinen anderer Vertebraten zeigt starke Ähnlichkeit (rCart1 96% Identität, xCart1 79%). Die Homöodomäne ist bei allen drei Vertebraten-Homologen 100%ig konserviert. Die Sequenz des Maus-Homologen war in den Datenbanken nicht vorhanden. Identische Aminosäurereste sind grau hinterlegt. Sterne = exonische Polymorphismen. Kasten = Homöodomäne. Pfeilspitzen = Exon-Grenzen. hCART1 wird von 4 Exons kodiert.

3.2.3 *NOGGIN*

Stegmann K, Richter B, Röper B, Capra V, Finnell RH, Strehl E, Koch MC (2000) Analysis of developmental genes *CART1*, *TWIST*, and *NOGGIN* potentially involved in human neural tube defects (NTD). *Am J Hum Genet* (in Vorbereitung)

Humanes *NOGGIN* besteht aus einem einzigen kodierenden Exon, dessen Sequenz veröffentlicht war (Valenzuela et al. 1995). Anhand der Datenbank-Sequenz wurden Primer generiert (Kap. 2.4.4) und mit SSCA 170 NRD-Betroffene auf Mutationen in *NOGGIN* untersucht. Bei einer SBA-Patientin (80332) wurde ein aberrantes SSCA-Muster gefunden (Abb. 3-7 A). Die anschließende Sequenzierung (Abb. 3-7 B) zeigte, daß es sich um eine Transition G→A an der Stelle 275 handelt, die zu einem Aminosäureaustausch von Glycin zu Glutaminsäure an der Stelle 92 führt (275G→A: G92E). Diese Sequenzvariante wurde bisher nicht beschrieben (Gong et al. 1999). Der ausgetauschte Glycinrest befindet sich in einer Kette von Glycinresten, die bei Mensch und Maus konserviert ist, bei Huhn, *Xenopus* und Zebrafisch jedoch nicht vorhanden ist (Abb. 3-8). Die Eltern der Patientin und 239 gesunde Kontrollpersonen wurden ebenfalls auf diese Sequenzveränderung hin untersucht. Der Vater war Mutationsträger, die Mutter nicht. Bei einer Kontrollperson (M152) trat die Variante ebenfalls auf. Außerdem wurde bei einer Kontrollperson (M281) die synonyme Veränderung 252C→G (P84P) gefunden, die in der Probandengruppe nicht beobachtet worden war.

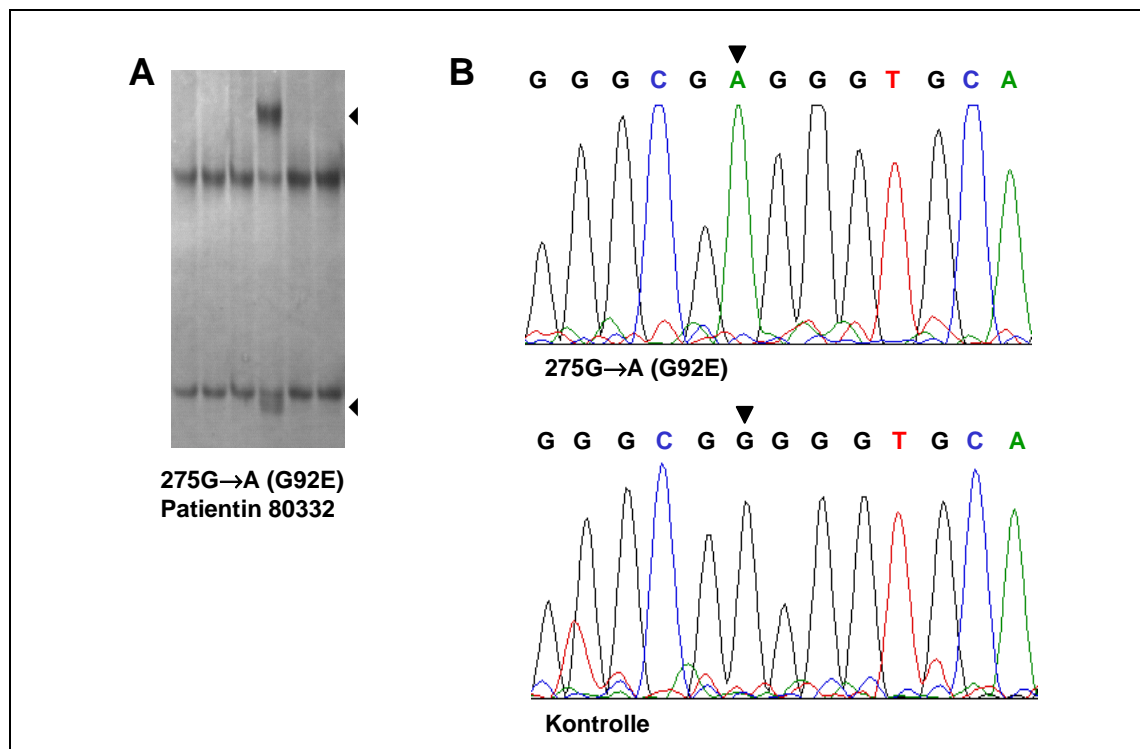


Abbildung 3-7 *NOGGIN*-Variante G92E: SSCA-Gel (A) und Sequenzierung (B)

A Das Produkt 3f + 3r von SBA-Patientin 80332 zeigte bei SSCA im Kühlraum aberrante Banden.
B Sequenzierung der aberranten Banden ergab den Austausch G→A an der Stelle 275 (Dreieck).

3.2.5 AP2 α

Stegmann K, Boecker J, Richter B, Ngo ETKM, Capra V, Finnell RH, Ermert A, Koch MC (2000) Sequence analyses of candidate risk factors AP2 α and MSX2 in patients with neural tube defects (NTD). Eur J Hum Genet (in Vorbereitung)

Die genomische Struktur und Sequenz des humanen AP2 α war veröffentlicht (Bauer et al. 1994, Acc.No. X77343). Allerdings lag, anders als angegeben, Exon2 bei Nucleotid 6563 bis 6997 und Exon5 bei 14344 bis 14462. Auch in Exon5 (AP2 α B: 14541 +CT, 14564 G→C), Exon6 (16435 -A) und in angrenzenden Intronbereichen fanden sich Diskrepanzen zu sequenzierten Kontrollproben. Nach Überprüfung der Sequenz wurden Primer etabliert (Kap. 2.4.6) und mit SSCA 170 NRD-Probanden (150 Patienten + 20 Feten) auf Sequenzabweichungen in AP2 α untersucht.

Es wurden drei intronische Polymorphismen gefunden, die bei mehreren Patienten auftraten, und drei Varianten, die jeweils nur bei einem Patienten auftraten (Tab. 3-10, Abb. 3-10).

Zwei der drei Varianten führten zu keiner Änderung in der vorhergesagten Aminosäuresequenz (924C→T und 1188G→T) und traten bei 146 untersuchten Kontrollpersonen nicht auf. Die dritte Variante, eine C→T Transition, befand sich bei AP2 α A in Intron5 (+78C→T); beim alternativen Spleißprodukt AP2 α B lag sie in Exon5 (961C→T) und bewirkte einen Aminosäureaustausch von Arginin zu Cystein an der Stelle 321 (R321C). Diese Veränderung wurde auch bei einer Kontrollperson beobachtet. Alle drei Varianten erbten die Patienten jeweils von ihrem Vater.

Zwei der drei bei mehreren Probanden und Kontrollen gefundenen Polymorphismen waren im Kopplungsungleichgewicht (+284insCT in Intron5 und -44T→A in Intron6). Alle Personen, die heterozygot bzw. homozygot für +284insCT waren, waren auch heterozygot bzw. homozygot für -44T→A. Der dritte Polymorphismus -53delG war weniger häufig. 4 Patienten waren heterozygot, keiner homozygot. Von den 4 heterozygoten Patienten hatten zwei die Mutation von der Mutter und zwei vom Vater geerbt. Der Vergleich der Genotypverteilung der Polymorphismen zwischen Patienten bzw. Feten und Kontrollen ergab keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,9$; Tab. 3-11).

Durch die Mutation 924C→T bei SBA-Patientin 80023 entstand ein neues GT-Dinucleotid. Von der Patientin wurde cDNA präpariert. Weitere Untersuchungen sollen klären, ob durch die Mutation eine alternative Spleißstelle entsteht.

3 Ergebnisse

Tabelle 3-10 Sequenzveränderungen in AP2 α

Lage	Art	Bezeichnung nt	AS	Primerpaar	gefunden bei Probanden	Kontrollen
• Polymorphismen						
Intron 3	1 bp-Deletion	-53delG	-	6.1f + 6.1r	+	+
Intron 5	2 bp-Insertion	+284insCT	-	10f + 10r	+	+
Intron 6	Transversion	-44T→A	-	12f + 12r	+	+
• Variante						
Intron 5 bzw. Exon 5	Transition bzw. Missense	AP2 α A: +78C→T AP2 α B: 961C→T	- R321C	9f + 9r	1	1
• Mutationen						
Exon 6	Transition	924C→T	C308C	11f + 11r	1	0
Exon 7	Transversion	1188G→T	T396T	13f + 13r	1	0

nt = Nukleotidebene; AS = Aminosäureebene; + = bei mehreren Personen gefunden (Verteilung in Tab. 3-11)
Die Mutation +78C→T bzw. 961C→T (R321C) trat bei SBA-Patientin 80219 auf, 924C→T (C308C) bei SBA-Patientin 80023 und Kontrollperson M100, 1188G→T (T396T) bei SBA-Patient 80178.

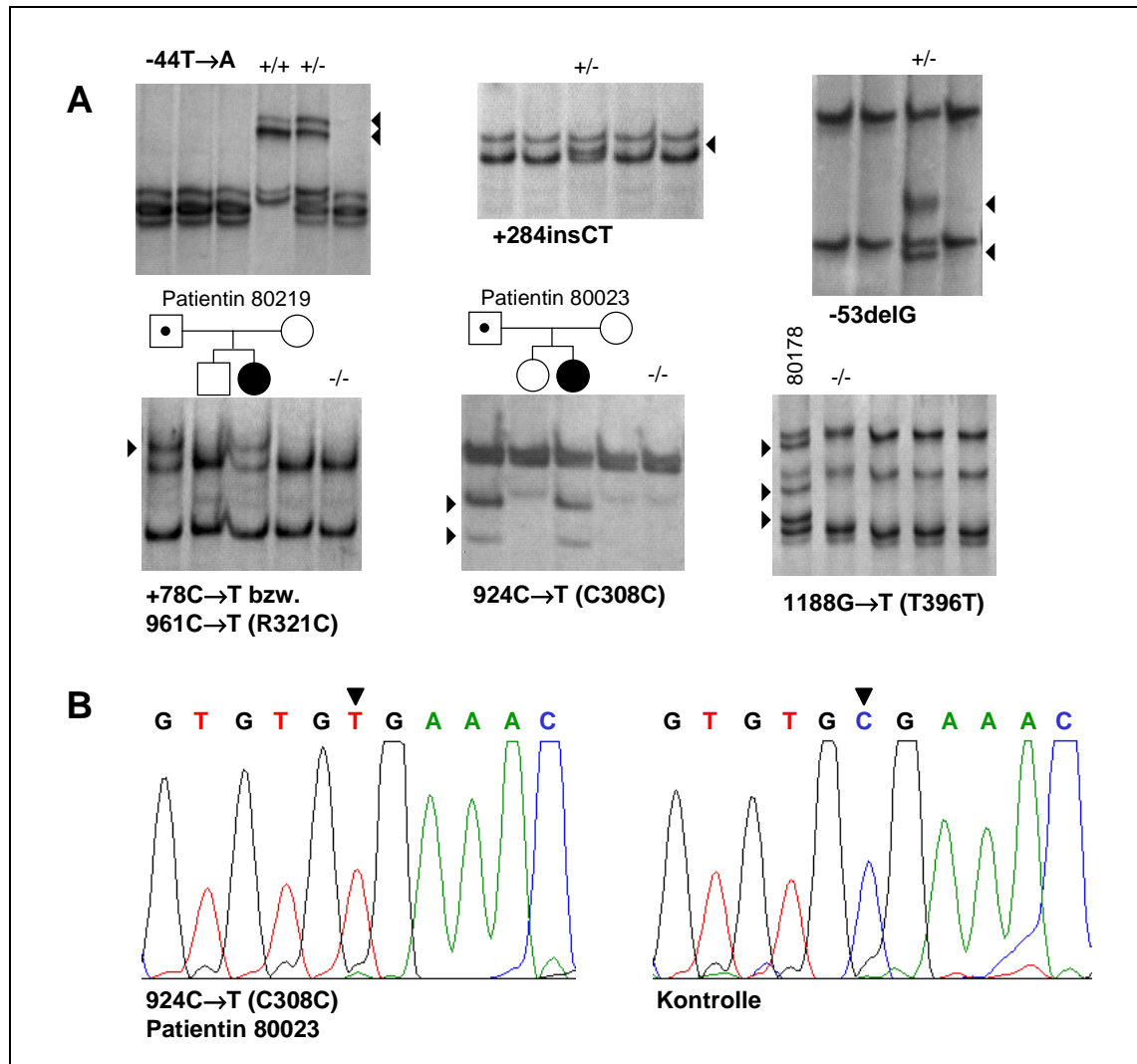


Abbildung 3-10 AP2 α -Sequenzveränderungen in SSCA (A) und Sequenzierung (B)

A Beispiele für SSCA-Gele mit aberranten Mustern bei AP2 α -Sequenzveränderungen. **B** Sequenzierung der aberranten Bande von Patientin 80023 ergab den Austausch C→T an der Stelle 924 (Dreieck).

Tabelle 3-11 Genotypverteilungen und Allelfrequenzen bei AP2α-Polymorphismen

Polymorphismus	SBA-Patienten (n = 150)			Feten (n = 20)			Kontrollen (n = 146)		
	(-/-)	(+/-)	(+/+)	(-/-)	(+/-)	(+/+)	(-/-)	(+/-)	(+/+)
-53delG (Intron 3)	146	4	0	20	0	0	143	3	0
	97,33%	2,67%		100%			97,95%	2,05%	
Allelfrequenzen	wt = 0,99, del = 0,01			wt = 1,00, del = 0,00			wt = 0,99, 0,01		
Statistik	0,77 [0,11; 4,62] 1,00			1,00 [0,06; ∞] 1,00					
-44T→A (Intron 6) *	103	45	2	15	5	0	103	40	3
	68,67%	30,00%	1,33%	75,00%	25,00%		70,55%	27,40%	2,05%
Allelfrequenzen	T = 0,84, A = 0,16			T = 0,88, A = 0,13			T = 0,84, A = 0,16		
Statistik	0,96 [0,59; 1,54] 0,93			1,32 [0,47; 4,65] 1,79					

* der gekoppelte Polymorphismus +284insCT (Intron 5) zeigte eine identische Genotypverteilung bei Probanden und Kontrollen.

(-/-) = homozygot wildtyp; (+/-) = heterozygot; (+/+) = homozygot mutiert.
Statistik: OR [95% CI] p-Wert (Cochran-Armitage Trend-Test)



Abbildung 3-11 Homologe AP2α-A-Proteine bei Vertebraten

Mensch	hAp2	Acc.No. NM_003220	Williams et al. 1988
Maus	mAp2	Acc.No. X74216	Moser et al. 1993
Huhn	cAp2	Acc.No. U72992	Shen et al. 1997
Xenopus	xAp2	Acc.No. M59455	Winning et al. 1991

Ap2α ist bei Vertebraten evolutionär stark konserviert. Humanes AP2α ist mit dem Homolog von Maus 99%, Huhn 94% und *Xenopus* 92% identisch.

Identische Aminosäurereste sind grau hinterlegt. Sterne = synonyme Mutationen bei NRD-Patienten: C308C bei SBA-Patientin 80023 und T396T bei SBA-Patient 80178. Kasten = HSH-Domäne. Gestrichelter Kasten = basische Domäne. Gepunkteter Kasten = Transaktivierungsdomäne. Pfeilspitzen = Exon-Grenzen. Ap2α wird von sieben Exons kodiert.

3.2.6 MSX2

Stegmann K, Boecker J, Richter B, Ngo ETKM, Capra V, Finnell RH, Ermert A, Koch MC (2000) Sequence analyses of candidate risk factors AP2 α and MSX2 in patients with neural tube defects (NTD). Eur J Hum Genet (in Vorbereitung)

Die humane MSX2-Sequenz ist wegen der Assoziation einer Missense-Mutation in der Homöodomäne (P148H) zum Craniosynostose-Boston-Phänotyp in einer Familie gut untersucht (Jabs et al. 1993). Nach der veröffentlichten Sequenz wurden Primer für einen SSCA-Screen gelegt (Kap. 2.4.7) und 200 NRD-Probanden (150 Patienten und 50 Feten) auf Sequenzabweichungen in MSX2 untersucht.

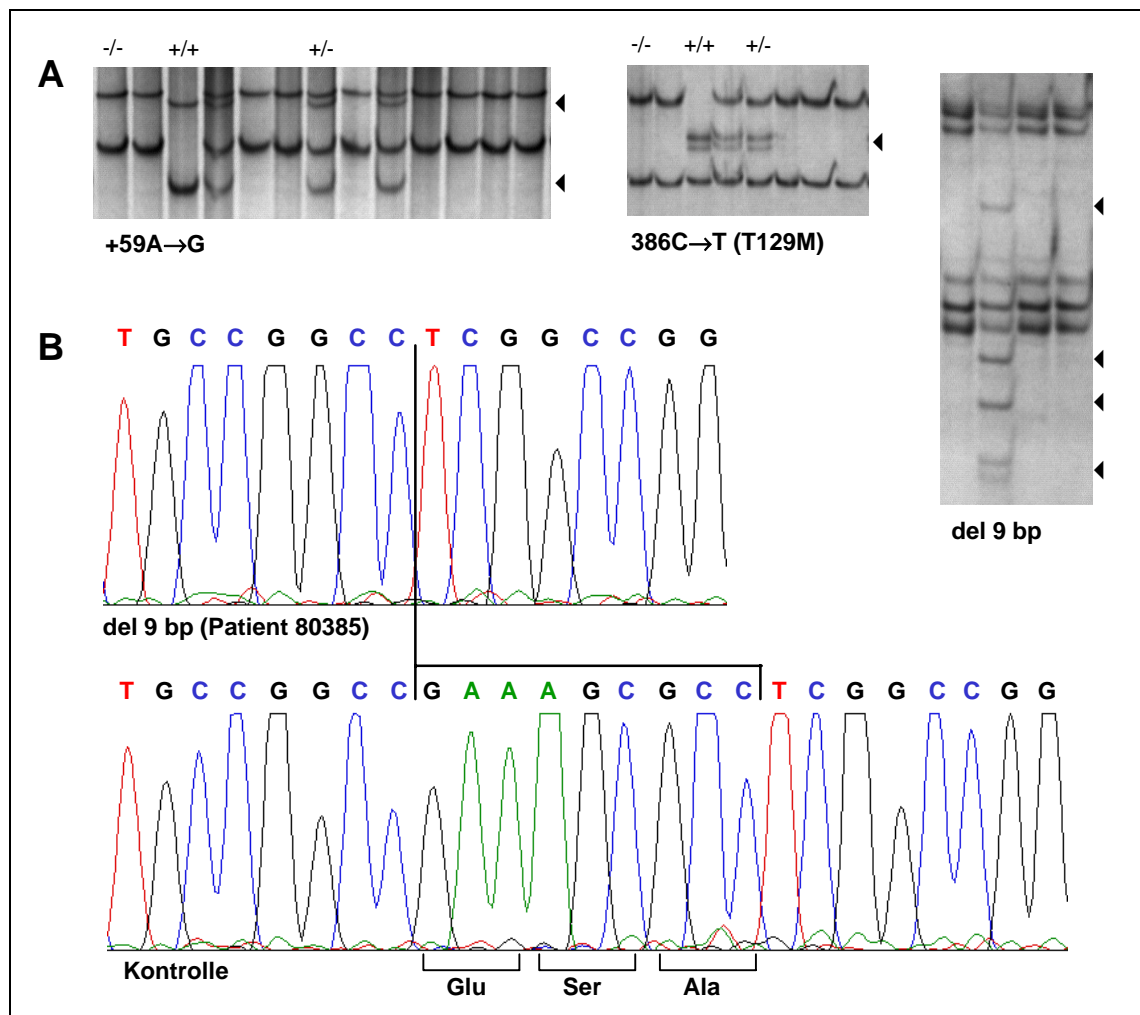
Es wurden drei Polymorphismen gefunden, die bei mehreren Probanden auftraten, und eine Mutation, die nur bei einem Patienten (80385) auftrat (Tab. 3-12). Bei der Mutation handelte es sich um eine 9 bp-Deletion im Leseraster, die zum Verlust der Aminosäuren Glutaminsäure, Serin und Alanin an den Stellen 68 bis 70 (del68-70ESA) in einem nicht konservierten Bereich des deduzierten Proteins führte (Abb. 3-12 und 3-13). Die Mutter des Patienten war homozygot für die Wildtypsequenz. Weitere Verwandte des Patienten standen nicht zur Verfügung. Die Deletion trat bei 232 untersuchten Kontrollpersonen nicht auf.

Der Polymorphismus 386C→T in Exon2 führt zum Aminosäureaustausch von Threonin zu Methionin an der Stelle 129 (Abb. 3-13). Der ausgetauschte Threoninrest liegt 13 Reste vor Beginn der Homöodomäne und ist evolutionär nicht konserviert. Diese Position wurde bereits als polymorphe Stelle beschrieben (Jabs et al. 1993). Der Polymorphismus 386C→T zeigte vollständige Kopplung mit dem Polymorphismus +59A→G in Intron 1. Die Genotypverteilung der Polymorphismen bei den Probanden unterschied sich nicht signifikant von der bei gesunden Kontrollpersonen ($p > 0,5$; Tab. 3-13).

Tabelle 3-12 Sequenzveränderungen in *MSX2*

Lage	Art	Bezeichnung nt	AS	Primerpaar	gefunden bei Probanden	Kontrollen
• Polymorphismen						
5'-UTR	Transversion	-17C→G	-	1f + 1r	+	+
Intron 1	Transition	+59A→G	-	3f + 3r	+	+
Exon 2	Missense	386C→T	T129M	4f + 4r	+	+
• Mutation						
Exon 1	9 bp-Deletion	102-110del(gaaagcgc)	68-70delESA	2f + 2r	1	0

nt = Nukleotidebene; AS = Aminosäureebene; + = Polymorphismus trat bei mehreren Personen auf.
Die 9 bp-Deletion wurde nur bei SBA-Patient 80385 beobachtet.

Abbildung 3-12 *MSX2*-Sequenzveränderungen in SSCA (A) und Sequenzierung (B)

A Beispiele für aberrante SSCA-Laufmuster bei *MSX2*-Sequenzveränderungen. B Die Sequenzierung einer aberranten Bande von SBA-Patient 80385 im Vergleich zu einer Normalkontrolle zeigte die Inframe-Deletion von 9 Basen (GAA AGC GCC), die zum vorhergesagten Verlust der Aminosäuren Glutaminsäure, Serin und Alanin (del68-70ESA) führt.

Tabelle 3-13 Genotypverteilungen und Allelfrequenzen bei *MSX2*-Polymorphismen

Polymorphismus	SBA-Patienten (n = 150)			Feten (n = 50)			Kontrollen (n = 232)		
	(-/-)	(+/-)	(+/+)	(-/-)	(+/-)	(+/+)	(-/-)	(+/-)	(+/+)
5'-UTR	140	10	0	44	6	0	214	17	1
-17C→G	93,3%	6,7%	0,0%	88,0%	12,0%	0,0%	92,2%	7,3%	0,4%
Allelfrequenzen	C = 0,97, G = 0,03			C = 0,94, G = 0,06			C = 0,96, G = 0,04		
Statistik	1,23 [0,54; 2,97] 0,75			0,68 [0,26; 2,09] 0,55					
Exon 2	117	30	3	39	10	1	182	46	4
386C→T (T129M) *	78,0%	20,0%	2,0%	78,0%	20,0%	2,0%	78,5%	19,8%	1,7%
Allelfrequenzen	C = 0,88, T = 0,12			C = 0,88, T = 0,12			C = 0,88, T = 0,12		
Statistik	0,97 [0,61; 1,55] 0,97			0,97 [0,49; 2,04] 1,00					

(-/-) = homozygot wildtyp; (+/-) = heterozygot; (+/+) = homozygot mutiert.

Statistik: OR [95% CI] p-Wert (Cochran-Armitage Trend-Test)

* der vollständig gekoppelte Polymorphismus +59A→G zeigte eine identische Genotypverteilung bei Probanden und Kontrollen.



Abbildung 3-13 Homologe Msx2-Proteine bei Vertebraten und die Homöodomäne von *Drosophila msh*

Mensch	hMSX2	Acc.No. AH004951	Jabs et al. 1993
Maus	mMsx2	Acc.No. NM_013601	Monaghan et al. 1991
Huhn	cMsx2	Acc.No. S64478	Coelho et al. 1991
Wachtel	qMsx2	Acc.No. M57611	Takahashi und Le Douarin 1990
<i>Xenopus</i>	xMsx2	Acc.No. X58772	Su et al. 1991
<i>Drosophila</i>	msh	Acc.No. U33319	D'Alessio und Frasch 1996 (nur Homöodomäne)

Die Homöodomäne aller Vertebraten Msx2-Homologe ist 100% identisch und zeigt 92% Identität mit der Homöodomäne von *Drosophila msh*. Insgesamt liegt die Identität von humanem MSX2 bei 92% mMsx2, 74% cMsx2, 75% qMsx2 und 64% xMsx2.

Identische Aminosäuren sind grau hinterlegt. Sterne = 9 bp-Deletion (68-70delESA) in SBA-Patient 80385 und exonischer Polymorphismus 386C→T (T129M). Kasten = Homöodomäne. Pfeilspitze = Exon-Grenze. Msx2 wird von 2 Exons kodiert.

3.3 Gen-Gen-Interaktion

Um zu prüfen, ob SBA-Patienten insgesamt mehr Sequenzveränderungen tragen als Kontrollen, wurde die Anzahl der Mutationen in den untersuchten Genen summiert (Tab. 3-14). Der Vergleich zwischen Patienten- und Kontrollgruppe ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p > 0,09$).

Tabelle 3-14 Summe der Mutationen in *MTHFR* und den untersuchten Entwicklungsgenen (*SLUG*, *CART1*, *NOGGIN*, *AP2 α* und *MSX2*) bei 150 SBA-Patienten und 140 gesunden Kontrollpersonen

Gene	Personen	Anzahl der Mutationen					
		0	1	2	3	4	> 4
<i>MTHFR</i> (677C/T + 1298A/C)	Patienten	16	68	66	0	0	0
	Kontrollen	26	61	53	0	0	0
		Statistik: 0,75 [0,54; 1,04] 0,09					
Entwicklungsgene	Patienten	69	54	22	4	0	1
	Kontrollen	61	54	23	2	0	0
		Statistik: 1,00 [0,74; 1,34] 1,00					
<i>MTHFR</i> + Entwicklungsgene	Patienten	9	30	63	36	10	2
	Kontrollen	11	34	59	25	9	2
		Statistik: 0,88 [0,70; 1,10] 0,27					

gekoppelte Polymorphismen in *AP2 α* und *MSX2* wurden nur einmal gezählt
Statistik: OR [95% CI] p-Wert (Cochran-Armitage Trend-Test)

Um eine mögliche Gen-Gen-Interaktion zwischen *MTHFR* und den untersuchten Entwicklungsgenen zu analysieren, wurde geprüft, ob Patienten mit *MTHFR* 677TT- oder 677CT-Genotyp häufiger zusätzliche Mutationen in den Entwicklungsgenen tragen als Kontrollpersonen. In die Untersuchung gingen 150 SBA-Patienten und 140 gesunde Kontrollen ein (Tab. 3-15). Bei 677TT-Homozygotie trugen 4/21 Patienten und 2/15 Kontrollen mehr als eine zusätzliche Mutation in den untersuchten Entwicklungsgenen. Bei 677CT-Heterozygotie waren es 10/65 Patienten und 8/49 Kontrollen. Der Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen war statistisch nicht signifikant ($p > 0,2$). Eine detaillierte Aufschlüsselung, welche zusätzlichen Mutationen die *MTHFR* 677TT-homozygoten Patienten ($n = 21$) und Kontrollen ($n = 15$) trugen, gibt Tab. 3-16.

Tabelle 3-15 Ausgewählte Genotypkombinationen von *MTHFR* 677C/T und Entwicklungsgenen bei 150 SBA-Patienten und 140 Kontrollpersonen

<i>MTHFR</i>	Personen		Anzahl der Mutationen in Entwicklungsgenen				
			0	1	2	3	> 3
677TT	Patienten	n = 21/150	14	3	4	0	0
	Kontrollen	n = 15/140	13	0	1	1	0
Statistik: 0,66 [0,05; 5,47] 0,32							
677CT	Patienten	n = 65/150	24	31	7	3	0
	Kontrollen	n = 49/140	22	19	7	1	0
Statistik: 1,07 [0,34; 3,23] 0,20							

Für den statistischen Vergleich wurden je nach Anzahl der Mutationen in den Entwicklungsgenen zwei Gruppen gebildet: Personen mit ≤ 1 Mutation und Personen mit > 1 Mutation. Statistik: OR [95% CI] p-Wert (exakter Test nach Fisher).

Tabelle 3-16 Aufschlüsselung der Mutationen in den untersuchten Entwicklungsgenen bei *MTHFR* 677TT homozygoten Patienten (n = 21) und Kontrollen (n = 15)

DNA-Nr.	<i>MTHFR</i>	<i>SLUG</i>	<i>CART1</i>				<i>NOGGIN</i>	<i>AP2α</i>			<i>MSX2</i>			Summe Mut. in Entwicklungsgenen			
	677C→G	1298A→C	1548A→C	-19G→A	48G→A	182A→G	191G→T	275G→A	-53delG	+284insCT -44T→A	+78C→T	924C→T	1188G→T		-17C→G	+59A→G 386C→T	del9bp
80026	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80055	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80070	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80106	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80151	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80213	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80224	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80236	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80246	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80305	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80314	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80368	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80422	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80474	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80041	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
80207	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
80265	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
80074	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	2
80157	2	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2
80190	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2
80498	2	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2
M31	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M35	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M57	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M75	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M97	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M108	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M109	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M127	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M151	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M163	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M175	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M196	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M216	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M53	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2
M177	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	3

Identifikationsnummern: 80... = Patienten. M... = Kontrollpersonen. Die gekoppelten Polymorphismen in *AP2α* (+284insCT und -44T→A) und *MSX2* (+59A→G und 386C→T) zählten einfach.

4 Diskussion

4.1 Heterogene Ätiologie

Als Neuralrohrdefekte (NRD) faßt man verschiedene angeborene dorsale Fehlbildungen des Rückenmarks und des Gehirns zusammen. Das phänotypische Spektrum der NRD erstreckt sich von den verschiedenen Formen der Spina bifida aperta (SBA) bis hin zu den cranialen Formen Anencephalie und Encephalocele (Kap. 1.1). Man geht davon aus, daß allen NRD-Formen eine primäre Verschlusstrung des Neuralrohrs in der dritten und vierten Woche der menschlichen Embryonalentwicklung (Stadium 8-12) zugrunde liegt (Kap. 1.2). Wahrscheinlich laufen die Entwicklungsschritte von der Neuralplatte bis zum geschlossenen Neuralrohr in unterschiedlichem Ausmaß unvollständig ab. Je nachdem welche der fünf Verschlusstellen dabei betroffen sind, können die verschiedenen genannten Phänotypen entstehen.

Die Ursachen der NRD sind bisher nicht geklärt (Kap. 1.3). Sehr wahrscheinlich führt erst das gemeinsame Vorliegen von exogenen Faktoren (z.B. Ernährung, Medikamente) und polygener Prädisposition zur Auslösung der Krankheit. Man spricht daher von einer multifaktoriellen Genese. In Einklang mit dieser Vorstellung steht die Beobachtung, daß die Geburtenprvalenz nicht nur abhängig ist von der ethnischen Gruppe, sondern auch von der geographischen Lage, der sozioökonomischen Schicht und der Jahreszeit (Elwood et al. 1992).

Die Auffindung genetischer Faktoren wird durch die morphologische Heterogenität, die wahrscheinlich auf einer ätiologischen Heterogenität beruht, erschwert. Entlang der rostro-caudalen Achse gliedert sich die Neurulation in primäre und sekundäre Neurulation (Kap. 1.2). Ausgehend vom segmentalen Verschlusmodell ist die primäre Neurulation wiederum in verschiedene Verschlusstellen unterteilt, wobei ein NRD entweder innerhalb eines Verschlusbereichs oder an der Stelle zwischen zwei Verschlusbereichen entstehen kann. Außerdem hat man kürzlich festgestellt, daß die Neurulation auch innerhalb eines Verschlusbereichs nicht homogen ist, sondern sich in der Faltungsform unterscheidet (Abb. 1-1). Im Mausmodell ist inzwischen belegt, daß an der Kontrolle der verschiedenen Verschlusstellen unterschiedliche Gene beteiligt sind (Juriloff et al. 1991; Van Allen et al. 1993; Harris und Juriloff 1999). Vermutlich werden verschiedene NRD-Formen von verschiedenen Gen-Sets verursacht, wobei erst die Kombination von Mutationen mehrerer Gene den Defekt auslöst. Außerdem ist es möglich, daß einzelne Gendefekte nur in bestimmten Populationen auftreten. Dies würde das populations-spezifische Auftreten bestimmter NRD-Formen erklären.

4.2 Kandidatengenansatz

Zur Genidentifizierung bei NRD kommt insbesondere der Kandidatengenansatz infrage (Kap. 1.3). Als Kandidatengen bezeichnet man jedes Gen, das vor dem Hintergrund bereits bekannter Eigenschaften (Funktion, Expressionsmuster, Lokalisation im Genom, Strukturmotiv) als mögliche Ursache einer Erkrankung in Betracht kommt. Diese Gene werden gezielt auf eine Beteiligung an der Krankheitsentstehung untersucht. NRD sind komplexe Krankheitsbilder, für die es eine große Zahl möglicher Kandidatengene gibt. Im Vordergrund stehen zwei Gruppen von Kandidatengen: 1) Gene des Folsäurestoffwechsels, da perikonzeptionelle Folsäuregabe das Auftreten von NRD reduziert. 2) Entwicklungsgene, für die Expressionsanalysen und Tiermutanten eine Bedeutung in der Neurulation nahelegen.

Es gibt viele Hinweise dafür, daß bei der NRD-Entstehung Folsäure bzw. der Folsäurestoffwechsel eine zentrale Rolle spielen (Kap. 1.3.1). Folsäure ist ein wasserlösliches Vitamin, das als Cofaktor von Enzymen der RNA- und DNA-Biosynthese und als Methylgruppendonator dient. Die normale Stoffwechselfunktion der Folsäure ist abhängig von einer ausreichenden Zufuhr mit der Nahrung sowie von Resorption, Transport und Metabolisierung. Folsäure senkt nachweislich das NRD-Risiko unabhängig von der betroffenen Verschlußstelle (Seller 1995b) und wird in vielen Ländern Frauen mit Kinderwunsch zur perikonzeptionellen Einnahme empfohlen (Hall und Solehdin 1998b). Hinsichtlich des Folsäurestoffwechsels hat man bisher vor allem das Enzym Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR) untersucht. Ob und welche Rolle die thermolabile Variante der MTHFR als Risikofaktor für NRD spielt, ist noch umstritten. In der vorliegenden Arbeit wurde auf genetischer Ebene untersucht, ob die thermolabile Variante in der deutschen Population ein Risikofaktor ist (Kap. 3.1 und 4.3).

Bei den Entwicklungsgenen gelten vor allem die Gene als Kandidaten, die während der Embryonalentwicklung spezifisch im sich entwickelnden Neuralrohr exprimiert werden (Kap. 1.3.2). Bei manchen von ihnen ist eine wichtige funktionelle Rolle während der Neurulation durch die Untersuchung von Knock-out-Mäusen mit NRD demonstriert worden. In Übersichtsartikeln werden immer wieder NRD-Kandidatengene zusammengetragen, die beim Menschen untersucht werden sollten (Juriloff und Harris 2000; Tab. 4-6). Von Literatur- und Datenbankrecherchen ausgehend wurden für die vorliegende Arbeit sechs besonders interessante Kandidaten (*SLUG*, *CART1*, *NOGGIN*, *TWIST*, *AP2 α* , *MSX2*) ausgewählt und bei NRD-Probanden auf Mutationen durchsucht (Kap. 3.2 und 4.4). Mutationen in diesen Entwicklungsgenen könnten zu einer Beeinträchtigung des Genprodukts führen und die Entstehung eines NRD begünstigen.

Bei komplexen Krankheiten wie NRD könnte der Kandidatengenansatz problematisch sein. Man schätzt, daß an der Neurulation mindestens 1.000 Gene beteiligt sind. Sie alle könnten zur NRD-Entstehung beitragen. Die Erkenntnisse aus Tiermodellen liefern zwar weitere Selektionskriterien, ermöglichen aber nicht die Herausfilterung von wenigen, besonders guten Kandidaten. Es gibt inzwischen mehr als 60 Mausmutanten mit NRD und jedes Jahr kommen neue hinzu. Vor diesem Hintergrund kann der Kandidatengenansatz leicht zur Suche nach der Nadel im Heuhaufen werden. In Anbetracht der Tatsache, daß das Probandengut zu über 90% aus sporadischen Fällen besteht (Tab. 2-1), gibt es aber zur Zeit keine bessere Herangehensweise (Kap. 1.3).

4.3 Die thermolabile MTHFR

Seit Anfang der 1990er Jahre haben mehrere Studien belegt, daß perikonzeptionelle Folsäuregaben eine deutliche Risikoreduktion von erstmaligem und wiederholtem Auftreten nicht-syndromaler NRD bewirken (MRC Vitamin Study Research Group 1991; Czeizel und Dudás 1992; Berry et al. 1999). Man vermutet einen Stoffwechseldefekt, da betroffene Mütter keinen Folsäuremangel, aber erhöhte Homocysteinspiegel zeigten (Mills et al. 1996; van der Put et al. 1997a). Auch bei Mäusen führte Folsäuremangel allein nicht zu NRD (Heid et al. 1992). Deshalb gelten Gene des Folsäurestoffwechsels als Kandidaten bei der Entstehung von NRD. Im Mittelpunkt der Forschungen steht dabei die thermolabile Variante der Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR). Eine reduzierte MTHFR-Aktivität könnte durch Beeinträchtigung des C₁-Stoffwechsels die Entstehung eines NRD begünstigen und würde sowohl die präventive Wirkung von Folsäure als auch den erhöhten Homocysteinspiegel erklären.

Die thermolabile Variante ist im Gegensatz zur seltenen MTHFR-Defizienz (Tab. 4-1) klinisch unauffällig und wird durch eine erhöhte Anfälligkeit bei Temperaturbehandlung *in vitro* sowie eine verminderte Aktivität *in vivo* charakterisiert (Kang et al. 1988, 1991). Folge der verminderten Enzymaktivität kann eine milde Hyperhomocysteinämie sein, die sich durch Folsäuregabe wieder normalisieren läßt (Kang et al. 1988). Da Hyperhomocysteinämie mit vasculären Störungen assoziiert ist (Graham et al. 1997), wird die thermolabile MTHFR nicht nur als Risikofaktor für NRD, sondern auch für Herz-Kreislauferkrankungen diskutiert (Kang et al. 1991; Kluijtmans et al. 1996; Fletcher und Kessler 1998; Bailey und Gregory 1999).

Tabelle 4-1 Charakteristika verschiedener Formen der MTHFR-Unterfunktion

	MTHFR-Defizienz ¹	thermolabile MTHFR ²
Enzymaktivität bei Homozygoten Mutationen	0-20% 14 verschiedene (Missense, Nonsense, Spleiß)	30-50% 677C→T
Homocystein	schwere Hyperhomocysteinämie Hyperhomocystinurie	milde Hyperhomocysteinämie keine Homocystinurie
Folsäure klinischer Phänotyp	erniedrigte Plasma-Folsäure * neurologische und vasculäre Störungen (Arteriosklerose, Thrombose), mentale Retardierung	niedrig oder normal Risikofaktor für - Arteriosklerose - NRD?

¹ Goyette et al. 1994, 1995, 1996, 1998; Kluijtmans et al. 1998. ² Frosst et al. 1995; van der Put et al. 1995.

* Die erniedrigten Plasmafolatwerte sind Folge des Mangels an 5-Methyl-THF, dem Produkt der MTHFR und Hauptzirkulationsform von Folat.

Genetische Ursache der thermolabilen MTHFR ist die Punktmutation 677C→T, die zu einem Aminosäureaustausch von Alanin zu Valin (A222V) in der katalytischen Domäne des Proteins führt (Frosst et al. 1995). Der Alanin-Rest ist evolutionär sehr stark konserviert und auch im *E. coli*-Homolog vorhanden (Goyette et al. 1994). Die Enzymaktivität 677CT-Heterozygoter liegt bei 65%, die 677TT-Homozygoter bei 30-50% (Frosst et al. 1995; Kluijtmans et al. 1996). Mindestens 5% der kaukasischen Bevölkerung sind 677TT-homozygot (Botto und Yang 1999). Einen Überblick über die komplexen Zusammenhänge zwischen NRD, Homocysteinspiegel, thermolabiler MTHFR und 677C/T-Genotyp gibt Abb. 4-1.

Da der *MTHFR* 677C/T-Genotyp mit dem biochemischen und physiologischen Phänotyp korreliert (Abb. 4-1), wurde vermutet, daß er auch mit dem klinischen Phänotyp NRD korreliert. Wenn die thermolabile MTHFR eine Ursache von NRD ist und der Polymorphismus 677C→T die Ursache der thermolabilen MTHFR, müßte es auch eine Assoziation des *MTHFR* 677C/T-Genotyps mit dem Krankheitsphänotyp geben. Das heißt, bei NRD-Patienten müßte das 677T-Allel häufiger auftreten als bei nichtbetroffenen Kontrollpersonen. Viele Studien haben diesen Zusammenhang untersucht. Die Ergebnisse sind widersprüchlich. Studien in den USA, den Niederlanden, Irland und Italien haben eine Assoziation mit dem homozygoten 677TT-Genotyp gefunden (van der Put et al. 1995; Ou et al. 1996; de Franchis et al. 1998a; Shields et al. 1999). Studien in Kanada, Norwegen, Großbritannien und Frankreich haben keine Assoziation gefunden (Björke-Monsen et al. 1997; Mornet et al. 1997; Morrison et al. 1998; Christensen et al. 1999). Offensichtlich sind die Ergebnisse populationsabhängig. Daher stellte sich für die vorliegende Arbeit die Frage, ob in der deutschen Population der *MTHFR* 677C/T-Genotyp mit NRD assoziiert ist und als genetischer Risikofaktor angesehen werden muß.

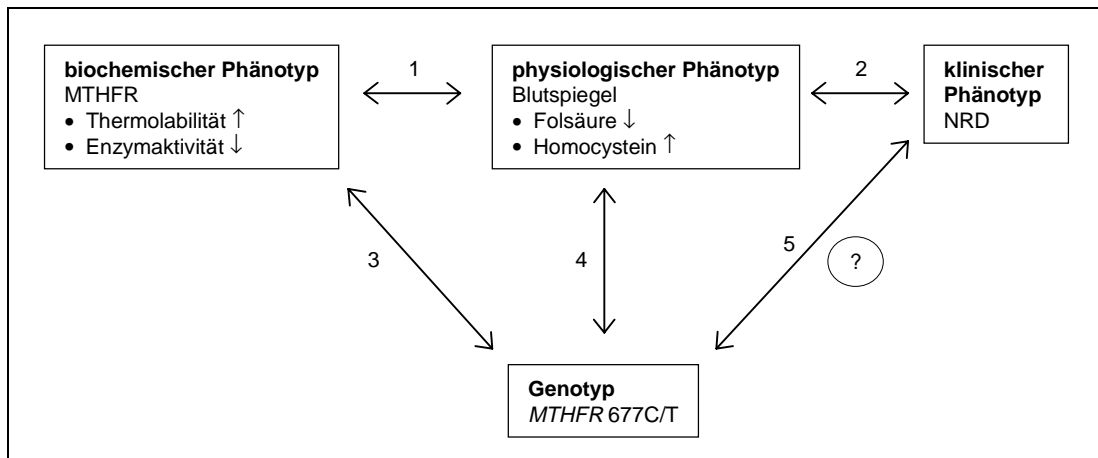


Abbildung 4-1 Phänotyp-Phänotyp- und Genotyp-Phänotyp-Korrelationen bei thermolabiler MTHFR und NRD

- 1** Die thermolabile MTHFR hat eine erniedrigte Enzymaktivität (Frosst et al. 1995; van der Put et al. 1995; Kluijtmans et al. 1996).
Die thermolabile MTHFR korreliert mit einem erhöhten Homocysteinspiegel (Kang et al. 1988, 1991; Engbersen et al. 1995).
Bei thermolabiler MTHFR korreliert ein hoher Homocystein- mit einem niedrigen Folatspiegel (Lucock et al. 1996; Kluijtmans et al. 1996).
- 2** Erhöhte Homocysteinspiegel bei der Mutter korrelieren mit NRD beim Kind (Stegers-Theunissen et al. 1994; Mills et al. 1995).
Erniedrigte Folsäurespiegel bei der Mutter korrelieren mit NRD beim Kind (Hibbard et al. 1965; Smithells et al. 1976; Daly et al. 1995; Kirke et al. 1996).
aber: Bei betroffenen Müttern wurden in manchen Studien normale Folatspiegel gefunden (Molloy et al. 1985; Steegers-Theunissen et al. 1991; Mills et al. 1992).
- 3** Der MTHFR-Polymorphismus 677C→T ist die Ursache der thermolabilen MTHFR (Frosst et al. 1995; van der Put et al. 1995).
- 4** Der MTHFR 677C/T-Genotyp korreliert mit erhöhtem Homocysteinspiegel (Frosst et al. 1995; van der Put et al. 1995; Kluijtmans et al. 1996; Gudnason et al. 1998), insbesondere bei niedrigem Folatspiegel (Jacques et al. 1996; Harmon et al. 1996).
Der MTHFR 677C/T-Genotyp korreliert mit erniedrigtem Folatspiegel (van der Put et al. 1995; Harmon et al. 1996; Molloy et al. 1997, 1998).
- 5** Ist der Genotyp MTHFR 677C/T mit dem Phänotyp NRD assoziiert?
ja: (van der Put et al. 1995; Ou et al. 1996; de Franchis et al. 1998a; Shields et al. 1999).
nein: (Björke-Monsen et al. 1997; Mornet et al. 1997; Morrison et al. 1998; Christensen et al. 1999; Stegmann et al. 1999a).

4.3.1 677C→T

In der vorliegenden Arbeit wurde beim Vergleich der *MTHFR* 677TT-Homozygotenrate von Patienten mit Kontrollen kein signifikanter Unterschied gefunden (Kap. 3.1.1.1 und 3.1.2.1; Stegmann et al. 1999a). Dieses Ergebnis steht in Einklang mit anderen Studien aus Europa. Abb. 4-2 zeigt anschaulich die Ergebnisse der bisherigen europäischen Studien im Vergleich. Dabei wird deutlich, daß es in der 677C/T-Genotypverteilung eine auffällige Heterogenität gibt, sowohl bei der Kontrollgruppe verschiedener Länder als auch bei Patienten und Kontrollen innerhalb eines Landes.

Die vorliegende Arbeit ist die bisher einzige negative europäische Studie mit über 100 Patienten und 100 Kontrollen. In Europa wurde nur in Irland und Italien in Studien von je über 100 Patienten und Kontrollen eine klare Assoziation des *MTHFR* 677TT-Genotyps mit NRD gefunden (de Franchis et al. 1998a; Shields et al. 1999). Ergebnisse aus den Niederlanden waren inkonsistent. In einer ersten Studie mit 55 Patienten und 207 Kontrollen wurde eine Assoziation gefunden (van der Put et al. 1995). In der Folgestudie mit 86 Patienten und 403 Kontrollen wurde keine Assoziation gefunden (van der Put et al. 1998). Das negative Ergebnis der Folgestudie ist auf eine veränderte Homozygotenrate in der Kontrollgruppe zurückzuführen (von 4,8% auf 8,9%); in der Patientengruppe blieb sie in etwa gleich (von 12,7% auf 11,6%).

Dies zeigt die extreme Anfälligkeit von Fall-Kontroll-Studien für verfälschende Effekte durch die Wahl der Kontrollgruppe (Kap. 4.3.9). Daher wurden sie in der vorliegenden Arbeit mit familienbasierten, also Stratifikations-unanfälligen Analysen (TDT) überprüft. Der durchgeführte TDT bestätigte das negative Ergebnis des Fall-Kontroll-Vergleichs (Kap. 3.1.1.2 und 3.1.2.2). Von den Studien mit positivem Assoziationsergebnis wurde nur in der irischen ein TDT durchgeführt und das positive Ergebnis der Fall-Kontroll-Studie bestätigt (Shields et al. 1999).

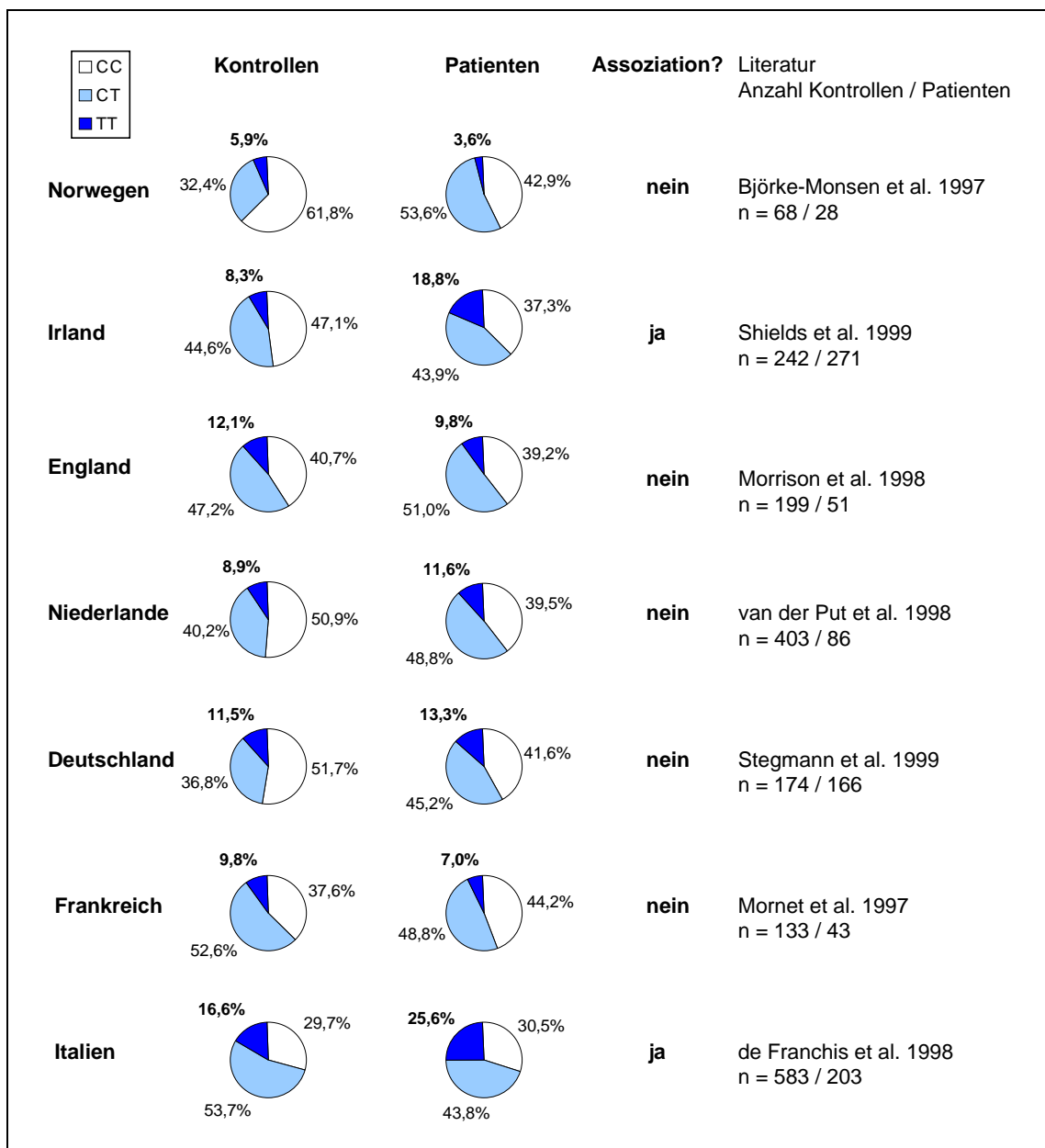


Abbildung 4-2 Prozentuale Verteilung der *MTHFR* 677C/T-Genotypen bei Fall-Kontroll-Assoziationsstudien mit NRD in Europa

4.3.2 1298A→C

Vor kurzem wurde ein zweiter Polymorphismus (1298A→C in Exon 7), der zum Aminosäureaustausch A430E in der regulatorischen Domäne führt, als zusätzlicher NRD-Risikofaktor beschrieben (van der Put et al. 1998). Obwohl er mit einer verminderten Enzymaktivität einhergeht, sind weder der heterozygote noch der homozygote Genotyp mit einem erhöhten Homocystein- oder einem erniedrigten Folatspiegel assoziiert (van der Put et al. 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde keine Assoziation zwischen *MTHFR* 1298A→C und NRD gefunden (Kap. 3.1.2.1; Stegmann et al. 1999a). Das steht in Einklang mit bisherigen Untersuchungen (van der Put et al. 1998; Akar et al. 2000). Tab. 4-2 gibt einen Vergleich der in dieser Arbeit gefundenen 1298A→C Genotyp- und Allelfrequenz mit den bisher veröffentlichten Werten in anderen Populationen.

Van der Put et al. (1998) stellten fest, daß NRD-Patienten häufiger kombiniert heterozygot (677CT-1298AC) waren als Kontrollen. Sie postulierten eine Interaktion zwischen den beiden *MTHFR*-Polymorphismen, denn bei kombinierter Heterozygotie lag die Enzymaktivität niedriger als bei Heterozygotie für jeden einzelnen Polymorphismus. In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls eine höhere Rate an kombiniert Heterozygoten bei NRD-Patienten (24%) als bei Kontrollpersonen (16%) beobachtet. Der Unterschied war allerdings nicht signifikant ($p = 0,07$), so daß die Bedeutung dieser Beobachtung nur durch weitere Untersuchungen geklärt werden kann.

Interessanterweise wurden weder bei Probanden noch bei Kontrollen Genotypkombinationen beobachtet, die drei oder vier Sequenzvarianten zugleich aufwiesen (677TT-1298AC, 677CT-1298CC, 677TT-1298CC; Tab. 3-4). Außerdem wurde kein Allel beobachtet, das beide Sequenzvarianten trug, d.h. der Haplotyp 677T-1298C kam nicht vor. Auch in anderen Studien wurde 677T immer nur in *trans* zu 1298C gefunden (van der Put 1998; Rady et al. 1999). Offensichtlich liegen also die beiden Polymorphismen im Kopplungsungleichgewicht. Vermutlich sind sie getrennt voneinander auf verschiedenen Allelen entstanden. Aufgrund der geringen physikalischen Distanz von rund 2 kb ist ein Rekombinationsereignis äußerst unwahrscheinlich und bei den bisher untersuchten Personen nicht aufgetreten.

Tabelle 4-2 *MTHFR* 1298CC Genotyp- und 1298C Allelfrequenzen in verschiedenen Populationen

Land	n	1298CC	1298C	Literatur
Europa				
Niederlande	403	9,4%	0,33	van der Put et al. 1998
Deutschland	174	10,3%	0,30	Stegmann et al. 1999a
Türkei	76	5,3%	0,29	Akar et al. 2000
Nordamerika				
Kanada, Montreal	274	9,5%	0,26	Weisberg et al. 1998
USA, Texas (Weiße)	187	11,2%	0,35	Rady et al. 1999
USA, Texas (Aschkenasim-Juden)	149	8,1%	0,27	Rady et al. 1999
USA, Kalifornien (Schwarze)] 449	-	0,13	Gregg et al. 1998
USA, Kalifornien (Asiaten)		-	0,19	Gregg et al. 1998
USA, Kalifornien (Indianer)		-	0,10	Gregg et al. 1998
USA, Kalifornien (Hispanier)]	-	0,20	Gregg et al. 1998
Mittel- und Südamerika				
Brasilien, Sao Paulo (gemischt)	190	5,8%	0,23	Franco et al. 1999

4.3.3 Die Rolle der Mutter

Verschiedene Studien fanden heraus, daß der Folat- und Homocysteinstatus der Mutter eine Auswirkung auf die Entstehung von NRD bei ihren Kindern hat (Kirke et al. 1993; Molloy et al. 1998). Ein erhöhter Homocystein- und ein erniedrigter Folatspiegel bei der Mutter waren mit einem erhöhten NRD-Risiko beim Kind assoziiert (Abb. 4-1). Daher stellte sich die Frage, ob das Risiko für ein krankes Kind durch den Genotyp der Mutter, des Kindes oder einer Kombination beider vermittelt wird. Manche Studien fanden ein erhöhtes Risiko, wenn sowohl Mutter als auch Kind homozygot *MTHFR* 677TT waren (van der Put et al. 1996; Christensen et al. 1999). Dagegen kam eine andere Studie zu dem Schluß, daß allein der kindliche TT-Genotyp mit NRD assoziiert ist, nicht der mütterliche (Shields et al. 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurden die *MTHFR* 677C/T-1298A/C Genotypkombinationen bei 110 Mutter-Kind-Paaren bestimmt (Kap. 3.1.1.3 und 3.1.2.3). Keine Mutter-Kind-Genotypkombination kam häufiger vor als erwartet. Daher scheint der *MTHFR*-Genotyp der Mutter bzw. die Genotypkombination von Mutter und Kind in der deutschen Population kein Hauptrisikofaktor für NRD zu sein (Stegmann et al. 1999a).

4.3.4 Populationsspezifische Unterschiede

Bisher hat man den *MTHFR* 677C→T Polymorphismus in allen untersuchten Populationen gefunden (Tab. 4-3) – allerdings mit sehr heterogenen Genotyp- und Allelfrequenzen. In Mexiko war die 677TT-Homozygotenrate mit 35% am höchsten. Bei Schwarzen verschiedener Ethnien ist der Polymorphismus am seltensten. Unter insgesamt 595 untersuchten Schwarzen aus Afrika und den USA war kein 677TT-Homozygoter (McAndrew et al. 1996; Stevenson et al. 1997; Franco et al. 1998; Giles et al. 1998; Schneider et al. 1998). Bei kaukasischen Populationen in Europa schwankt die 677TT-Rate zwischen 6% (Norwegen) und 17% (Italien). Die vorliegende Arbeit ergab für Deutschland eine mittlere Homozygotenrate von 12%.

Es gibt keine klare Korrelation zwischen der 677TT-Genotypfrequenz und der NRD-Prävalenz. In manchen Populationen verhalten sich die beiden Werte gleichsinnig. Schwarze haben eine niedrige 677TT-Rate und eine niedrige NRD-Prävalenz (Stevenson et al. 1997). Mexikaner haben eine hohe 677TT-Rate und eine hohe NRD-Prävalenz (Mutchinick et al. 1999). In anderen Populationen verhalten sich die beiden Werte gegensinnig. Iren haben eine niedrige 677TT-Rate aber eine hohe NRD-Prävalenz (Shields et al. 1999). Italiener haben eine hohe 677TT-Rate (17%, in der Toskana sogar 30%) aber eine niedrige NRD-Prävalenz (Abbate et al. 1998; de Franchis et al. 1998a). Gründe für das unterschiedliche Verhalten von 677TT-Homozygotenrate und NRD-Prävalenz könnten Umweltfaktoren (Ernährung, Lebensstil; Kap. 4.3.5) und andere genetische Faktoren (Kap. 4.3.10.2) sein.

Die starken populationsspezifischen Unterschiede verdeutlichen, daß Beobachtungen in einer Population nicht ohne weiteres auf eine andere übertragbar sind. Insbesondere die Frage, ob eine Assoziation zwischen dem 677C→T Polymorphismus und NRD vorliegt, muß in jeder Population getrennt untersucht werden. Deshalb sind die im Rahmen dieser Studie erhobenen Daten für die deutsche Population so wichtig (Koch et al. 1998; Stegmann et al. 1999a).

Tabelle 4-3 MTHFR 677TT Genotyp- und 677T Allelfrequenzen in verschiedenen Populationen

Land	n	677TT	677T	Literatur	
Europa					
Norwegen	68	5,9%	0,22	Björke-Monsen et al. 1997	
Baltische Staaten	86	-	0,23	Gudnason et al. 1998	
Irland	242	8,3%	0,31	Shields et al. 1999	
England	199	12,1%	0,36	Morrison et al. 1998	
Großbritannien	85	-	0,35	Gudnason et al. 1998	
Niederlande	403	8,9%	0,29	van der Put et al. 1998	
Deutschland	174	11,5%	0,30	Stegmann et al. 1999a	
Europa - Mitte	125	-	0,31	Gudnason et al. 1998	
Frankreich	133	9,8%	0,36	Mornet et al. 1997	
Schweiz, Basel	118	16,1%	0,39	Todesco et al. 1999	
Italien	583	16,6%	0,43	de Franchis et al. 1998a	
Italien	137	18,3%	0,44	Girelli et al. 1998	
Italien, Toskana	106	30,2%	0,53	Abbate et al. 1998	
Europa - Süd	106	-	0,41	Gudnason et al. 1998	
Türkei	93	7,5%	0,28	Boduroglu et al. 1999	
Türkei	76	10,5%	0,26	Akar et al. 2000	
Nordamerika					
Kanada	97	11,3%	0,34	Christensen et al. 1999	
USA	(Weiße)	120	9,2%	0,31	Speer et al. 1997
USA, Nordost	(Weiße)	77	7,8%	0,34	Giles et al. 1998
USA, Ohio	(Weiße)	101	8,9%	0,30	McAndrew et al. 1996
USA, South Carolina	(Weiße)	151	13,2%	0,35	Stevenson et al. 1997
USA, Kalifornien	(Weiße)	269	11,9%	0,35	Shaw et al. 1998
USA, Texas	(Weiße)	200	12,5%	0,29	Rady et al. 1999
USA, Nordost	(Schwarze)	46	0,0%	0,10	Giles et al. 1998
USA, Ohio	(Schwarze)	102	0,0%	0,10	McAndrew et al. 1996
USA, South Carolina	(Schwarze)	146	0,0%	0,11	Stevenson et al. 1997
USA, Kalifornien	(Hispanier)	169	20,7%	0,42	Shaw et al. 1998
USA, Texas	(Aschkenasim)	155	26,5%	0,48	Rady et al. 1999
Mittel- und Südamerika					
Mexiko	250	34,8%	0,59	Mutchinick et al. 1999	
Brasilien	(Weiße)	107	10,3%	0,37	Arruda et al. 1998
Brasilien	(Schwarze)	137	1,5%	0,20	Arruda et al. 1998
Brasilien	(Indianer)	83	1,2%	0,11	Arruda et al. 1998
Australien					
Sydney	225	10,7%	0,36	Wilcken und Wang 1996	
Asien					
Japan	778	10,2%	0,33	Morita et al. 1997	
Japan	311	18,6%	0,42	Matsushita et al. 1997	
Afrika					
Zentralafrika, Gambia, Kenia, Madagaskar	234	0,0%	0,07	Schneider et al. 1998	
Subsahara	89	-	0,07	Pepe et al. 1998	
Zaire, Kamerun	67	0,0%	0,03	Franco et al. 1998	

n = Anzahl der untersuchten Personen; - = keine Angaben

Übersichtartikel: Fletcher und Kessler 1998; Schneider et al. 1998; Botto und Yang 1999.

4.3.5 Der Einfluß der Umwelt

Mehrere Studien haben festgestellt, daß 677TT-Homozygotie mit einem erhöhten Homocysteinspiegel korreliert (Abb.4-1). Bei genauerer Betrachtung zeigte sich, daß diese Korrelation limitiert ist auf diejenigen 677TT-Homozygoten, die einen Folsäurespiegel im unteren Normalbereich hatten (Harmon et al. 1996; Jacques et al. 1996; Brattström et al. 1998). Offensichtlich kommt es bei homozygoten Trägern der thermolabilen MTHFR-Variante nur dann zu einem Anstieg des Homocysteinspiegels, wenn gleichzeitig die Versorgung mit Folsäure suboptimal ist. Sogar bei 677CT-Heterozygoten stieg der Homocysteinspiegel, wenn der Folatstatus schlecht war (Girelli et al. 1998). Es handelt sich also um eine Gen-Ernährung-Interaktion (Motulsky 1996).

Einen Zusammenhang zwischen Ernährung und NRD hat man schon lange festgestellt. So ergab eine Studie, daß eine schlechte Ernährung in der frühen Schwangerschaft mit NRD beim Kind assoziiert ist (Laurence et al. 1980). Es gibt auch Veröffentlichungen über eine höhere NRD-Rate in sozioökonomisch niedriggestellten Gruppen und bei Konzeption am Jahresanfang, wenn es besonders wenig frisches Obst und Gemüse gibt (Elwood et al. 1992). Für eine Gen-Ernährung-Interaktion spricht auch, daß die Kombination von 677TT-Genotyp und niedrigem Folatspiegel mit einem größeren NRD-Risiko einhergeht als die Summe beider Einzelfaktoren (Christensen et al. 1999). Offensichtlich ist es eher die Wechselwirkung von Ernährung und Genotyp als der Genotyp allein, der zu Hyperhomocysteinämie und möglicherweise zu einem erhöhten NRD-Risiko führt.

Dieser Einfluß der Ernährung könnte einen Teil der populationsspezifischen Unterschiede in der NRD-Prävalenz erklären. In Mittelmeerländern enthält die traditionelle Küche viel folatreiches Gemüse und trägt möglicherweise mit zu der niedrigen NRD-Prävalenz bei (Rizzari et al. 1997). In Irland, das in der Vergangenheit eine sehr hohe NRD-Prävalenz hatte, könnte es eine Unterversorgung mit Folsäure gegeben haben. Seit 1987 versetzt man dort Frühstücks-Cerealien mit Folsäure. Eine irische Arbeitsgruppe vermutete, daß der Rückgang der NRD-Prävalenz damit in Zusammenhang steht (Kirke et al. 1993). Neben der Ernährung haben auch andere Faktoren des Lebensstils (u.a. Rauchen, Alkohol, Bewegung) Einfluß auf die Assoziation zwischen 677TT-Genotyp und Homocystein (Nygaard et al. 1997; Giles et al. 1998; DeRose et al. 2000).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß der hyperhomocysteinämische Effekt der thermolabilen MTHFR variabel und abhängig vom Folsäurestatus ist. Der Einfluß der Ernährung und anderer äußerer Faktoren könnte es sehr schwierig machen, eine Assoziation zu NRD festzustellen, selbst wenn der 677TT-Genotyp wirklich ein Risikofaktor sein sollte.

4.3.6 Selektionsvorteil der thermolabilen MTHFR

Die 677C→T Mutation kommt bei mindestens 5% der kaukasischen Bevölkerung homozygot und bei mindestens 30% heterozygot vor (Tab. 4-3). Eine solche hohe Frequenz könnte mit einem Selektionsvorteil zu erklären sein. Der Vorteil bei einer reduzierten MTHFR-Enzymaktivität wurde darin gesehen, daß durch die verminderte Umsetzung von 5,10-Methylen-THF mehr Folatmetaboliten für die Nucleotid-Synthese zur Verfügung stehen (Abb. 1-3; Engbersen et al. 1995).

Auf diese Weise soll der *MTHFR* 677TT-Genotyp unter anderem als Schutzfaktor bei Colonkarzinom wirken. Studien haben bei 677TT-Homozygoten ein 2-4fach niedrigeres Risiko für Colonkarzinom als bei 677CC-Homozygoten festgestellt (Ma et al. 1997). Vermutlich führt die Erhöhung der 5,10-Methylen-THF-Konzentration durch die thermolabile MTHFR zu einer gesteigerten Thymidylatsynthese. Die gesteigerte Methylierung von dUMP zu dTMP vermindert den Uracil-Einbau in die DNA, der zu Chromosomenbrüchen führen kann und ein bekannter Faktor in der Karzinogenese ist (Blount et al. 1997).

4.3.7 Der protektive Mechanismus der Folsäure

Noch ist ungeklärt, über welchen Mechanismus Folsäure das NRD-Risiko reduziert. Der metabolische Defekt könnte neben der MTHFR auch andere Enzyme des Folsäurestoffwechsels betreffen (Abb. 1-3) sowie Faktoren, die an Resorption, Transport und Speicherung von Folat beteiligt sind. Bisher sind aber alle Untersuchungen solcher Folsäure-abhängigen Kandidatengene außer für *MTHFR* ergebnislos gewesen (Tab. 1-2).

Vielleicht ist der Schluß von dem beobachteten präventiven Effekt der Folsäure auf einen Defekt im Folsäuremetabolismus zu simpel. Es kann sein, daß der verantwortliche genetische Defekt außerhalb des eigentlichen Folsäurestoffwechsels liegt. Dafür spricht, daß bei den zwei Mausmutanten, bei denen Folsäure einen präventiven Effekt hat, Gene mutiert sind, deren Produkte keinen offensichtlichen Bezug zum Folsäuremetabolismus haben: *Cart1* und *Pax3* (Tab. 1-3). Es handelt sich um Entwicklungsgene mit spezifischem Expressionsmuster während der Neurulation, die für Transkriptionsfaktoren kodieren. Ein Zusammenhang zwischen *PAX3* und humanen NRD wurde von mehreren Arbeitsgruppen untersucht aber nicht gefunden (Tab. 1-4). *CART1* wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht (Kap. 3.2.2 und 4.4.3.2).

4.3.8 Homocystein als NRD-Risikofaktor

Es ist noch nicht geklärt, ob Hyperhomocysteinämie nur ein Marker für eine thermolabile MTHFR und einen niedrigen Folatstatus ist oder ob Homocystein selber als NRD-Risikofaktor wirkt (Stegers-Theunissen et al. 1994; Mills et al. 1995). Direkte Exponierungsversuche an Vogelembryonen haben Hinweise auf eine teratogene Wirkung von Homocystein geliefert (Rosenquist et al. 1996). Eine Studie stellte bei SBA-Patienten und deren Eltern erhöhte Homocysteinspiegel fest (van der Put et al. 1997a). Allerdings fanden die Messungen lange nach dem kritischen Zeitpunkt der Neurulation statt. Da der Homocysteinspiegel stark durch die Ernährung (Methionin, Folat, Vitamin B₁₂, Vitamin B₆) beeinflusst wird (Abb. 1-3; Miner et al. 1991; Lucock et al. 1996), sind solche nachträglichen Untersuchungen in ihrer Aussagekraft zweifelhaft und wurden in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt. Aussagekräftiger sind Untersuchungen der Amnionflüssigkeit (Wenstrom et al. 2000a, 2000b), die aber von dem hier untersuchten Patientengut nicht zur Verfügung stand.

Metabolische Ursache für eine Hyperhomocysteinämie kann neben der MTHFR (Remethylierung) auch die Cystathionin- β -Synthase (CBS, Transsulfurierung) betreffen. Deshalb wurde ein CBS-Polymorphismus in unserer Arbeitsgruppe ebenfalls untersucht (Kap. 4.3.10.2).

4.3.9 Methodisches: Fall-Kontroll-Studien

4.3.9.1 Reduzierung der ätiologischen Heterogenität

Es wird davon ausgegangen, daß die genetischen Ursachen mit dem Typ und der Lokalisation des NRD variieren (Kap. 4.1). Bei der Suche nach den genetischen Ursachen sollte das Patientengut deswegen in möglichst homogene Subgruppen eingeteilt werden, bei denen man eine gemeinsame Ätiologie annehmen kann. Besser als die übliche (und auch in der vorliegenden Arbeit verwendete) grobe anatomische Klassifikation (Kap. 2.2) wäre eine Klassifikation nach embryologischen Mechanismen wie der betroffenen Verschlussstelle (Kap. 1.2.1). Die ätiologische Heterogenität ließe sich durch Einteilung nach zusätzlichen Gesichtspunkten wie Ernährungsstatus und Folsäureprophylaxe der Mutter weiter reduzieren. Praktisch wird das aber nur eingeschränkt möglich sein.

4.3.9.2 Wahl der Kontrollgruppe

Die Gültigkeit von Fall-Kontroll-Studien hängt entscheidend von der Wahl der Kontrollgruppe ab. Fälle und Kontrollen sollten aus einer homogenen Gruppe stammen und sich allein in Bezug auf die interessierende Variable (hier: Vorhandensein oder Nichtvorhandensein eines NRD) unterscheiden. Durch inadäquate Wahl der Kontrollen kann es zu falschen Ergebnissen kommen. So ließe sich in San Francisco eine Assoziation feststellen zwischen dem HLA-A1-Allel und der Fähigkeit, mit Stäbchen essen zu können (Lander und Schork 1994). Grund ist allerdings kein Kausalzusammenhang zwischen dem HLA-Locus und der Eßkultur, sondern ein häufigeres Auftreten des A1-Allels bei Asiaten verglichen mit Kaukasiern. Eine solche sogenannte Populationsstratifikation kann durch sorgfältige Auswahl der Kontrollen und durch familienbasierte Assoziationsstudien vermieden werden.

Gerade vor dem Hintergrund der großen Unterschiede in den *MTHFR* Allel- und Genotypfrequenzen in verschiedenen Populationen (Tab. 4-3) wird klar, daß für eine aussagekräftige Assoziationsstudie Fälle und Kontrollen aus ethnisch homogenen Bevölkerungsgruppen stammen sollten. Im Gegensatz zu europäischen Populationen ist die US-amerikanische Bevölkerung durch Immigration genetisch sehr inhomogen. Die untersuchte Patientengruppe (n = 41) der bisher einzigen US-amerikanischen Assoziationsstudie mit positivem Ergebnis bestand aus 34 Weißen und 7 Schwarzen. Dabei ist bekannt, daß die 677T-Allelfrequenz bei Schwarzen wesentlich niedriger liegt als bei Weißen (Tab. 4-3). Zudem ist die NRD-Prävalenz bei Weißen etwa doppelt so groß wie bei Schwarzen (Schiltenswolf und Carstens 1990). Bei diesen Populationsunterschieden ist es leicht vorstellbar, daß Stratifizierung zu falsch positiven Assoziationsergebnissen führt.

Fälle und Kontrollen sollten auch in Bezug auf ihr Alter vergleichbar sein, denn der Anteil 677TT-Homozygoter ist altersabhängig. In Frankreich, Japan und der Schweiz wurde festgestellt, daß innerhalb derselben Population der 677TT-Homozygotenanteil mit steigendem Alter abnimmt (Faure-Delanef et al. 1997; Matsushita et al. 1997; Todesco et al. 1999). Offensichtlich senkt die homozygote Mutation die Lebenserwartung, möglicherweise durch eine erhöhte Anfälligkeit für Herz-Kreislaufkrankungen. Vor dem Hintergrund einer Gen-Umwelt-Interaktion (Kap. 4.3.5) müßte ein ideales Matching außerdem Ernährung, Rauchen und andere Faktoren des Lebensstils umfassen.

In der vorliegenden Arbeit stammten die Patienten und Kontrollen aus der gleichen deutschen Population. Die Patienten wurden über eine NRD-Ambulanz rekrutiert und repräsentieren daher ein breiteres Spektrum sozioökonomischer Gruppen als beispiels-

weise bei einer Rekrutierung über eine Selbsthilfeorganisation. Bei den Kontrollpersonen handelt es sich hauptsächlich um Studenten, Mitglieder eines Sportvereins und Klinikangestellte. Es wurde sichergestellt, daß die Kontrollpersonen keinen NRD hatten. Eine detaillierte Familienanamnese wurde allerdings nicht erhoben. In Alter- und Geschlechtsverteilung entsprechen die Kontrollen etwa den Fällen. Da die Kontrollpersonen aber ganz überwiegend einer Mittelschicht angehören, decken sie wahrscheinlich nicht das ganze sozioökonomische Spektrum der Patienten ab.

Tabelle 4-4 Gesichtspunkte beim Studiendesign von Fall-Kontroll-Studien bei NRD und ihre Berücksichtigung in der vorliegenden Arbeit

	Gesichtspunkt	berücksichtigt
Patienten	anatomische Einteilung (SBA, A + C, E)	+
	embryologische Einteilung (Verschlußstelle 1 bis 5)	-
Kontrollen	kein NRD	+
	keine SBO	-
	leere Familienanamnese	-
Matching	Ethnie	++
	Alter	+
	Geschlecht	+
	sozioökonomische Gruppe	-
	Lebensstil	-

SBA = Spina bifida aperta, A = Anencephalie, C = Craniorhachischisis, E = Encephalocele,
SBO = Spina bifida occulta

4.3.9.3 Gruppengröße

Bei der durchgeführten Assoziationsstudie besagt die Nullhypothese: Es gibt keinen Unterschied der 677TT-Homozygotenfrequenz zwischen Fällen und Kontrollen. Sie läßt sich durch empirische Beobachtungen nur verwerfen, nicht beweisen. Laut Fletcher und Kessling (1998) liegt die minimale Stichprobengröße, die erforderlich ist, um die Nullhypothese zu verwerfen, bei etwa 250 Kontrollen und 250 Fällen. Studien mit kleinerem Stichprobenumfang, die keine Assoziation finden, schließen eine tatsächliche Assoziation nicht aus. Nur eine Studie (mit positivem Ergebnis) verfügte bisher über die geforderten Gruppengrößen (Shields et al. 1999). Daneben gibt es in Europa nur zwei weitere Studien mit mehr als 100 Personen in beiden Gruppen: de Franchis et al. 1998a (positiv) und die vorliegende Arbeit (negativ). Das heißt, die vorliegende Arbeit ist die größte Studie in Europa, die keine Assoziation findet (Stegmann et al. 1999a).

4.3.9.4 Statistischer Test

Selbst bei gleichem Studiendesign (Fall-Kontroll-Vergleich) lassen sich verschiedene statistische Testverfahren anwenden, die zu unterschiedlichen Ergebnissen führen können. Die Wahl des Testverfahrens ist abhängig vom zugrundeliegenden genetischen Modell, das aber im vorliegenden Fall nicht geklärt ist. In dieser Arbeit wurde beim Vergleich von Genotypfrequenzen bei Patienten und Kontrollen der Cochran-Armitage Trend-Test angewendet (Agresti 1991). Bei diesem Test werden alle drei Genotypen miteinbezogen und das Risiko über das gesamte Genotypspektrum betrachtet. Im Gegensatz zum exakten Test nach Fisher, der auf einer Vierfeldertafel beruht, müssen also keine willkürlichen Gruppen zum paarweisen Vergleich gebildet werden. Das zugrundeliegende genetische Modell geht von einem Risikozuwachs mit wachsender Zahl der mutierten Allele aus. Auf biochemischer Ebene läßt sich das mit dem *MTHFR* 677C/T-Genotyp gut in Einklang bringen, denn die Enzymaktivität ist bei 677CC-Homozygoten am höchsten, bei 677CT-Heterozygoten vermindert und bei 677TT-Homozygoten am niedrigsten. Ob das Modell allerdings auch auf klinischer Ebene angemessen ist, läßt sich zum jetzigen Zeitpunkt nicht entscheiden und könnte insbesondere vor dem Hintergrund des diskutierten Heterozygotenvorteils (Kap. 4.3.6) angezweifelt werden.

Die Abhängigkeit des Studienergebnisses vom angewendeten statistischen Verfahren zeigt folgendes Beispiel: Nach Abschluß der vorliegenden Arbeit wurden die Studiengruppen erweitert (um 18 Patienten und 59 Kontrollen) und in einer Untersuchung der Cystathionin- β -Synthase auch auf *MTHFR* 677C \rightarrow T getestet (Richter et al. 2000). In dieser erweiterten Studie detektierte der Cochran-Armitage Test eine signifikante Assoziation, der exakte Test nach Fisher nicht (Tab. 4-5).

Es wäre wünschenswert, andere statistische Verfahren mit mehr Aussagekraft einzusetzen. Verfahren wie Kopplungsanalyse und die Analyse betroffener Geschwisterpaare sind aber wegen der Probandenlage nicht anwendbar. Außerdem sind Assoziationsstudien trotz ihrer prinzipiellen Angreifbarkeit in der Vergangenheit erfolgreich eingesetzt worden. Ein wichtiges Beispiel ist der Nachweis einer Häufung des Apolipoprotein E ϵ 4-Allels bei Patienten mit M. Alzheimer (Saunders et al. 1993).

Tabelle 4-5 Verschiedene statistische Testverfahren haben jeweils Vor- und Nachteile und können zu verschiedenen Ergebnissen kommen

	Exakter Test nach Fisher	Cochran-Armitage
Vorteil	je nach angenommenem Modell lassen sich die CT-Heterozygoten auf die Seite der CC- oder der TT-Homozygoten stellen oder ganz weglassen	nutzt gesamte Information über alle drei Genotypen (CC, CT, TT)
Nachteil	erfordert (willkürliche) Reduktion der Information durch Gegenüberstellung von zwei Gruppen (meist TT versus CC + CT oder TT versus CC)	setzt monoton steigenden Zusammenhang zwischen Genotyp und Risiko voraus
Daten:	OR [90% CI] einseitiger p	OR [90% CI] einseitiger p
vorliegende Arbeit		
Probanden (n = 166): 69 CC, 75 CT, 22 TT	1,18 [0,65; 2,14] 0,31 nicht signifikant	1,29 [0,98; 1,69] 0,06 nicht signifikant
Kontrollen (n = 174): 90 CC, 64 CT, 20 TT		
Richter et al. 2000		
Probanden (n = 184): 73 CC, 83 CT, 28 TT	1,37 [0,82; 2,30] 0,14 nicht signifikant	1,30 [1,02; 1,66] 0,04 signifikant
Kontrollen (n = 233): 113 CC, 93 CT, 27 TT		

Der exakte Test nach Fisher wurde auf TT versus CT + CC angewendet. Die Genotypen beziehen sich auf den *MTHFR*-Polymorphismus 677C→T.

4.3.10 Ausblick

4.3.10.1 Kein Ausschluß der MTHFR als NRD-Risikofaktor

Trotz überzeugender Berichte über eine Korrelation zwischen thermolabiler MTHFR und Homocystein sowie zwischen Homocystein und NRD bleiben Studien über eine Assoziation der thermolabilen MTHFR mit NRD widersprüchlich (Abb. 4-1). In der vorliegenden Arbeit wurde keine Assoziation zwischen dem der thermolabilen MTHFR zugrundeliegenden 677C/T-Genotyp und NRD gefunden. Der große Umfang der untersuchten Personengruppen und die zusätzliche Familien-Analyse machen dieses negative Ergebnis zu einer stichhaltigen Aussage. Trotzdem läßt sich nicht schließen, daß die thermolabile MTHFR keinerlei Risikofaktor in der deutschen Population ist. Da es offenbar nicht der *MTHFR*-Genotyp allein ist, der ein erhöhtes NRD-Risiko bewirkt, sondern das Zusammenspiel dieses Genotyps mit suboptimaler Folsäureversorgung, könnte eine gute Ernährung einen maskierenden Effekt haben. Neben einer Vergrößerung der Fall- und Kontrollgruppen würde vor allem eine (praktisch sehr schwierige) Stratifizierung nach Folatstatus die Aussagekraft einer Assoziationsstudie erhöhen.

4.3.10.2 Cystathionin- β -Synthase (CBS)

MTHFR 677TT-Homozygotie ist der häufigste aber nicht der einzige Grund für milde Hyperhomocysteinämie. So zeigte der Homocysteinspiegel auch dann ein Nord-Süd-Gefälle in Europa (Kap. 4.3.4), wenn nur 677TT-Homozygote verglichen wurden (Gudnason et al. 1998). Offenbar gibt es noch andere Enzymvarianten, die den Homocysteinspiegel beeinflussen.

Ein weiteres wichtiges Enzym bei der Regulation des Homocysteinspiegels ist die Cystathionin- β -Synthase (CBS), die den ersten Schritt der Transsulfurierung von Homocystein katalysiert (Abb. 1-3). Verschiedene NRD-Studien haben den *CBS*-Polymorphismus 844ins68 untersucht (de Franchis et al. 1997, 1998b; Ramsbottom et al. 1997; Morrison et al. 1998; Speer et al. 1999; Akar et al. 2000). Zwei von ihnen fanden eine signifikante Assoziation von NRD zu *MTHFR* 677TT-Homozygotie in Kombination mit *CBS* 844ins68-Heterozygotie (de Franchis et al. 1997, 1998b; Speer et al. 1999). Daher wird diskutiert, ob es sich bei dem *CBS* 844ins68-Allel um einen zusätzlichen Risikofaktor für NRD in manchen Populationen handelt. In unserer Arbeitsgruppe konnte eine Modifier-Funktion von *CBS* 844ins68 in der deutschen Population nicht nachgewiesen werden (Richter et al. 2000).

4.4 Entwicklungsgene

Der größte Teil unseres Wissens über Vorgänge während der Embryonalentwicklung leitet sich aus Beobachtungen und Experimenten an einer kleinen Auswahl von Organismen ab. Man nennt sie Modellorganismen. Ihre Auswahl ist praktisch und historisch bedingt (Wolpert et al. 1999). Es ist wichtig, daß man die Tiere leicht und kostengünstig in großer Zahl züchten kann und daß ihre Embryonen gut zugänglich, groß und robust sind. Sobald eine bestimmte Spezies erforscht und als Modelltier etabliert ist, wird die Untersuchung neuer Fragestellungen eher bei dieser Spezies durchgeführt als bei einem noch nicht etablierten Modell. Als Wirbeltiermodelle dienen heute vor allem Maus, Huhn, Zebrafisch und *Xenopus laevis*. Bei vergleichenden Untersuchungen hat man festgestellt, daß sich die grundlegenden Vorgänge während der Neurulation trotz Unterschieden im Detail stark ähneln, sowohl auf anatomischer wie auf molekularer Ebene (Shimeld 1999). Deshalb gibt es Grund zum Optimismus, daß Studien an Modelltieren Erkenntnisse liefern, die auch für den Menschen relevant sind.

Es erscheint sehr plausibel, daß Defekte am Neuralrohr auf Störungen von Entwicklungsgenen beruhen, die in der dritten bis vierten Woche der menschlichen Embryonalentwicklung während der Neurulation exprimiert werden (Stadium 8-12). Aus Untersuchungen an Wirbeltiermodellen sind inzwischen viele Gene bekannt, die während der Neurulation ein spezifisches räumlich-zeitliches Expressionsmuster zeigen und daher als NRD-Kandidatengene gelten. Besonders interessant sind diejenigen Kandidaten, die zusätzlich bei genmanipulativer Veränderung im Tiermodell NRD auslösen (Tab. 1-3).

Für die vorliegende Untersuchung wurden sechs Entwicklungsgene ausgewählt (Tab. 1-5 und 1-6). Vier von ihnen zeigen ein Neurulations-spezifisches Expressionsmuster *und* führen im Tiermodell zu NRD (*SLUG*, *NOGGIN*, *AP2 α* , *MSX2*). Zwei von ihnen werden nicht im sich entwickelnden Neuroectoderm exprimiert, lösen in Knock-out-Mäusen aber trotzdem NRD aus (*CART1*, *TWIST*). Bei diesen beiden Genen wird angenommen, daß sie für die Neurulation notwendige extrinsische Kräfte stören (Smith und Schoenwolf 1997). Alle sechs Gene erscheinen in der wichtigsten humangenetischen Datenbank OMIM unter dem Suchbegriff Neuralrohr. In Übersichtsartikeln werden sie regelmäßig als NRD-Kandidatengene aufgeführt (Tab. 4-6).

Tabelle 4-6 Übersicht über die untersuchten Entwicklungsgene als NRD-Kandidatengene

	<i>Slug</i>	<i>Cart1</i>	<i>Noggin</i>	<i>Twist</i>	<i>AP2α</i>	<i>Msx2</i>
NRD im Tiermodell						
Knock-out (Maus)	-	X	X	X	X	-
Transgen (Maus)	-	-	-	-	-	X
Antisense-Oligos (Huhn)	X	-	-	-	-	-
spez. Expressionsmuster	X	-	X	-	X	X
Übersichtsartikel über Kandidatengene aus Mausmodellen						
Harris und Juriloff 1997	-	X	-	X	X	-
Copp 1998	-	X	-	X	X	-
Harris und Juriloff 1999	-	X	X	X	X	-
Juriloff und Harris 2000	-	X	X	X	X	-
OMIM 2000 "neural tube"	X	X	X	X	X	X

4.4.1 Methodisches: PCR-SSCA

Einige der in dieser Arbeit untersuchten Gene (insbesondere *TWIST*) wiesen einen extrem hohen GC-Gehalt auf. Eine PCR-Amplifizierung stark GC-haltiger Sequenzen ist wegen der hohen Schmelztemperatur und geringeren PCR-Effizienz schwierig, so daß das PCR-Standardprotokoll modifiziert werden mußte (Dutton et al. 1993; Gottlieb et al. 1997). Es wurden denaturierende Zusätze und sehr hitzestabile Polymerasen mit Korrekturaktivität (*Proofreading*) eingesetzt. Die Amplifikation wurde mit einer längeren Denaturierung bei höherer Temperatur durchgeführt, Annealing und Elongation wurden in einem Zwei-Schritt-Programm kombiniert.

Für ein schnelles und effektives Mutationsscreening eines großen Kollektivs kommen generell drei Methoden infrage (Tab. 4-7): Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE), Heteroduplexanalyse (HA) und Einzelstrangkonnformationsanalyse (SSCA). Sie alle basieren auf der PCR und detektieren Sequenzveränderungen über ein abweichendes Migrationsverhalten in der Elektrophorese (Grompe 1993). Die DGGE erreicht eine hohe Sensitivität, erfordert aber eine zeitaufwendige Optimierung (Myers et al. 1987). Die HA erfordert wenig Arbeitsaufwand, erreicht aber nur eine Sensitivität von 80% (White et al. 1992; Prosser 1993). In der vorliegenden Arbeit wurde die SSCA gewählt. Sie verbindet einen geringen Etablierungs- und Arbeitsaufwand mit einer hohen Sensitivität von bis zu 95% (Sheffield et al. 1993). Mit der SSCA kann ein umfangreiches Patientengut in wenigen Arbeitsschritten und in kurzer Zeit auf Sequenzvarianten untersucht werden. Durch Elektrophorese bei zwei verschiedenen Temperaturen und Feinoptimierung für jedes einzelne PCR-Produkt (Kap. 2.3.3) wurde in der vorliegenden Arbeit ange-

strebt, die Sensitivität der SSCA zu maximieren. Die durchschnittliche Größe der untersuchten PCR-Produkte lag bei etwa 210 bp, in Einklang mit der angegebenen optimalen Fragmentlänge von 100 bis 300 bp (Sheffield et al. 1993). Trotzdem muß man davon ausgehen, daß die Sensitivität nicht 100% betrug, denn nicht alle Sequenzveränderungen führen auch zu einer veränderten Konformation des DNA-Einzelstrangs, insbesondere nicht in stabilen GC-reichen Regionen. Wie bei allen PCR-abhängigen Mutationsdetektionsmethoden mußte bei den gefundenen Sequenzvarianten ausgeschlossen werden, daß sie durch ein Artefakt der *Taq*-Polymerase entstanden waren. Die *Taq*-Polymerase hat eine Fehlerrate von etwa 1 Fehler pro 10.000 eingebaute Nucleotide (Newton et al. 1988). Deshalb wurde jede PCR bei auffälligem SSCA-Muster wiederholt. Die Wahrscheinlichkeit für einen *Taq*-Polymerasefehler an derselben Stelle bei einer Wiederholung der PCR ist verschwindend gering.

Einen neuen Ansatz zum Nachweis bekannter und unbekannter Mutationen ermöglicht die DNA-Chip Technologie (Hacia 1999; Wilgenbus und Lichter 1999). Dabei trägt ein Chip die in Oligonucleotide aufgeteilte Sequenz eines oder mehrerer Gene. Eine einzige Hybridisierung der genomischen DNA einer Person gegen den Chip ermittelt, welche Polymorphismen und Mutationen die Person trägt. Auf diese Weise sind schnelle und kostengünstige Screens in großem Stil möglich. Diese Technologie wird in der Zukunft wahrscheinlich die Mutationssuchmethode der Wahl sein.

Tabelle 4-7 Vergleich von Methoden zum Mutationsscreening

	SSCA	DGGE	HA
optimale Fragmentgröße	100-300 bp	bis 600 bp	bis 300 bp
Sensitivität	80-95%	95%	70-80%
1 bp-Austausch detektierbar?	ja	ja	ja
Vorteil	geringer Etablierungs- aufwand	große Fragmente	geringer Arbeitsaufwand
Nachteil	viele Fragmente	Etablierung aufwendig	geringere Sensitivität

Literatur: Grompe 1993; Myers et al. 1987; White et al. 1992

SSCA = Einzelstrangkonnformationsanalyse; DGGE = Denaturierende Gradientengelelektrophorese; HA = Heteroduplexanalyse.

4.4.2 Transkriptionsfaktoren und Krankheiten

Bis auf *NOGGIN* kodieren alle untersuchten Entwicklungsgene für Transkriptionsfaktoren. Es ist bekannt, daß Mutationen in Transkriptionsfaktoren zu congenitalen Fehlbildungen führen können (Tab. 4-8).

Transkriptionsfaktoren binden sequenzspezifisch an regulatorische DNA-Motive (Promotoren, Enhancer, Silencer) und regulieren dadurch die Expression des zugehörigen Gens. Neben konstitutiven regulatorischen Elementen, an die ubiquitäre Transkriptionsfaktoren binden, gibt es auch solche, die zell- und entwicklungspezifisch induziert werden und ein räumlich-zeitlich individuell reguliertes Expressionsmuster erlauben. Viele Transkriptionsfaktoren enthalten mehrere Domänen: eine DNA-bindende Domäne, die direkt mit der DNA in Kontakt tritt, eine Multimerisierungsdomäne, die die Bildung von Homo- und Heteromultimeren erlaubt, und eine oder mehrere Transaktivierungsdomänen.

Die DNA-Bindungsdomänen können eine Reihe konservierter Strukturmodule haben (Harrison 1991; Strachan und Read 1999), darunter:

- Helix-Turn-Helix (HTH)

Dieses Motiv besteht aus zwei α -Helices, die durch eine kurze Aminosäuresequenz (*Turn*) miteinander verbunden sind. Die C-terminale Helix bezeichnet man als Erkennungshelix. Sie interagiert vermutlich mit *cis*-regulatorischen Faktoren, während die andere Helix eine stabilisierende Funktion hat. Bei Eukaryonten ist das HTH-Motiv Teil der sogenannten Homöodomäne, einer konservierten Struktur aus 60 Aminosäuren. In der vorliegenden Arbeit wurden die Gene von zwei Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren untersucht: *CART1* und *MSX2*. Beispiele für Syndrome, die durch Mutationen in der Homöodomäne von Transkriptionsfaktoren verursacht werden, sind Waardenburg-Syndrom Typ 1 (*PAX3*) und Rieger-Syndrom Typ 1 (*PITX*).

- Helix-Loop-Helix (HLH)

Ähnlich dem HTH-Motiv besteht dieses Motiv aus zwei α -Helices. Das Verbindungselement ist länger und bildet eine flexible Schlaufe (*Loop*). Das HLH-Motiv vermittelt sowohl die DNA-Bindung als auch die Homo- oder Heterodimerisierung. In der vorliegenden Arbeit wurde das Gen des HLH-Transkriptionsfaktors *TWIST* untersucht. Mutationen in *TWIST* können zu Saethre-Chatzen-Syndrom führen. Mutationen in *MITE*, das ebenfalls einen HLH-Transkriptionsfaktor kodiert, sind Ursache von Waardenburg-Syndrom Typ 2.

- Helix-Span-Helix (HSH)

Bei diesem Motiv ist die Aminosäuresequenz zwischen den beiden α -Helices noch länger als beim HLH-Motiv. Dieses Motiv wurde bei dem hier genetisch untersuchten Transkriptionsfaktor AP2 α erstmals beschrieben (Williams und Tjian 1991). Datenbank-recherchen ermittelten keinen weiteren Transkriptionsfaktor mit einem HSH-Motiv.

- Zink-Finger (ZnF)

Das in dieser Arbeit untersuchte *SLUG*-Gen kodiert einen Transkriptionsfaktor mit fünf Zinkfingermotiven. Bei diesem Motiv koordinieren vier konservierte Aminosäuren (Histidin- und Cysteinreste) ein zentrales Zn²⁺-Ion derart, daß sich eine fingerförmige Struktur bildet. Diese Struktur wiederholt sich mehrfach hintereinander, wobei jeder Zinkfinger 3 bp der Zielsequenz erkennt. SLUG besitzt vier CCHH-Zinkfinger und einen für die Snail-Familie typischen CCHC-Zinkfinger (Abb. 3-4). Ein Beispiel für eine erbliche Krankheit, die durch Mutationen in einem Zinkfinger-Protein hervorgerufen wird, ist das Greig-Syndrom (*GLI3*).

Tabelle 4-8 Mutationen in Transkriptionsfaktoren als Ursache angeborener Krankheiten

Motiv	Beispiel Gen	Phänotyp	Literatur	in dieser Arbeit untersuchte Gene mit diesem Motiv
HTH	<i>PAX3</i>	Waardenburg-Syndrom Typ 1	Hol et al. 1995	<i>CART1, MSX2</i>
	<i>MSX1</i>	familiäre Zahn-Agenesie	Vastardis et al. 1996 Van den Boogaard et al. 2000	
HLH	<i>PITX</i>	Rieger-Syndrom Typ 1	Semina et al. 1996	<i>TWIST</i>
	<i>TWIST</i>	Saethre-Chotzen-Syndrom	Howard et al. 1997 El Ghouzzi et al. 1997 Gripp et al. 2000	
HSH	<i>MITF</i>	Waardenburg-Syndrom Typ 2	Tassabehji et al. 1994	<i>AP2</i>
	-	-	-	
ZnF	<i>MID1</i>	Opitz-Syndrom	Quaderi et al. 1997	<i>SLUG</i>
	<i>SALL1</i>	Townes-Brocks-Syndrom	Kohlhase et al. 1998	
	<i>GLI3</i>	Greig-Syndrom	Vortkamp et al. 1991 Kalf-Suske et al. 1999	

HTH = Helix-Turn-Helix, HLH = Helix-Loop-Helix, HSH = Helix-Span-Helix, ZnF = Zinkfinger

4.4.3 Sequenzvarianten der untersuchten Entwicklungsgene

In den folgenden sechs Kapiteln (4.4.3.1 bis 4.4.3.6) werden die Einzelergebnisse des SSCA-Screens für jedes untersuchte Gen (*SLUG*, *CART1*, *NOGGIN*, *TWIST*, *AP2 α* und *MSX2*) individuell erörtert. Die Diskussion von Aspekten, die mehrere Gene betreffen, erfolgt im Anschluß daran gemeinsam (Kap. 4.4.4 und 4.4.5). Dazu zählen die Wertung der gefundenen DNA-Sequenzveränderungen als Mutation, Variante oder Polymorphismus, die Beurteilung möglicher pathogener Auswirkungen und die Interpretation der Ergebnisse in Bezug auf das Mausmodell.

4.4.3.1 *SLUG*

Slug ist ein Vertebraten-Gen, das einen Zinkfinger-Transkriptionsfaktor der Snail-Familie kodiert. Während der Neurulation wird *Slug* an den Spitzen der Neuralfaltens und in den Neuralleistenzellen exprimiert (Nieto et al. 1994; Mayor et al. 1995; LaBonne und Bronner-Fraser 1998). Induziert wird die *Slug*-Expression durch BMP4, dem wichtigsten Dorsalisierungssignal (Liem et al. 1995). Die Behandlung mit *Slug*-Antisense-Oligonucleotiden führte beim Huhn zu NRD (Nieto et al. 1994). Außerdem kam es nach mikrochirurgischer Abtragung der Neuralfaltens zu einer erneuten *Slug*-Expression im sich wieder schließenden Neuralrohr (Sechrist et al. 1995; Buxton et al. 1997). Diese Beobachtungen sprechen dafür, daß *Slug* beim Neuralrohrschluß eine Rolle spielt. Deshalb wurde das humane *SLUG* als Kandidatengen gewählt und in dieser Arbeit bei 150 SBA-Probanden nach Sequenzveränderungen durchsucht (Kap. 2.4.2 und 3.2.1).

Es wurden keine Polymorphismen und Varianten gefunden. Auch bei Berücksichtigung einer eventuell nur 80%igen Sensitivität der SSCA muß man daher von einer sehr starken evolutionären Konservierung von *SLUG* ausgehen. Eine SBA-Patientin, aber keine der 136 untersuchten Kontrollpersonen trug heterozygot die Missense-Mutation 1548A→C (D119E). Der ausgetauschte Aspartatrest liegt 11 Aminosäuren vor dem ersten Zinkfinger in der *Slug*-definierenden Region und ist bei allen bekannten *Slug*-Homologen vollständig konserviert (Abb. 3-4). Die Aminosäuresubstitution betraf also einen struktur- und möglicherweise funktionsrelevanten Rest. Bemerkenswerterweise war die Patientin zusätzlich homozygot für den *MTHFR*-Polymorphismus 677C→T, der die thermolabile Enzymvariante kodiert (Tab. 3-16). Möglicherweise haben diese beiden Veränderungen in Kombination mit weiteren Faktoren zur Krankheitsentstehung beigetragen. Allerdings war auch der Vater der Patientin, bei dem eine Spina bifida occulta ausgeschlossen wurde, *SLUG*-Mutationsträger und *MTHFR* 677TT-homozygot. Eine ausführliche Diskussion findet sich in Stegmann et al. 1999b.

Erst kürzlich wurde *Slug* bei der Maus untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß das Expressionsmuster von Maus-*Slug* dem von *Xenopus*- und Huhn-*Snail* ähnelt und umgekehrt. Insbesondere wird Maus-*Slug* nicht in prä-migratorischen, sondern erst in migrierenden Neuralleistenzellen exprimiert. Außerdem zeigten homozygote *Slug*-KO-Mäuse keinen NRD, sondern waren überraschenderweise lebensfähig und fertil, lediglich minderwüchsig (Jiang et al. 1998b). Diese Beobachtung bei der Maus schließt nicht aus, daß ein durch die Missense-Mutation D119E verändertes SLUG-Protein einen negativen Effekt auf die Neurulation hat. Sie legt aber nahe, daß *SLUG* kein Haupt-Kandidatengen ist. Es wird nun angenommen, daß die Sequenz, jedoch nicht die Funktion von *Slug* konserviert wurde und Maus-*Snail* die Funktion von *Xenopus*- und Huhn-*Slug* übernommen hat (Sefton et al. 1998). Daher könnte das humane *SNAIL* ein NRD-Kandidatengen sein. Um das zu entscheiden, wäre der Phänotyp einer *Snail*-KO-Maus (evtl. einer *Slug-Snail*-Doppel-KO-Maus) interessant.

4.4.3.2 *CART1*

Der Transkriptionsfaktor *Cart1* wird von einem *paired* Homöobox-Gen kodiert. Expressionsstudien an Ratten- und Mäuseembryonen haben gezeigt, daß *Cart1* im Kopfmesenchym und den Neuralleisten-Abkömmlingen exprimiert wird (Zhao et al. 1996). Diese Strukturen spielen eine wichtige Rolle bei der cranialen Neuralrohrentwicklung (Chen und Behringer 1995). Bei Knock-out-Mäusen hatte die Ausschaltung von *Cart1* eine Anencephalie zur Folge (Zhao et al. 1996). Die Entwicklung der mesenchymalen Zellen zwischen Neuroectoderm und Oberflächenectoderm war gestört, und der Neuralrohrschluß an Verschlussstelle 2 blieb aus. Interessanterweise hatte Folsäure bei den Knock-out-Mäusen einen präventiven Effekt. Wurden die trächtigen Weibchen mit Folsäure behandelt, konnten 76% der NRD bei ihren Nachkommen verhindert werden (Zhao et al. 1996). Deshalb gilt das humane *CART1* als Kandidatengen für Folsäure-präventierbare NRD, deren Anteil beim Menschen auf 70% geschätzt wird, und wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht (Kap. 2.4.3 und 3.2.2). Zunächst wurde die genomische Struktur von *CART1* bestimmt und anschließend der Großteil des kodierenden Bereichs bei 173 NRD-Probanden nach Mutationen durchsucht. Die Aufklärung der Exon-Intron-Struktur ermöglicht in Zukunft auch eine Untersuchung der Spleißstellen.

Sequenzveränderungen, die ausschließlich bei Probanden auftraten, wurden nicht gefunden. Es wurden vier Polymorphismen gefunden, drei davon exonisch im insgesamt weniger konservierten Exon 1 (Abb. 3-6). In den stärker konservierten Bereichen, insbesondere in der Homöobox, fanden sich keine Sequenzabweichungen. Die Genotyp-

verteilungen der vier Polymorphismen bei Probanden und Kontrollen wiesen keinen statistisch signifikanten Unterschied auf (Tab. 3-9). Zwei der Polymorphismen führten zu Veränderungen der vorhergesagten Aminosäuresequenz (H61L und R64L). Die ausgetauschten Aminosäuren waren bei den Homologen von Ratte und *Xenopus* identisch (Abb. 3-6). Da sie evolutionär konserviert sind, könnten sie funktional wichtig sein, so daß ihr Austausch Auswirkungen auf das Protein hätte. Die Stelle 64 scheint allerdings polymorph zu sein. Der Austausch R64L trat bei Kontrollen (6/166) etwas häufiger auf als bei Probanden (1/152). Außerdem wurde bei einer Kontrollperson ein anderer Austausch an derselben Stelle gefunden (R64C). Die Bedeutung der beiden Missense-Polymorphismen läßt sich nicht endgültig beurteilen. Es ist nicht ausgeschlossen, daß sie die Funktion des Proteins modifizieren und in Kombination mit anderen Faktoren zur Entstehung eines NRD beitragen können. Als interagierender Faktor scheint die thermolabile MTHFR auszuschneiden, denn keiner der Träger der *CART1* Missense-Varianten war homozygot für 677C→T (Tab. 3-16).

Die vorliegenden Ergebnisse geben keinen Hinweis auf eine Rolle von *CART1* als Risikofaktor für NRD in der deutschen Population. Die Bedeutung dieses Befundes in Bezug auf die Tatsache, daß die Inaktivierung des homologen *Cart1*-Gens bei der Maus NRD auslöst, wird in Kap. 4.4.5 diskutiert.

4.4.3.3 *NOGGIN*

Noggin ist ein sezerniertes Signalpeptid, das über Disulfidbrücken ein Homodimer bildet. Es spielt bei der Musterbildung im Neuralrohr eine wichtige Rolle (Bronner-Fraser und Fraser 1997) und hemmt die Auswanderung der Neuralleistenzellen (Sela-Donnenfeld und Kalchauer 1999). Seine Wirkung vermittelt Noggin, indem es BMP4 bindet und antagonisiert (Zimmerman et al. 1996). So begrenzt Noggin den Bereich der dorsalisierenden Wirkung von BMP4 und ermöglicht die Shh-vermittelte Ventralisierung (Liem et al. 1997). Studien an Vertebraten fanden eine frühe Expression von *Noggin* im Knoten am Vorderende des Primitivstreifens (Maus, Huhn) bzw. im Spemannschen Organisator (der homologen Struktur bei *Xenopus*). Später wird *Noggin* im dorsalen Neuralrohr, in einem Teil der Neuralleistenzellen und im Kopfmesoderm exprimiert (Smith und Harland 1992; Capdevila und Johnson 1998; McMahon et al. 1998). *Noggin*-KO-Mäuse zeigten Defekte in der dorsoventralen Musterbildung des Neuralrohrs und entwickelten craniale und lumbale NRD (McMahon et al. 1998). Die Autoren postulierten, daß Noggin eine Rolle spielt bei der Regulation der Prozesse, die zur Auffaltung und Fusion der Neuralfalten führen.

Deshalb wurde das humane Homolog *NOGGIN* in einem Mutationsscreen bei 170 NRD-Probanden untersucht (Kap. 2.4.4 und 3.2.3). Bei einer SBA-Patientin, ihrem nicht-betroffenen Vater und einer gesunden Kontrollperson wurde eine Missense-Variante gefunden (275G→A: G92E), die bei der Mutter der Patientin und den übrigen 238 getesteten Kontrollpersonen nicht auftrat. Der ausgetauschte Glycinrest (G) liegt in einer Glycinkette, die zwischen Mensch und Maus, nicht aber bei Huhn und *Xenopus* konserviert ist (Abb. 3-8). Glycin ist eine aliphatische Aminosäure mit einer ausgeprägt unpolaren Seitenkette. Im Gegensatz dazu ist die eingetauschte Glutaminsäure (E) eine saure Aminosäure mit einer Carboxygruppe in der Seitenkette, die bei physiologischem pH-Wert ionisiert ist. Daher ist es vorstellbar, daß durch die Missense-Variante dieser unpolare Proteinbereich gestört und so die Funktion des Proteins verändert wird. Doch auch wenn die *NOGGIN*-Variante G92E bei der Patientin eine prädisponierende Rolle gespielt haben sollte, müssen zusätzliche Faktoren interagiert haben, da ihr Vater und eine Kontrollperson ebenfalls Mutationsträger waren, aber keine SBA hatten.

Kürzlich wurden bei Patienten mit syndromalen Gelenkverschmelzungen Mutationen in *NOGGIN* gefunden (Gong et al. 1999). Das steht in Einklang mit den beobachteten Skelettfehlbildungen von *Noggin*-KO-Mäusen (McMahon et al. 1998). Die von Gong und Mitarbeitern gefundenen sieben Mutationen lagen alle in konservierten Bereichen (Kästen in Abb. 3-8). Die in der vorliegenden Arbeit gefundene Variante G92E wurde nicht beschrieben.

Daß *Noggin* neben der Skelettentwicklung auch die Entwicklung des Neuroectoderms entscheidend beeinflusst, demonstrierte die jüngst beschriebene *Chordin-Noggin*-Doppel-KO-Maus (Bachiller et al. 2000). *Chordin* hat eine ähnliche biochemische Aktivität wie *Noggin* und ein überlappendes Expressionsmuster, so daß man von einer redundanten Funktion ausgeht (Piccolo et al. 1996). Die Doppelmутanten hatten ein unterentwickeltes Vorderhirn sowie Defekte der Chorda dorsalis und ähnelten *Shh*-KO-Mäusen.

4.4.3.4 *TWIST*

Das humane *TWIST*-Gen gehört zu einer Familie evolutionär konservierter bHLH-Transkriptionsfaktoren, die für die Embryogenese essentiell sind. Ursprünglich wurde *twist* in *Drosophila* als rezessiv letale Mutation identifiziert, bei der die Mesoderm-Differenzierung gestört und die Gastrulation unterbrochen ist (Simpson et al. 1983). Neben dem humanen *TWIST* sind Vertebraten-Homologe von *twist* bei Zebrafisch, *Xenopus*, Huhn und Maus isoliert worden (Abb. 3-9). In der frühen Mausentwicklung wird *Twist* in Zellen mesodermalen Ursprungs und in prämitotischen Zellen der cranialen Neurallei-

ste exprimiert (Füchtbauer 1995; Gitelman 1997). Obwohl *Twist* selber nicht im Neuralrohr exprimiert wird, zeigten KO-Mäuse NRD im cranialen Bereich (Chen und Behringer 1995). Es wird vermutet, daß das Mesenchym die Neurulation unterstützt, indem es die korrekte Wölbung und Gegenüberstellung der Neuralfalten koordiniert. Wird *Twist* ausgeschaltet, kommt es zu Mesenchymdefekten und damit zu einer gestörten Neurulation.

Deshalb wurde *TWIST* als Kandidatengen für humane NRD ausgewählt und bei 130 NRD-Patienten auf Sequenzveränderungen untersucht (Kap. 2.4.5 und 3.2.4). Erstaunlicherweise wurden keinerlei Veränderungen gefunden, auch keine synonymen. Offensichtlich ist *TWIST* extrem stark konserviert. Es ist natürlich nicht auszuschließen, daß vorhandene Sequenzveränderungen nicht detektiert wurden, zumal das Gen sehr GC-reich ist und ein hoher GC-Anteil die SSCA-Sensitivität vermindern kann. Doch auch bei niedriger Sensitivität hätten Polymorphismen bei Vorhandensein detektiert werden können.

Während homozygote *Twist*-KO-Mäuse NRD zeigten, entwickelten heterozygote KO-Mäuse unter anderem Schädeldefekte, so daß *TWIST* auch als Kandidatengen für Craniumsynostosen galt. Bei Patienten mit Saethre-Chatzen-Syndrom, einer syndromalen Form der Craniumsynostose, wurde eine Reihe von Insertionen und Deletionen sowie Missense- und Nonsense-Mutationen in funktionellen Domänen gefunden (Gripp et al. 2000). Funktionsanalysen haben gezeigt, daß die Mutationen zu einer erhöhten Protein-degradation, einem Verlust der Dimerisierungsfähigkeit oder einer falschen subzellulären Lokalisation führen und bestätigten so, daß Haploinsuffizienz der pathogene Mechanismus ist (El Ghouzzi et al. 2000). Vielleicht sind beim Menschen, anders als bei der Maus, *TWIST*-Mutationen nur an Fehlentwicklungen des Schädels, aber nicht an NRD beteiligt.

4.4.3.5 *AP2 α*

AP2 α gehört zu einer Genfamilie, von der bisher drei Mitglieder identifiziert sind (*AP2 α* , *AP2 β* , *AP2 γ*) (Williamson et al. 1996). Sie kodieren Transkriptionsfaktoren, die in ihrer Dimerisierungs- und DNA-Bindungsdomäne hochkonserviert sind, sich aber in der Transaktivierungsdomäne unterscheiden. *AP2 α* hat eine wichtige regulative Funktion in der Embryonalentwicklung, insbesondere bei der Entwicklung ectodermaler Gewebe. In Maus und Huhn wird *Ap2 α* zuerst in den prä-migratorischen und migrierenden Neuralleistenzellen und in den sich schließenden Neuralfalten exprimiert (Schorle et al. 1996; Zhang et al. 1996; Shen et al. 1997). Später weitet sich die Expression auf die sich entwick-

kelnde Epidermis und das Mesenchym im Kopfbereich aus. Homozygote *Ap2 α* -KO-Mäuse starben perinatal an schweren Entwicklungsfehlern wie Exencephalie und Cranio-Abdominoschisis (Schorle et al. 1996; Zhang et al. 1996). Dabei war die früheste Fehlentwicklung ein komplettes Ausbleiben des Neuralrohrschlusses, das eine Störung der gesamten Kopfentwicklung zur Folge hatte. Die Untersuchung von Maus-Chimären aus Wildtyp- und *Ap2 α* -Null-Zellen bestätigte, daß der defekte Neuralrohrschluß unabhängig war von den anderen Fehlbildungen (Nottoli et al. 1998).

Die *Ap2 α* -Expression ist durch Retinsäure induzierbar (Schorle et al. 1996), die in vielen embryologischen Entwicklungen als wichtiges Morphogen wirkt (Eichele 1997). Wahrscheinlich steht *Ap2 α* als zentraler Schalter zwischen Retinsäure und den von ihr gesteuerten Differenzierungs-Genen, die unter anderem für eine normale Entwicklung des Neuralrohrs sorgen. Deshalb wurde das menschliche Homolog *AP2 α* in die vorliegende Untersuchung von NRD-Kandidatengenomen aufgenommen und bei 170 NRD-Probanden auf Sequenzveränderungen untersucht (Kap. 2.4.6 und 3.2.5).

Es wurden drei Polymorphismen in nicht-kodierenden Bereichen, eine Missense-Variante im alternativen *AP2 α B*-Transkript und zwei stille Mutationen gefunden. Die Polymorphismen traten in der Kontrollgruppe mit gleicher Verteilung auf wie bei den Probanden, so daß ihre Beteiligung an der NRD-Entstehung eher unwahrscheinlich ist. Die bei einer SBA-Patientin gefundene Missense-Variante führt zu einem Austausch von Arginin zu Cystein im alternativen *AP2 α B*-Transkript (R321C). Die eingetauschte Aminosäure Cystein ist im Gegensatz zu Arginin schwefelhaltig und spielt wegen ihrer Fähigkeit zur Ausbildung von Disulfid-Brücken eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung und Homo-/Heterodimerisierung von Proteinen. Die Missense-Variante könnte auf diese Weise zu einem strukturell und funktionell veränderten Protein führen. Allerdings trat sie bei dem nicht-betroffenen Vater der Patientin und bei einer gesunden Kontrollperson ebenfalls auf.

Im kodierenden Bereich von *AP2 α A* wurden nur zwei stille Mutationen gefunden (C308C und T396T), die auffälligerweise bei gesunden Kontrollpersonen nicht auftraten. Eine mögliche Nicht-Neutralität von synonymen Mutationen wird in Kap. 4.4.4.2 diskutiert. Durch die Mutation 924C→T (C308C) bei einer SBA-Patientin entstand ein neues GT-Dinucleotid in Exon 6 und damit möglicherweise eine neue Spleiß-Donorstelle. Von der Patientin wurde cDNA präpariert, so daß weitere Untersuchungen klären können, ob es sich um eine Spleißmutation handelt.

Auch wenn sich die Bedeutung der gefundenen Sequenzveränderungen noch nicht abschließend beurteilen läßt, legen die Ergebnisse nahe, daß *AP2 α* kein wesentlicher kausaler Faktor bei der Auslösung von humanen NRD ist. Möglicherweise haben die

drei *AP2*-Gene *AP2 α* , *AP2 β* und *AP2 γ* redundante Funktionen, so daß erst eine Kombination von *AP2*-Mutationen einen pathogenen Effekt hat. Dafür spricht, daß alle drei Gene starke Homologie zeigen und in den verschiedenen embryonalen Geweben koexprimiert werden. Überraschenderweise zeigten aber *Ap2 β* -KO-Mäuse im Gegensatz zu *Ap2 α* -KO-Mäusen keine anderen Fehlbildungen außer einer Nierenfehlbildung, die postnatal zum Tod führte (Moser et al. 1997). Die Autoren schlossen daraus, daß trotz der Konservierung von Sequenz und Expressionsmuster *Ap2 β* eine andere Funktion hat als *Ap2 α* .

4.4.3.6 *MSX2*

MSX2 ist ein Homöodomänen-Transkriptionsfaktor mit reprimierender Aktivität, der wahrscheinlich bei der BMP4-induzierten Apoptose eine Rolle spielt (Graham et al. 1994; Maden et al. 1997; Marazzi et al. 1997). Ein regulierter programmierter Zelltod ist für den Neuralrohrschluß notwendig (Weil et al. 1997). Bei Maus, Huhn und *Xenopus* wird *Msx2* während der Neurulation im dorsalen Neuralrohr exprimiert, zuerst in den Neuralfalten einschließlich der prämigrationären Neuralleistenzellen, nach dem Neuralrohrschluß in der Deckplatte und dem darüberliegenden Mesenchym und Oberflächenectoderm (Hill et al. 1989; Su et al. 1991; Takahashi et al. 1992; Davidson 1995).

Bei *open brain*, einer Mausmutante mit cranialen und spinalen NRD, fehlte die *Msx2*-Expression im dorsalen Neuralrohr (Günther et al. 1994). Im cranialen Neuralrohr kam es zu ausgedehntem Zelltod und spinal entwickelte sich keine Deckplatte. Die zugrundeliegende *opb*-Mutation wurde noch nicht identifiziert. Die Beobachtungen implizieren aber, daß *Msx2* bei der Apoptose und der dorso-ventralen Musterbildung im Neuralrohr eine Rolle spielt. Außerdem gibt es Studien an transgenen Mäusen (Liu et al. 1995, 1999; Winograd et al. 1997). Sie wurden als Craniosynostose-Modelle untersucht, da eine Missense-Mutation in der konservierten Homöodomäne von *MSX2* (P148H) mit dominant-aktivierender Wirkung bei Craniosynostose vom Boston-Typ gefunden wurde (Jabs et al. 1993; Ma et al. 1996). Neben Craniosynostose zeigten *Msx2*-transgene Mäuse einen gesteigerten Zelltod im Neuroectoderm, besonders in der Neuralleiste, der zu Exencephalie führte (Winograd et al. 1997; Liu et al. 1999). *Msx2* spielt auch bei der Apoptose-Regulation während der Extremitätenentwicklung eine Rolle, da es in den apoptotischen Mesenchymzellen der Interdigitalregionen exprimiert wird (Coelho et al. 1991; Ganam et al. 1996). Die Autoren folgerten, daß *MSX2* bedeutsam sein könnte bei der Regulation des Gleichgewichts zwischen Proliferation und Apoptose der Neuralzellen, das für eine normale Morphogenese notwendig ist.

Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob Mutationen in *MSX2* bei der NRD-Entstehung beteiligt sind, und 200 NRD-Probanden in einem Mutationsscreen analysiert. Es wurden zwei Polymorphismen in nicht-kodierenden Bereichen, ein Missense-Polymorphismus und eine Deletions-Mutation gefunden. Die beiden Polymorphismen im 5'-UTR und im Intron 1 waren vollständig gekoppelt und zeigten keine Assoziation mit NRD, so daß sie sehr wahrscheinlich keine ursächliche Bedeutung für die Krankheit haben. Der Missense-Polymorphismus (T129M) betraf eine evolutionär nicht konservierte Aminosäure. Methionin trägt im Gegensatz zum substituierten Threonin ein Schwefelatom und könnte daher das Protein verändern. Doch beim Maus-Homolog sitzt an dieser Stelle auch ein Methionin, so daß es wahrscheinlich nicht zu einer drastischen Funktionsveränderung des Proteins kommt. Zudem trat der Missense-Polymorphismus bei den gesunden Kontrollpersonen mit der gleichen Häufigkeit auf.

Bei der Deletions-Mutation handelte es sich um eine 9 bp-Deletion im Leseraster, durch die drei Aminosäuren deletiert werden (del68-70ESA). Sie wurde nur bei einem Patienten und nicht bei 232 gesunden Kontrollen gefunden. Von den Eltern des Patienten stand nur die Mutter für die Untersuchung zur Verfügung, sie trug die Mutation nicht. Die deletierten Aminosäuren sind evolutionär nicht konserviert (Abb. 3-13). Jedoch verkürzt sich dadurch ein Proteinabschnitt, der in der Länge bei Mensch und Maus identisch ist. Ausgehend von der evolutionären Konservierung ist es sehr unwahrscheinlich, daß die Deletion zu einem Funktionsverlust des Proteins führt, sie könnte aber eine modifizierende Wirkung haben.

Nach Abschluß des Mutationsscreens wurde eine *Msx2*-KO-Maus beschrieben, die Defekte in der Schädelossifikation, aber keinen NRD zeigte (Satokata et al. 2000). In Einklang damit stehen jüngst gefundene Mutationen in *MSX2* bei Patienten mit Ossifikationsstörung des Schädels (Wilkie et al. 2000).

4.4.4 Mutation, Variante, Polymorphismus

Bei der hier angewendeten Klassifizierung der Sequenzveränderungen spielen epidemiologische und funktionelle Gesichtspunkte eine Rolle (Abb. 4-3). Zunächst werden nach der Allelfrequenz in der Bevölkerung Varianten ($< 1\%$) von Polymorphismen ($\geq 1\%$) unterschieden. Varianten, die nicht bei gesunden Kontrollen vorkamen, werden als Mutationen bezeichnet, auch wenn sie bei nicht-betroffenen Familienmitgliedern ebenfalls auftraten. Im Anschluß an diese epidemiologische Einteilung wird eine Gewichtung nach funktionellen Gesichtspunkten vorgenommen (kodierender/nicht-kodierender Bereich, synonym/nicht-synonym). Eine (pathogene) Mutation im strengen Sinne, die *ausschließlich* in Betroffenen vorkommt *und* zu einer veränderten Funktion des Genprodukts führt, wurde nicht gefunden.

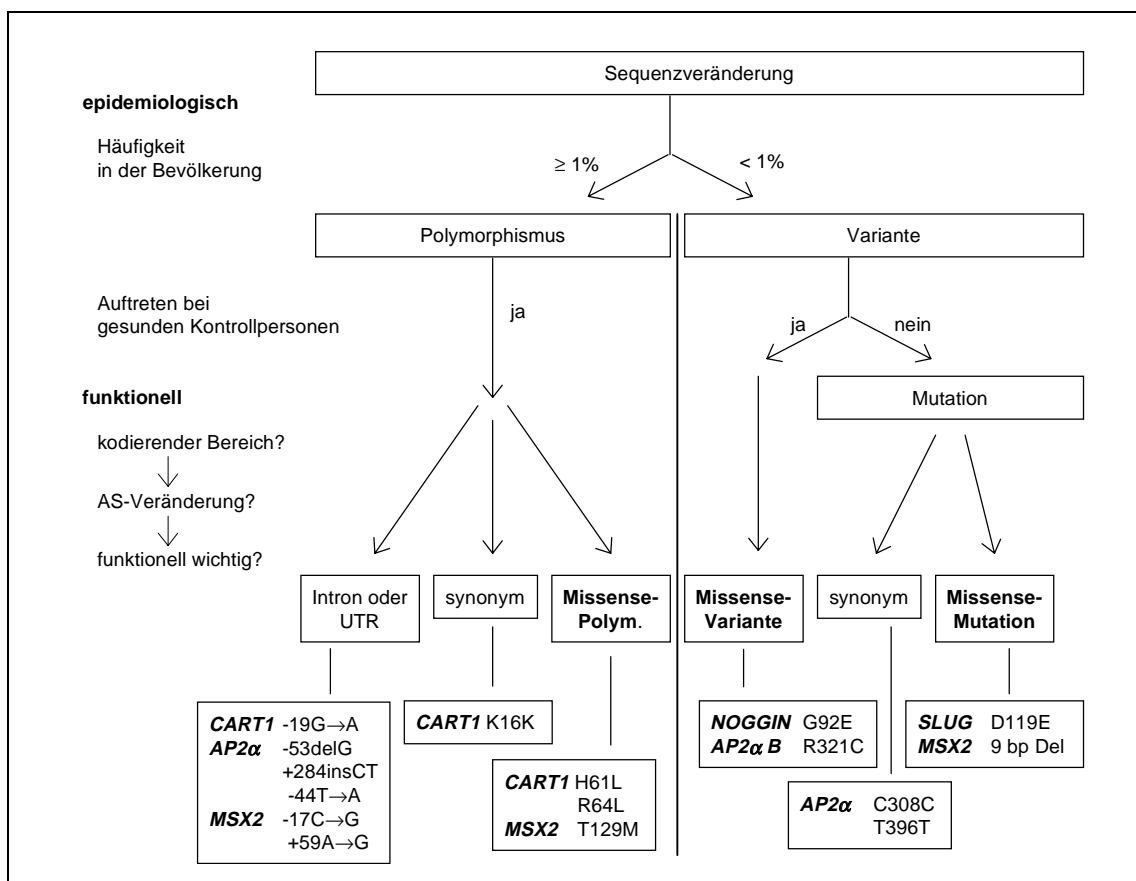


Abbildung 4-3 Klassifizierung der gefundenen Sequenzveränderungen

Der Entscheidungsbaum stellt nur die Äste dar, die für die gefundenen Sequenzveränderungen von Bedeutung sind. Alle Varianten kamen nur heterozygot, nicht homozygot vor. Die 9 bp-Deletion in *MSX2* ist bei den Missense-Mutationen eingeordnet. AS = Aminosäure

4.4.4.1 Nicht-synonyme Sequenzveränderungen

Als möglicherweise krankheitsrelevant gelten vor allem die nicht-synonymen Veränderungen, von denen in der vorliegenden Arbeit eine 9 bp-Deletion und sechs Missense-Veränderungen (drei Polymorphismen, zwei Varianten, eine Mutation) gefunden wurden (Tab. 4-9). Bei nicht-synonymen Veränderungen versucht man abzuschätzen, ob sie auch nicht-neutral sind, das heißt, ob sie eine Auswirkung auf die Funktion des Genprodukts haben. Eine Funktionsveränderung wird wahrscheinlicher wenn 1) ein nichtkonservativer Aminosäureaustausch vorliegt, 2) ein Proteinabschnitt mit einer wichtigen Funktion betroffen ist und 3) die Substitution eine Aminosäure betrifft, die bei zahlreichen verschiedenen Spezies oder innerhalb einer Genfamilie konserviert ist.

Keine der gefundenen Missense-Veränderungen führte zu einer Aminosäuresubstitution in einem bekannten Strukturmotiv (DNA-Bindungsdomäne, Transaktivierungsdomäne). Die *SLUG*-Mutation lag jedoch in der sogenannten *Slug*-definierenden Region (Abb. 3-4). Die Mutationen *SLUG* D119E und *MSX2* 9 bp-Deletion kamen bei den gesunden Kontrollpersonen nicht vor, so daß ein Zusammenhang zu NRD naheliegt. Die *SLUG*-Mutation trat allerdings auch bei dem gesunden Vater der Patientin auf und die *MSX2*-Deletion betraf drei evolutionär nicht konservierte Aminosäuren. Bei den Missense-Veränderungen in *CART1*, *NOGGIN* und *AP2 α* handelte es sich um nichtkonservative Aminosäuresubstitutionen von zum Teil evolutionär konservierten, also vermutlich strukturelevanten Resten.

Bei allen Missense-Veränderungen ist es denkbar, daß sie die Struktur und Funktion des Proteins verändern und so zur Ätiologie des NRD beigetragen haben. Da allerdings auch gesunde Personen Mutationsträger waren, können sie allein nicht hinreichende Ursache eines NRD sein. Der NRD-Phänotyp könnte aber aus der Interaktion der Missense-Veränderung mit einer zweiten, nicht detektierten Veränderung in demselben Gen oder mit weiteren, noch unbekanntem Loci entstanden sein. Ein möglicher interagierender Faktor könnte die thermolabile MTHFR sein. Den für diese Enzymvariante verantwortlichen Genotyp 677TT wies die Patientin mit der *SLUG*-Mutation auf. Eine Kombination der sechs seltenen Missense-Veränderungen untereinander trat nicht auf.

Um eine prädisponierende Rolle der nicht-synonymen Veränderungen bei der NRD-Entstehung zu belegen, müßte nachgewiesen werden, daß die entsprechenden Aminosäureveränderungen tatsächlich Auswirkungen auf die Proteinfunktion haben. Grundsätzlich kann eine Missense-Mutation die Funktion des Genprodukts auf zwei Weisen verändern (Strachan und Read 1999): 1) Das Produkt besitzt nur noch eine eingeschränkte oder überhaupt keine Funktion mehr (Funktionsverlust). 2) Das Produkt zeigt eine anomale

Funktion (Funktionsgewinn). Im allgemeinen führen Funktionsverlustmutationen zu rezessiven Phänotypen. Einige haben jedoch einen dominanten Phänotyp entweder aufgrund eines Dosiseffekts (Haploinsuffizienz) oder wegen einer dominant-negativen Wirkung (vor allem bei Proteinen, die Dimere oder Multimere bilden). Funktionszugewinnmutationen bringen ebenfalls dominante Phänotypen hervor, wenn das betroffene Gen seine Aktivität in den falschen Zellen, zum falschen Zeitpunkt oder in übermäßiger Weise entfaltet. Um funktionelle Veränderungen festzustellen, müßte man das veränderte Protein exprimieren lassen und seine Funktion im Vergleich zum Wildtyp-Protein untersuchen. Ohne solche biochemischen Experimente läßt sich zum jetzigen Zeitpunkt die pathogene Relevanz der gefundenen nicht-synonymen Veränderungen nicht endgültig beurteilen.

Tabelle 4-9 Nicht-synonyme Veränderungen in den untersuchten Entwicklungsgenen

Gen	Veränderung	M/V/P	nicht-konservativ	konserviert	Protein-Strukturmotiv	Patienten (Anzahl)	<i>MTHFR</i> 677TT	nicht-betr. Familienmitglieder	gesunde Kontrollen
<i>SLUG</i>	D119E	M	-	+	(+)	1	+	+	-
<i>CART1</i>	H61L	P	+	+	-	2	-	+	+
	R64L	P	+	+	-	1	-	+	+
<i>NOGGIN</i>	G92E	V	+	(+)	-	1	-	+	+
<i>AP2αB</i>	R321C	V	+	?	-	1	-	+	+
<i>MSX2</i>	T129M	P	+	-	-	44	+	+	+
	del9bp	M	+	-	-	1	-	(-)	-

M = Mutation, V = Variante, P = Polymorphismus. Die evolutionäre Konservierung läßt sich den Alignments in den entsprechenden Ergebnis-Kapiteln entnehmen. Bei der 9 bp-Deletion in *MSX2* stand nur die Mutter des Patienten zur Verfügung. Untersucht wurden mindestens je 130 NRD-Probanden und 130 gesunde Kontrollpersonen (eine Aufstellung der genauen Anzahl der bei jedem Gen untersuchten Personen gibt Tab. 2-3).

4.4.4.2 Synonyme und nicht-kodierende Sequenzveränderungen

Allgemein geht man davon aus, daß Sequenzveränderungen, die zu einem synonymen Codon führen und daher für dieselbe Aminosäure kodieren, keinen Selektionsvor- oder nachteil haben, also neutral sind. Wenn sie aber tatsächlich keinen Angriffspunkt für eine Selektion bieten würden, müßten sie häufiger sein. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kandidatengene waren stark konserviert. In manchen wurden überhaupt keine Polymorphismen gefunden (*SLUG*, *NOGGIN*, *TWIST*). Synonyme Sequenzveränderungen wurden nur in *CART1* (Polymorphismus K16K) und in *AP2 α* (Mutationen C308C und T396T) gefunden. In jüngster Zeit wird eine mögliche Nicht-Neutralität synonymen Codons diskutiert. Synonyme Codons unterscheiden sich in der Häufigkeit ihrer Benutzung (Strachan und Read 1999). Dieser sogenannte Codon-Bias korreliert mit der tRNA-

Verfügbarkeit, der Expression und der Genlänge (Duret und Mouchiroud 1999; Kreitman und Comeron 1999). Vor kurzem fand man außerdem heraus, daß synonyme Codons zu einer unterschiedlichen RNA-Faltung führen (Shen et al. 1999). Auf diese Weise könnten synonyme Veränderungen Einfluß haben auf die RNA-Prozessierung, die Translationskontrolle und den RNA-Abbau. Deshalb läßt sich eine funktionelle Relevanz der in dieser Arbeit gefundenen synonymen Veränderungen nicht ausschließen. Das gilt insbesondere für die beiden *AP2α*-Mutationen, die bei gesunden Kontrollpersonen nicht auftraten.

Außerdem können sich synonyme Mutationen als nicht-neutral erweisen, indem sie eine vorhandene Spleißstelle inaktivieren oder eine kryptische Spleißstelle aktivieren. Schätzungsweise 15% aller pathogenen Punktmutationen wirken über ein aberrantes RNA-Spleißen (Krawczak et al. 1992). Die Möglichkeit einer neu entstandenen Spleißstelle ist insbesondere bei der *AP2α*-Mutation 924C→T (C308C) gegeben und muß anhand der cDNA der Patientin noch überprüft werden.

Sechs Polymorphismen in nicht-kodierenden Bereichen wurden bei *CART1*, *AP2α* und *MSX2* gefunden, zwei davon im 5'-UTR (*CART1* -19G→A und *MSX2* -17A→G), die übrigen in Introns. Regulatorische Elemente, insbesondere Promotoren sind für diese Gene noch nicht untersucht, so daß sich keine Aussage darüber machen läßt, ob sie durch die gefundenen Polymorphismen verändert werden. Gegen eine funktionelle Relevanz spricht, daß alle Polymorphismen bei Probanden und Kontrollen mit gleicher Genotypverteilung auftraten.

4.4.5 Die Maus als Modell

Die Maus steht als Säuger von den vier gängigen Wirbeltiermodellen (Kap. 4.4) dem Menschen am nächsten und wird deshalb am häufigsten als Modellsystem gebraucht. In Gensequenzen und Syntänie sind sich Mensch und Maus überraschend ähnlich (Wakefield und Graves 1996). Einiges spricht dafür, daß die Neurulation morphologisch und genetisch bei Mensch und Maus ähnlich verläuft (Kap. 1.2.1). Daher geht man davon aus, daß Mausmutanten mit NRD Hinweise auf die beteiligten Gene beim Menschen geben können.

Warum wurden dann aber in der vorliegenden Arbeit bei *CART1*, *NOGGIN*, *TWIST* und *AP2α* keine deutlichen Hinweise auf eine Beteiligung dieser Gene an der NRD-Entstehung beim Menschen gefunden, obwohl die homologen Gene bei Knock-out-Mäusen zu NRD führen? Die banale Antwort ist: Die Maus ist nicht der Mensch. Die verblüffende Konservierung zwischen den Spezies und die in vielen Fällen gelungene Übertragung

vom Mausmodell auf den Menschen verführen dazu, diese Tatsache zu vernachlässigen. Es gibt inzwischen eine Reihe von Fällen, in denen das ursächliche Gen einer humanen Krankheit bekannt ist, die Ausschaltung des homologen Maus-Gens aber zu einem anderen Phänotyp führt (z.B. zeigen *Hexa*-KO-Mäuse keinen Tay-Sachs-Phänotyp). Ebenso kann ein ähnlicher Phänotyp aus der Ausschaltung eines anderen Gens resultieren (Phenylketonurie aufgrund eines Defekts in der GTP-Cyclohydrolase statt in der Phenylalanin-Oxidase). Mögliche Erklärungen für diese Diskrepanzen sind Unterschiede auf genetischer, biochemischer, physiologischer und organischer Ebene (Tab. 4-10; Erickson 1989; Wynshaw-Boris 1996). Wegen dieser (größtenteils noch unerforschten) Unterschiede hat die Übertragbarkeit vom Mausmodell auf den Menschen ihre Grenzen. Das gilt mit Sicherheit auch im Zusammenhang mit NRD. Zeigt eine KO-Maus einen NRD, *kann* das homologe Gen bei humanen NRD ebenfalls eine Rolle spielen, *muß* aber nicht. Andersherum läßt sich aus einer KO-Maus ohne NRD-Phänotyp nicht schließen, daß das homologe humane Gen für die Krankheitsentstehung *keine* Rolle spielt. Deshalb können KO-Mäuse mit NRD bestenfalls Hinweise geben, die – wie in der vorliegenden Arbeit geschehen – empirisch geprüft werden müssen. Bereits phänotypisch und epidemiologisch gibt es bei NRD gravierende Unterschiede zwischen Mensch und Maus. Im Gegensatz zum Menschen ist der Großteil der NRD bei Mäusen cranial und syndromisch. Nur sehr wenige Mausmutanten haben eine isolierte SBA. Deshalb ist es möglich, daß die Maus für NRD kein sehr geeignetes Modellsystem ist.

Tabelle 4-10 Gründe für die Unterschiede zwischen Mensch und Maus

Unterschied	Beispiel / Erklärung
genetisch biochemisch	nicht-kodierende Bereiche, Steuerelemente, Regulation <i>Hprt</i> -KO-Mäuse zeigen keinen Lesch-Nyhan-Phänotyp, weil sie Harnsäure zu Allantoin umwandeln können. <i>Hexa</i> -KO-Mäuse zeigen keinen Tay-Sachs-Phänotyp, weil sie einen anderen Gangliosid-Abbau haben.
Signalkaskaden entwicklungsbiologisch	anderes proximales und distales Regulationsnetzwerk anderes Expressionsmuster
absolute Zeit	Entwicklungen beim Menschen, die keine Entsprechung bei der Maus haben (z.B. komplexe Hirnfaltung, große Knochen)
genetischer Hintergrund	Manche Prozesse sind abhängig von der absoluten Zeit, nicht von der Lebensspanne, so daß die Lebensspanne der Maus zu kurz ist, um den Phänotyp zu entwickeln. Dasselbe Gen kann bei verschiedenen Maus-Stämmen zu unterschiedlichen Phänotypen führen (verschiedene Modifier-Gene).

Literatur: Erickson 1989; Wynshaw-Boris 1996.

4.4.6 Ausblick

4.4.6.1 Entwicklungsgene als NRD-Risikofaktoren

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Entwicklungsgene *SLUG*, *CART1*, *NOGGIN*, *TWIST*, *AP2 α* und *MSX2* lassen sich als NRD-Risikofaktoren nicht ausschließen, auch wenn in keinem Gen eine Mutation gefunden wurde, die bei mehreren Patienten und nicht bei Kontrollen auftrat. In dem hier durchgeführten Mutations-Screen wurde nur der kodierende Bereich, einschließlich der Spleißstellen untersucht. Es ist daher möglich, daß es unentdeckte Mutationen in regulatorischen Sequenzen, insbesondere im Promoter gibt. Mit der hier verwendeten PCR-SSCA fallen auch große Deletionen, die das ganze Gen umfassen, nicht auf. Außerdem war die untersuchte Gruppe von je 130 bis 200 Probanden zwar groß, möglicherweise aber nicht groß genug, um bei einer multifaktoriellen Krankheit eine auslösende Mutation mit niedriger Frequenz zu detektieren. Ein Beispiel illustriert das Problem: *SHOX* ist ein Hauptgen für das multifaktorielle Merkmal Körpergröße. Trotzdem tragen nur 1% der Personen mit idiopathischem Kleinwuchs Mutationen in *SHOX*. In einem Mutations-Screen mußten 700 kleinwüchsige Personen untersucht werden, um sechs Mutationen zu finden (Dr. G. Rappold, mündl. Mitteilung). Daraus wird deutlich, daß bei multifaktoriellen Merkmalen ein extrem großes Probandengut untersucht werden muß, um selbst Hauptgene zu finden.

4.4.6.2 Tiermodelle

Zur Zeit ist es unmöglich zu beurteilen, welche der Gene, die bei der Maus NRD auslösen, beim Menschen zu multifaktoriellen NRD beitragen. Daher ist es wünschenswert, daß die NRD-Mausmodelle besser untersucht und die Funktionszusammenhänge der betroffenen Gene weiter aufgeklärt werden. Dazu zählt auch die Analyse von Modifier-Genen, die der unterschiedlichen Penetranz je nach Mausstamm zugrundeliegen. Beispielsweise beträgt die Penetranz des Anencephalie-Phänotyps von *Cart1*-KO-Mäuse 100% bei einem Inzucht-Stamm, aber nur 65% bei einem Hybrid-Stamm (Zhao et al. 1996). Bei *curly tail* sind inzwischen Modifier-Gene identifiziert (Neumann et al. 1994; Letts et al. 1995). Die Abhängigkeit des Phänotyps vom genetischen Hintergrund birgt auch die Gefahr, daß ein wichtiges NRD-Risikogen noch nicht entdeckt ist, weil die Experimente nicht im geeigneten Mausstamm durchgeführt wurden. Bei einigen der wenigen nicht-syndromischen Mausmutanten sind die betroffenen Gene noch nicht identifiziert (*curly tail*, *loop tail*). Die Klonierung und Charakterisierung dieser Gene könnte relevante Hinweise auf beteiligte Gene und Mechanismen bei menschlichen NRD liefern.

4.5 Ausblick

Die genetischen Ursachen komplexer Krankheiten aufzudecken, ist eine der zukünftigen großen Herausforderungen der Molekularbiologie. Komplexe Krankheiten sind weit häufiger als Krankheiten mit einem einfachen Mendelschen Erbgang. Definitionsgemäß beeinflussen mehrere Gene und Umweltfaktoren, ob ein Individuum eine komplexe Krankheit entwickelt. Sind viele Gene beteiligt, leistet jedes von ihnen eventuell nur einen kleinen Beitrag und ist deshalb schwierig zu identifizieren. Außerdem können verschiedene Gene und nicht-genetische Faktoren bei nicht-verwandten Personen zum gleichen Phänotyp führen. Man nimmt an, daß NRD zu diesen komplexen Erkrankungen gehören. Daher wird die Aufdeckung der beteiligten Gene beim Menschen nicht trivial sein.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Polymorphismen des Folsäure-abhängigen Enzyms *MTHFR* und eine Reihe von Entwicklungsgenen, die im Tiermodell zu NRD führen, auf einen Zusammenhang zu NRD beim Menschen untersucht. Eine Assoziation zwischen den *MTHFR*-Polymorphismen 677C→T und 1298A→C und NRD wurde nicht detektiert. In den Entwicklungsgenen wurden einige Sequenzveränderungen gefunden, bei denen ein Beitrag zur NRD-Auslösung vorstellbar, aber nicht gesichert ist.

Wenn die NRD-Anfälligkeit durch eine bestimmte Kombination von Allelen an verschiedenen Loci verursacht wird, die sich von Individuum zu Individuum unterscheiden können, werden Analysen einzelner Allele nicht erfolgreich sein. Es müssen Analysen kombinierter Genotypen durchgeführt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde in einer solchen Kombinationsanalyse eine Interaktion zwischen *MTHFR* und den Entwicklungsgenen nicht entdeckt. Die Ausweitung dieses Verfahrens auf ein größeres Probandenkollektiv und eine umfangreichere Palette an Kandidatengenen könnte aber zur Aufdeckung eines Kombinationsgenotyps mit erhöhtem NRD-Risiko führen.

Kandidatengene für eine solche Untersuchungspalette lassen sich aus der Vielzahl von Genen ableiten, die bei der Maus NRD auslösen. Diese vom Mausmodell abgeleiteten Kandidatengene können jedoch nicht mehr sein als ein erster Ausgangspunkt, um die genetische Basis humaner NRD zu untersuchen. Denn sehr wahrscheinlich sind nicht alle Gene, die an der Entstehung von NRD beim Menschen beteiligt sind, auch bei der Maus involviert und umgekehrt. Trotzdem gilt, was eine Mausgenetikerin vor kurzem so formulierte: „A mouse is not a man, but it is as close as an experimental geneticist can get.“ (Anderson 2000).

5 Zusammenfassungen

5.1 Zusammenfassung

Bisher ist über die Ätiologie von Neuralrohrdefekten (NRD) sehr wenig bekannt. Man geht davon aus, daß NRD multifaktoriell verursacht werden. Einen der beteiligten Faktoren vermutet man im Folsäurestoffwechsel, da perikonzeptionelle Folsäuregaben eine präventive Wirkung haben. Deshalb sind die thermolabile Methylen tetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR) bzw. die Polymorphismen 677C→T und 1298A→C im *MTHFR*-Gen auf einen Zusammenhang mit NRD untersucht worden. In Holland und Irland fand man eine Assoziation dieser Polymorphismen mit NRD. Da solche Daten nicht zwischen verschiedenen Populationen übertragbar sind, stellte sich die Frage, ob die *MTHFR*-Polymorphismen auch in der deutschen Population ein NRD-Risikofaktor sind. Dieser Frage wurde in der vorliegenden Arbeit mit einer populations- und einer familienbasierten Assoziationsanalyse nachgegangen. Es stellte sich heraus, daß die beiden Polymorphismen weder einzeln, noch in einer bestimmten Kombination bei NRD-Patienten häufiger vorkamen als bei Kontrollen. Die Arbeit gibt also keinen Hinweis darauf, daß diese *MTHFR*-Polymorphismen in der deutschen Population an der NRD-Auslösung beteiligt sind.

Neben Faktoren des Folsäurestoffwechsels gelten viele Entwicklungsgene, die in mutierter Form im Tiermodell NRD auslösen, als NRD-Kandidatengene. Nur von wenigen ist bisher das Homolog beim Menschen auf einen Zusammenhang zu NRD untersucht worden. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit sechs solcher Entwicklungsgene ausgewählt (*SLUG*, *CART1*, *NOGGIN*, *TWIST*, *AP2α* und *MSX2*) und auf Sequenzveränderungen bei NRD-Patienten getestet. Die ausgewählten Gene waren besonders interessant, weil bekannt war, daß sie ein spezifisches Expressionsmuster während der Neurulation zeigen und/oder im Tiermodell NRD verursachen. In allen Genen bis auf *TWIST* wurden Sequenzveränderungen gefunden. Neben einer Reihe von Polymorphismen wurden zwei Missense-Varianten, zwei synonyme Mutationen, eine Missense-Mutation (*SLUG* D119E) und eine Deletions-Mutation (*MSX2* 9bpDel) gefunden. Diese Veränderungen traten nicht (Mutation) oder bei weniger als 1% der Bevölkerung auf (Variante). Bei ihnen ist gut vorstellbar, daß sie als einer von mehreren Faktoren zur NRD-Auslösung beigetragen haben. Ihre tatsächliche Krankheitsrelevanz läßt sich nur durch weitere Untersuchungen klären.

5.1.1 Stichwörter

Neuralrohrdefekte (NRD), Spina bifida, *SLUG*, *TWIST*, *CART1*, *AP2 α* , *MSX2*, *NOGGIN*, Transkriptionsfaktoren, Neurulation, SSCA

5.2 Abstract

The aetiology of neural tube defects (NTD) is largely unknown, but is thought to be multifactorial. One contributing factor is assumed to involve an altered folate metabolism since periconceptional folic acid supplementation has been demonstrated to have a preventive effect. One key enzyme in folate metabolism is the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). Therefore, the thermolabile variant of MTHFR, especially the *MTHFR* polymorphisms 677C→T and 1298A→C have been investigated in relation to NTD. Indeed, studies in the Netherlands and in Ireland found an association between *MTHFR* polymorphisms and NTD. Since data of different populations are not transferable, it had to be determined if the *MTHFR* polymorphisms are NTD risk factors in the German population as well. The present investigation was aimed to address this question using a population- and a family-based association study. The data revealed no significant association between NTD and the *MTHFR* polymorphisms, neither alone nor in combination with each other. Thus, the present study provides no evidence that the investigated *MTHFR* polymorphisms are causally related to NTD in the German population.

Further candidates for involvement in NTD are the numerous developmental genes whose mutations result in impaired neural tube closure in animal models. So far, only very few of them have been investigated as risk factors for NTD in humans. In the present study, six developmental genes (*SLUG*, *CART1*, *NOGGIN*, *TWIST*, *AP2 α* , and *MSX2*) were chosen for investigation. They are considered attractive candidates because of their specific expression pattern during neurulation and/or because they lead to NTD in animal models. In all genes except *TWIST*, sequence alterations were detected. Besides some polymorphisms two missense variants, two synonymous mutations, one missense mutation (*SLUG* D119E) and one deletion mutation (*MSX2* 9bpDel) were found. These alterations appeared not (mutation) or in less than 1% (variant) of healthy controls. It is possible that they contributed to the multifactorial development of NTD in our patients. However, their functional relevance remains to be clarified by further investigations.

5.2.1 Key words

neural tube defects (NTD), spina bifida, *SLUG*, *TWIST*, *CART1*, *AP2 α* , *MSX2*, *NOGGIN*, transcription factors, neurulation, SSCA

6 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Acc.No.	Identifikationsnummer der GenBank http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez
ApoB	Apolipoprotein B
ARMS	Amplification refractory mutation system
AS	Aminosäure(n)
BMP	Bone morphogenetic protein
bp	Basenpaar(e)
Brca1	Breast cancer 1
Cart1	Cartilage homeo protein 1
CBS	Cystathionin- β -Synthase
cDNA	komplementäre DNA
DGGE	Denaturierende Gradientengelelektrophorese
CI	Konfidenzintervall
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonucleinsäure)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ENU	Ethylnitrosoharnstoff
et al.	<i>et alteri</i> (und andere)
EX	Exencephalie
FR	Folatrezeptor
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
GTP	Guanosin-Triphosphat
HA	Heteroduplexanalyse
HLH	Helix-Loop-Helix
HSH	Helix-Span-Helix
HTH	Helix-Turn-Helix
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
KO	Knock-out
LD	Linkage Disequilibrium (Kopplungsungleichgewicht)
Macs	Myristoylated alanine rich protein kinase C substrate
Mlp	MARCKS-like protein
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
Msx	msh-like homeo protein
MTHFD	Methylentetrahydrofolat-Dehydrogenase
MTHFR	Methylentetrahydrofolat-Reduktase
MTR	Methyltetrahydrofolat-Homocystein-Methyltransferase (= Methioninsynthase)
MTRR	Methyltransferase-Reduktase
mut	Mutante / mutiert
n	Stichprobenumfang
nt	Nukleotid(e)
NRD	Neuraldefekt(e)
OMIM	Identifikationsnummer im Online-Katalog der menschlichen Gene und Erbkrankheiten (Online Mendelian Inheritance in Man; http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/omim/)
OR	Odds ratio
p	p-Wert

PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAX	Paired box-Gen
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasenkettenreaktion)
Pdgfr	Platelet-derived growth factor receptor
Ptc	Patched homolog
RAR	Retinoic acid receptor
RFLP	Restriction fragment length polymorphism (Restriktionslängenpolymorphismus)
RNA	Ribonucleic acid (Ribonucleinsäure)
SB	Spina bifida
SBA	Spina bifida aperta
SBO	Spina bifida occulta
SHOX	Short stature homeobox-containing gene on X-chromosome
SSCA	Single-stranded conformational analysis (Einzelstrangkonformationsanalyse)
Shh	Sonic hedgehog
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TDI	Transmission disequilibrium test
TF	Transkriptionsfaktor
TGF	Transforming growth factor
THF	Tetrahydrofolat
UTR	Untranslated region (untranslatierter Bereich)
WS	Waardenburg-Syndrom
wt	Wildtyp
<i>Xenopus</i>	<i>Xenopus laevis</i>
ZnF	Zinkfinger

Für Mengen-, Größen-, Zeit- und andere physikalische Angaben wurden SI- oder gesetzliche Einheiten benutzt. Die Basen der Nucleinsäuren und die Aminosäuren wurden mit dem gebräuchlichen Einbuchstabencode abgekürzt.

7 Literatur

- Abbate R, Sardi I, Pepe G, Marcucci R, Brunelli T, Prisco D, Fatini C, Capanni M, Simonetti I, Gensini GF (1998) The high prevalence of thermolabile 5-10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) in Italians is not associated to an increased risk for coronary artery disease (CAD). *Thromb Haemost* 79: 727-730
- Agresti A (1991) *Categorical Data Analysis*. Wiley, New York
- Akar N, Akar E, Deda G, Arsan S (2000) Spina bifida and common mutations at the homocysteine metabolism pathway. *Clin Genet* 57: 230-231
- Anderson KV (2000) Finding the genes that direct mammalian development: ENU mutagenesis in the mouse. *Trends Genet* 16: 99-102
- Arruda VR, Siqueira LH, Gancalves MS, von Zuben PM, Soares MCP, Menezes R, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF (1998) Prevalence of the mutation C677→T in the methylene tetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. *Am J Med Genet* 78: 332-335
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidmann JG, Smith JA, Struhl K (1993) *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, New York
- Bachiller D, Klingensmith J, Kemp C, Belo JA, Anderson RM, May SR, McMahon JA, McMahon AP, Harland RM, Rossant J, De Robertis EM (2000) The organizer factors Chordin and Noggin are required for mouse forebrain development. *Nature* 403: 658-661
- Bailey LB, Gregory JF (1999) Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and other enzymes: metabolic significance, risks and impact on folate requirement. *J Nutr* 129: 919-922
- Balciuniene J, Dahl N, Borg E, Samuelsson E, Koisti MJ, Pettersson U, Jazin EE (1998) Evidence for digenic inheritance of nonsyndromic hereditary hearing loss in a Swedish family. *Am J Hum Genet* 63: 786-793
- Barber RC, Shaw GM, Lammer EJ, Greer KA, Biela TA, Lacey SW, Wassermann CR, Finnell RH (1998) Lack of association between mutations in the folate receptor- α gene and spina bifida. *Am J Med Genet* 76: 310-317
- Bauer R, Imhof A, Pscherer A, Kopp H, Moser M, Seegers S, Kerscher M, Tainsky MA, Hofstaedter F, Buettner R (1994) The genomic structure of the human AP-2 transcription factor. *Nucl Acids Res* 22: 1413-1420
- Beddington RS, Rashbass P, Wilson V (1992) Brachyury - a gene affecting mouse gastrulation and early organogenesis. *Development (Suppl)*: 157-165
- Bennett GD, An J, Craig JC, Gefrides LA, Calvin JA, Finnell RH (1998) Neurulation abnormalities secondary to altered gene expression in neural tube defect susceptible Splotch embryos. *Teratology* 57: 17-29
- Berry RJ, Li Z, Erickson JD, Li S, Moore CA, Wang H, Mulinare J, Zhao P, Wong L-YC, Gindler J, Hong SX, Correa A (1999) Prevention of neural-tube defects with folic acid in China. *N Engl J Med* 341: 1485-1490
- Björke-Monsen AL, Ueland PM, Schneede J, Vollset SE, Refsum H (1997) Elevated plasma total homocysteine and C677T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in patients with spina bifida. *Q J Med* 90: 593-596
- Blom HJ (1998) Mutated 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase and moderate hyperhomocysteinaemia. *Eur J Pediatr* 157: S131-134
- Blount BC, Mack MM, Wehr CM, MacGregor JT, Hiatt RA, Wang G, Wickramasinghe SN, Everson RB, Ames BN (1997) Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: Implications for cancer and neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 3290-3295

- Boduroglu K, Alikasifoglu M, Anar B, Tuncbilek E (1999) Association of the 677C→T mutation on the methylenetetrahydrofolate reductase gene in Turkish patients with neural tube defects. *J Child Neurol* 14: 159-161
- Botto LD, Moore CA, Khoury MJ, Erickson JD (1999) Neural Tube Defects. *N Engl J Med* 341: 1509-1519
- Botto LD, Yang Q (1999) Methylene-tetrahydrofolate reductase (MTHFR) and birth defects. *HuGE Rev* 8 (<http://www.cdc.gov/genetics/hugenet/reviews/MTHFR.html>)
- Bourgeois P, Stoetzel C, Bolcato-Bellemin AL, Mattei MG, Perrin-Schmitt F (1996) The human *H-twist* gene is located at 7p21 and encodes a B-HLH protein that is 96% similar to its murine *M-twist* counterpart. *Mamm Genome* 7: 915-917
- Brand T, Arnold H-H, Andrée B (1999) Entwicklungsgenetische Störungen in der Kardiologie: Zusammenwirken von Grundlagenforschung und Klinik. *Med Genet* 11: 250-256
- Brattström L, Wilcken DEL, Öhrvik J, Brudin L (1998) Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease. *Circulation* 98: 2520-2526
- Brody LC, Baker PJ, Chines PS, Musick A, Molloy AM, Swanson DA, Kirke PN, Ghosh S, Scott JM, Mills JL (1999) Methionine synthase: high-resolution mapping of the human gene and evaluation as a candidate locus for neural tube defects. *Mol Genet Metab* 67: 324-333
- Bronner-Fraser M, Fraser SE (1997) Differentiation of the vertebrate neural tube. *Curr Op Cell Biol* 9: 885-891
- Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC (1991) Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet* 48: 137-144
- Buettner R, Kannan P, Imhof A, Bauer R, Yim SO, Glockshuber R, Van Dyke MW, Tainsky MA (1993) An alternatively spliced mRNA from the AP-2 gene encodes a negative regulator of transcriptional activation by AP-2. *Mol Cell Biol* 13: 4174-4185
- Buxton P, Hunt P, Ferretti P, Thorogood P (1997) A role for midline closure in the reestablishment of dorsoventral pattern following dorsal hindbrain ablation. *Dev Biol* 183: 150-165
- Capdevila J, Johnson RL (1998) Endogenous and ectopic expression of *noggin* suggests a conserved mechanism for regulation of BMP function during limb and somite patterning. *Dev Biol* 197: 205-217
- Capra V, De Marco P, Moroni A, Leonardini M, Faiella A, de Franchis R, Andria G, Boncinelli E, Cama A (1997) Mutations of folic acid receptor alpha in neural tube defects. *Am J Hum Genet* 61 (Suppl): A149
- Chatkupt S, Hol FA, Shugart YY, Geurds MPA, Stenroos ES, Koenigsberger MR, Hamel BCJ, Johnson WG, Mariman ECM (1995) Absence of linkage between familial neural tube defects and PAX3 gene. *J Med Genet* 32: 200-204
- Chaubert P, Bautista D, Benhattar J (1993) An improved method for rapid screening of DNA mutations by nonradioactive single-strand conformation polymorphism procedure. *BioTechn* 15: 586
- Chen Z-F, Behringer RR (1995) *twist* is required in head mesenchyme for cranial neural tube morphogenesis. *Genes & Develop* 9: 686-699
- Chou Q, Russell M, Birch DE, Raymond J, Bloch W (1992) Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucl Acids Res* 20: 1717-1723
- Christensen B, Arbour L, Tran P, Leclerc D, Sabbaghian N, Platt R, Gilfix BM, Rosenblatt DS, Gravel RA, Forbes P, Rozen R (1999) Genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase, folate levels in red blood cells, and risk of neural tube defects. *Am J Med Genet* 84: 151-157
- Coelho CN, Sumoy L, Rodgers BJ, Davidson DR, Hill RE, Upholt WB, Koshier RA (1991) Expression of the chicken homeobox-containing gene *GHox-8* during embryonic chick limb development. *Mech Dev* 34: 143-154

- Cohen ME, Yin M, Paznekas WA, Schertzer M, Wood S, Jabs EW (1998) Human *SLUG* gene organization, expression, and chromosome map location on 8q. *Genomics* 51: 468-471
- Copp AJ (1998) Prevention of neural tube defects: vitamins, enzymes and genes. *Curr Op Neurol* 11: 97-102
- Copp AJ, Brook FA, Estibeiro JP, Shum ASW, Cockroft DL (1990) The embryonic development of mammalian neural tube defects. *Progr Neurobiol* 35: 363-403
- Czeizel AE, Dudás I (1992) Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 327: 1832-1835
- D'Alessio M, Frasch M (1996) *msh* may play a conserved role in dorsoventral patterning of the neuroectoderm and mesoderm. *Mech Dev* 58: 217-231
- Daly LE, Kirke PN, Molloy A, Weir DG, Scott JM (1995) Folate levels and neural tube defects - implications for prevention. *Journal of American Medical Association* 274: 1698-1702
- Davidson D (1995) The function and evolution of *Msx* genes: pointers and paradoxes. *Trends Genet* 11: 405-411
- de Franchis R, Mandato C, Buoninconti A, Sperandeo MP, Capra V, De Marco P, Ricci R, Mastroiacovo P, Salvaggio E, Sebastio G, Andria G (1997) Risk factors for neural tube defects: analysis of common genetic variants of methylenetetrahydrofolate reductase and cystathionine β -synthase. *Am J Hum Genet* 61: A151
- de Franchis R, Buoninconti A, Mandato C, Pepe A, Sperandeo MP, Del Gado R, Capra V, Salvaggio E, Andria G, Mastroiacovo P (1998a) The C677T mutation of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene is a moderate risk factor for spina bifida in Italy. *J Med Genet* 35: 1009-1013
- de Franchis R, Buoninconti A, Fermo I, Sebastio G, Sperandeo MP, Mazzola G, Cerbone AM, Soriente L, Orefice G, Di Minno G, Angelo AD, Andria G (1998b) Increased thrombotic risk for patients with associated 844ins68 mutation of the cystathionine β -synthase (CBS) gene and the 677C \rightarrow T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene. *Am J Hum Genet* 63: A210
- DeRose DJ, Charles-Marcel ZL, Jamison JM, Muscat JE, Braman MA, McLane GD, Mullen JK (2000) Vegan diet-based lifestyle program rapidly lowers homocysteine levels. *Prev Med* 30: 225-233
- DeSesso JM, Scialli AR, Holson JF (1999) Apparent lability of neural tube closure in laboratory animals and humans. *Am J Med Genet* 87: 143-162
- Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS (1991) "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucl Acids Res* 19: 4008
- Dracopoli NC, Haines JL, Korf BR, Moir DT, Morton CC, Seidman CE, Seidman JG, Smith DR (1997) Current protocols in human genetics. John Wiley & Sons, New York
- Duret L, Mouchiroud D (1999) Expression pattern and, surprisingly, gene length shape codon usage in *Caenorhabditis*, *Drosophila*, and *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 4482-4487
- Dutton CM, Paynton C, Sommer SS (1993) General method for amplifying regions of very high G + C content. *Nucl Acids Res* 21: 2953-2954
- Eichele G (1997) Retinoids: from hindbrain patterning to Parkinson disease. *Trends Genet* 13: 343-345
- El Ghouzzi V, Le Merrer M, Perrin-Schmitt F, Lajeunie E, Benit P, Renier D, Bourgeois P, Bolcato-Bellemin A-L, Munnich A, Bonventure J (1997) Mutations of the *TWIST* gene in the Saethre-Chotzen syndrome. *Nature Genet* 15: 42-46
- El Ghouzzi V, Legeai-Mallet L, Aresta S, Benoist C, Munnich A, de Gunzburg J, Bonventure J (2000) Saethre-Chotzen mutations cause *TWIST* protein degradation or impaired nuclear location. *Hum Mol Genet* 9: 813-819
- Elwood JM, Little J, Elwood JH (1992) Epidemiology and control of neural tube defects. Oxford University Press, Oxford

- Engbersen AMT, Franken DG, Boers GHJ, Stevens EMB, Trijbels FJM, Blom HJ (1995) Thermolabile 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase as a cause of mild hyperhomocysteinemia. *Am J Hum Genet* 56: 142-150
- Epstein DJ, Vekemans M, Gros P (1991) Splotch (Sp2H), a mutation affecting development of the mouse neural tube, shows a deletion within the paired homeodomain of Pax-3. *Cell* 15: 767-774
- Erickson RP (1989) Why isn't a mouse more like a man? *Trends Genet* 5: 1-3
- Faure-Delanef L, Quéré I, Chassé JF, Guerassimenko O, Lesaulnier M, Bellet H, Zittoun J, Kamoun P, Cohen D (1997) Methylenetetrahydrofolate reductase thermolabile variant and human longevity. *Am J Hum Genet* 60: 999-1001
- Flatz G, Sukthomya C (1970) Fronto-ethmoidal encephalomeningoceles in the population of Northern Thailand. *Humangenetik* 11: 1-8
- Fleming A, Gerrelli D, Greene NDE, Copp AJ (1997) Mechanisms of normal and abnormal neurulation: evidence from embryo culture studies. *Int J Dev Biol* 41: 199-212
- Fletcher O, Kessling AM (1998) MTHFR association with arteriosclerotic vascular disease? *Hum Genet* 103: 11-21
- Franco RF, Araújo AG, Guerreiro JF, Elion J, Zago MA (1998) Analysis of the 677C→T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in different ethnic groups. *Thromb Haemost* 79: 119-121
- Franco RF, Morelli V, Lourenco D, Maffei FH, Tavella MH, Piccinato CE, Thomazini IA, Zago MA (1999) A second mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and the risk of venous thrombotic disease. *Br J Haemat* 105: 556-559
- Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJH, den Heijer M, Kluijtmans LAJ, van den Heuvel LP, Rozen R (1995) A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genet* 10: 111-113
- Füchtbauer E-M (1995) Expression of M-Twist during postimplantation development of the mouse. *Dev Dyn* 20: 316-322
- Fürthauer M, Thisse B, Thisse C (1999) Three different *noggin* genes antagonize the activity of bone morphogenetic proteins in the zebrafish embryo. *Dev Biol* 214: 181-196
- Gambara G, Anglani F, D'Angelo A (2000) Association studies of genetic polymorphisms and complex disease. *Lancet* 355: 308-311
- Ganan Y, Macias D, Duterque-Coquillaud M, Ros MA, Hurlé JM (1996) Role of TGFβs and BMPs as signals controlling the position of the digits and the areas of interdigital cell death in the developing chick limb autopod. *Development* 122: 2349-2357
- Giles WH, Kittner SJ, Ou C-Y, Croft JB, Brown V, Buchholz DW, Earley CJ, Feeser BR, Johnson CJ, Macko RF, McCarter RJ, Price TR, Sloan MA, Stern BJ, Wityk RJ, Wozniak MA, Stolley PD (1998) Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism (C677T) and total homocysteine concentration among African American and White women. *Ethnicity Dis* 8: 149-157
- Girelli D, Friso S, Trabetti E, Olivieri O, Russo C, Pessotto R, Faccini G, Pignatti PF, Mazzucco A, Corrocher R (1998) Methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation, plasma homocysteine, and folate in subjects from Northern Italy with and without angiographically documented severe coronary atherosclerotic disease: evidence for an important genetic-environmental interaction. *Blood* 91: 4158-4163
- Gitelman I (1997) Twist protein in mouse embryogenesis. *Dev Biol* 189: 205-214
- Glavac D, Dean M (1993) Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. *Hum Mut* 2: 404-414
- Golden JA, Chernoff GF (1993) Intermittent pattern of neural tube closure in two strains of mice. *Teratology* 47: 73-80
- Golden JA, Chernoff GF (1995) Multiple sites of anterior neural tube closure in humans: evidence from anterior neural tube defects (anencephaly). *Pediatrics* 95: 506-510

- Gong Y, Krakow D, Marcelino J, Wilkin D, Chitayat D, Babul-Hirji R, Hudgins L, Cremers CW, Cremers FPM, Brunner HG, Reinker K, Rimoin DL, Cohn DH, Goodman FR, Reardon W, Patton M, Francomano CA, Warman ML (1999) Heterozygous mutations in the gene encoding noggin affect human joint morphogenesis. *Nature Genet* 21: 302-304
- Goodrich LV, Milenkovic L, Higgins KM, Scott MP (1997) Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science* 277: 1109-1113
- Gordon DF, Wagner J, Atkinson BL, Chiono M, Berry R, Sikela J, Gutierrez-Hartmann A (1996) Human Cart-1: Structural organization, chromosomal localization, and functional analysis of cartilage-specific homeodomain cDNA. *DNA & Cell Biol* 15: 531-541
- Gottlieb S, Emanuel BS, Driscoll DA, Sellinger B, Wang Z, Roe B, Budarf ML (1997) The DiGeorge syndrome minimal critical region contains a Goosecoid-like (GSCL) homeobox gene that is expressed early in human development. *Am J Hum Genet* 60: 1194-1201
- Goulding MD, Chalepakis G, Deutsch U, Erselius JR, Gruss P (1991) Pax-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis. *EMBO J* 10: 1135-1147
- Gowen LC, Johnson BL, Latour AM, Sulik KK, Koller BH (1996) Brca1 deficiency results in early embryonic lethality characterized by neuroepithelial abnormalities. *Nature Genet* 12: 191-194
- Goyette P, Sumner JS, Milos R, Duncan AMV, Rosenblatt DS, Matthews RG, Rozen R (1994) Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nature Genet* 7: 195-200
- Goyette P, Frosst P, Rosenblatt DS, Rozen R (1995) Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenotype correlations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Am J Hum Genet* 56: 1052-1059
- Goyette P, Christensen B, Rosenblatt DS, Rozen R (1996) Severe and mild mutations in *cis* for the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene, and description of five novel mutations in MTHFR. *Am J Hum Genet* 59: 1268-1275
- Goyette P, Pai A, Milos R, Frosst P, Tran P, Chen Z, Chan M, Rozen R (1998) Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mamm Genome* 9: 652-656
- Graham A, Francis-West P, Brickell P, Lumsden A (1994) The signalling molecule BMP4 mediates apoptosis in the rhombencephalic neural crest. *Nature* 372: 684-686
- Graham IM, Daly LE, Refsum HM, Robinson K, Brattstrom LE, Ueland PM, Palma-Reis RJ, Boers GH, Sheahan RG, Israelsson B, Uiterwaaal CS, Meleady R, McMaster D, Verhoef P, Witteman J, Rubba P, Bellet H, Wautrecht JC, de Valk HW, Sales Luis AC, Parrot-Rouland FM, Tan KS, Higgins I, Garcon D, Andria G, et al. (1997) Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project. *Journal of American Medical Association* 277: 1775-1781
- Gregg J, Bando JM, Crandall BF, Grody WW (1998) Frequencies of two common polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene in four different ethnic American populations. *Am J Hum Genet* 63: 1220
- Gripp KW, Zackai EH, Stolle CA (2000) Mutations in the human *TWIST* gene. *Hum Mut* 15: 150-155
- Grompe M (1993) The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nature Genet* 5: 111-117
- Gudnason V, Stansbie D, Scott J, Bowron A, Nicaud V, Humphries S, group E (1998) C677T (thermolabile alanine/valine) polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): its frequency and impact on plasma homocysteine concentration in different European populations. *Atherosclerosis* 136: 347-354
- Günther T, Struwe M, Aguzzi A, Schughart K (1994) *open brain*, a new mouse mutant with severe neural tube defects shows altered gene expression patterns in the developing spinal cord. *Development* 120: 3119-3130

- Hacia JG (1999) Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays. *Nature Genet* 21: 42-47
- Hall JG, Friedman JM, Kenna BA, Popkin J, Jawanda M, Arnold W (1988) Clinical, genetic, and epidemiological factors in neural tube defects. *Am J Hum Genet* 43: 827-837
- Hall JG, Solehdin F (1998a) Genetics of neural tube defects. *Mental Retard Dev Disabil Res Rev* 4: 269-281
- Hall J, Solehdin F (1998b) Folic acid for the prevention of congenital anomalies. *Eur J Pediatr* 157: 445-450
- Harmon DL, Woodside JV, Yarnell JWG, McMaster D, Young IS, McCrum EE, Gey KF, Whitehead AS, Evans AE (1996) The common 'thermolabile' variant of methylene tetrahydrofolate reductase is a major determinant of mild hyperhomocysteinaemia. *Q J Med* 89: 571-577
- Harris MJ, Juriloff DM (1997) Genetic landmarks for defects in mouse neural tube closure. *Teratology* 56: 177-187
- Harris MJ, Juriloff DM (1999) Toward understanding mechanisms of genetic neural tube defects in mice. *Teratology* 60: 292-305
- Harrison SC (1991) A structural taxonomy of DNA-binding domains. *Nature* 353: 715-719
- Heid MK, Bills ND, Hinrichs SH, Clifford AJ (1992) Folate deficiency alone does not produce neural tube defects in mice. *J Nutr* 122: 888-894
- Heil SG, van der Put NMJ, Trijbels FJM, Gabreels FJM, Blom HJ (1999) Molecular genetic analysis of human folate receptors in neural tube defects. *Eur J Hum Genet* 7: 393-396
- Helwig U, Imai K, Schmahl W, Thomas BE, Varnum DS, Nadeau JH, Balling R (1995) Interaction between *undulated* and *Patch* leads to an extreme form of spina bifida in double-mutant mice. *Nature Genet* 11: 60-63
- Henke W, Herdel K, Jung K, Schnorr D, Loening SA (1997) Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucl Acids Res* 25: 3957-3958
- Hibbard ED, Smithells RW (1965) Folic acid metabolism and human embryopathy. *Lancet* i: 1254
- Hill RE, Jones PF, Rees AR, Sime CM, Justice MJ, Copeland NG, Jenkins NA, Graham E, Davidson DR (1989) A new family of mouse homeo box-containing genes: molecular structure, chromosomal location, and developmental expression of Hox-7.1. *Genes & Develop* 3: 26-37
- Hol FA, Hamel BCJ, Geurds MPA, Mullaart RA, Barr FG, Macina RA, Mariman ECM (1995) A frameshift mutation in the gene for PAX3 in a girl with spina bifida and mild signs of Waardenburg syndrome. *J Med Genet* 32: 52-56
- Hol FA, Geurds MPA, Chatkupt S, Shugart YY, Balling R, Schrandt-Stumpel CTRM, Johnson WG, Hamel BCJ, Mariman ECM (1996) PAX genes and human neural tube defects: an amino acid substitution in PAX1 in a patient with spina bifida. *J Med Genet* 33: 655-660
- Hol FA, van der Put NMJ, Geurds MPA, Heil SG, Trijbels FJM, Hamel BCJ, Mariman ECM, Blom HJ (1998) Molecular genetic analysis of the gene encoding the trifunctional enzyme MTHFD (methylenetetrahydrofolate-dehydrogenase, methenyltetrahydrofolate-cyclohydrolase, formyltetrahydrofolate synthetase) in patients with neural tube defects. *Clin Genet* 53: 119-125
- Hongyo T, Buzard GS, Calvert RJ, Weghorst CM (1993) "Cold SSCP": a simple, rapid and non-radioactive method for optimized single-strand conformation polymorphism analyses. *Nucl Acids Res* 2: 3637-3642
- Hopwood ND, Pluck A, Gurdon JB (1989) A *Xenopus* mRNA related to *Drosophila twist* is expressed in response to induction in the mesoderm and the neural crest. *Cell* 59: 893-90
- Howard TD, Paznekas WA, Green ED, Chiang LC, Ma N, Ortiz de Luna RI, Garcia Delgado C, Gonzalez-Ramos M, Kline AD, Jabs EW (1997) Mutations in *TWIST*, a basic helix-loop-helix transcription factor, in Saethre-Chotzen syndrome. *Nature Genet* 15: 36-41
- Isaac A, Sargent MG, Cooke J (1997) Control of vertebrate left-right asymmetry by a snail-related zinc finger gene. *Science* 275: 1301-1304

- Jabs EW, Müller U, Li X, Ma L, Luo W, Haworth IS, Klisak I, Sparkes R, Warman ML, Mulliken JB, Snead ML, Maxson R (1993) A mutation in the homeodomain of the human *MSX2* gene in a family affected with autosomal dominant craniosynostosis. *Cell* 75: 443-450
- Jacques PF, Bostrom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, Selhub J, Rozen R (1996) Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 93: 7-9
- Jiang R, Norton CR, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Gridley T (1998a) Genomic organization, expression and chromosomal localization of the mouse *Slug* (*Slugh*) gene1. *Biochim Biophys Acta* 1443: 251-254
- Jiang R, Lan Y, Norton CR, Sundberg JP, Gridley T (1998b) The *Slug* gene is not essential for mesoderm or neural crest development in mice. *Dev Biol* 198: 277-285
- Juriloff DM, Harris MJ, Tom C, MacDonald KB (1991) Normal mouse strains differ in the site of initiation of closure of the cranial neural tube. *Teratology* 44: 225-233
- Juriloff DM, Harris MJ (2000) Mouse models for neural tube closure. *Hum Mol Genet* 9: 993-1000
- Kajiwara K, Berson EL, Dryja TP (1994) Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and ROM1 loci. *Science* 264: 1604-1608
- Kalff-Suske M, Wild A, Topp J, Wessling M, Jacobsen E-M, Bornholdt D, Engel H, Heuer H, Aalfs CM, Ausems MGEM, Barone R, Herzog A, Heutink P, Homfray T, Gillessen-Kaesbach G, König R, Kunz J, Meinecke P, Müller D, Rizzo R, Streng S, Superti-Furga A, Grzeschik K-H (1999) Point mutations throughout the *GLI3* gene cause Greig cephalopolysyndactyly syndrome. *Hum Mol Genet* 8: 1769-1777
- Kang S-S, Zhou J, Wong PWK, Kowalisyn J, Strokosch G (1988) Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet* 43: 414-421
- Kang S-S, Wong PWK, Susmano A, Sora J, Norusis M, Ruggie N (1991) Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease. *Am J Hum Genet* 48: 536-545
- Kaplan NL, Martin ER, Weir BS (1997) Power studies for the transmission/disequilibrium tests with multiple alleles. *Am J Hum Genet* 60: 691-702
- Kelly OG, Melton DA (1995) Induction and patterning of the vertebrate nervous system. *Trends Genet* 11: 273-278
- Kirke PN, Molloy AM, Daly LE, Burke H, Weir DG, Scott JM (1993) Maternal plasma folate and vitamin B₁₂ are independent risk factors for neural tube defects. *Q J Med* 86: 703-708
- Kirke PN, Daly LE, Molloy A, Weir DG, Scott JM (1996) Maternal folate status and risk of neural tube defects. *Lancet* 348: 67-68
- Kluijtmans LAJ, van den Heuvel LPWJ, Boers GHJ, Frosst P, Stevens EMB, van Oost BA, den Heijer M, Trijbels FJM, Rozen R, Blom HJ (1996) Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease. *Am J Hum Genet* 58: 35-41
- Kluijtmans LAJ, Wendel U, Stevens EMB, van den Heuvel LPWJ, Trijbels FJM, Blom HJ (1998) Identification of four novel mutations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Eur J Hum Genet* 6: 257-265
- Koch M, Fuhrmann W (1984) Epidemiology of neural tube defects in Germany. *Hum Genet* 68: 97-103
- Koch M, Fuhrmann W (1985) Sibs of probands with neural tube defects - a study in the Federal Republic of Germany. *Hum Genet* 70: 74-79
- Koch MC, Steinmeyer K, Lorenz C, Ricker K, Wolf F, Otto M, Zoll B, Lehmann-Horn F, Grzeschik K-H, Jentsch TJ (1992) The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. *Science* 257: 797-800
- Koch MC, Stegmann K, Ziegler A, Schröter B, Ermert A (1998) Evaluation of the MTHFR C677T allele and the MTHFR gene locus in a German spina bifida population. *Eur J Pediatr* 157: 487-492

- Kohlhase J, Wischermann A, Reichenbach H, Froster U, Engel W (1998) Mutations in the SALL1 putative transcription factor gene cause Townes-Brocks syndrome. *Nature Genet* 18: 81-83
- Krawczak M, Reiss J, Cooper DN (1992) The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet* 90: 41-54
- Kreitman M, Comeron JM (1999) Coding sequence evolution. *Curr Op Genet Dev* 9: 637-641
- LaBonne C, Bronner-Fraser M (1998) Neural crest induction in *Xenopus*: evidence for a two-signal model. *Development* 125: 2403-2414
- Lander ES, Schork NJ (1994) Genetic dissection of complex traits. *Science* 265: 2037-2048
- Larsen WJ (1997) *Human embryology*. Churchill Livingstone Inc., New York
- Laurence KM, James N, Miller M, Campbell H (1980) Increased risk of recurrence of pregnancies complicated by fetal neural tube defects in mothers receiving poor diets, and possible benefit of dietary counselling. *Br Med J* 281: 1592-1594
- Letts VA, Schork NJ, Copp AJ, Bernfield M, Frankel WN (1995) A curly-tail modifier locus, *mct1*, on mouse chromosome 17. *Genomics* 29: 719-724
- Liem KF, Tremmi G, Roelink H, Jessell TM (1995) Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell* 82: 969-979
- Liem KF, Tremml G, Jessell TM (1997) A role for the roof plate and its resident TGF β -related proteins in neuronal patterning in the dorsal spinal cord. *Cell* 91: 127-138
- Lindhout D, Schmidt D (1986) In utero exposure to valproate and neural tube defects. *Lancet* 1: 1392-1393
- Liu YH, Kundu R, Wu L, Luo W, Ignelzi MA, Snead ML, Maxson RE (1995) Premature suture closure and ectopic cranial bone in mice expressing *Msx2* transgenes in the developing skull. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 6137-6141
- Liu Y-H, Tang Z, Kundu RK, Wu L, Luo W, Zhu D, Sangiorgi F, Snead ML, Maxson RE (1999) *Msx2* gene dosage influences the number of proliferative osteogenic cells in growth centers of the developing murine skull: A possible mechanism for *MSX2*-mediated craniosynostosis in humans. *Dev Biol* 205: 260-274
- Lucock MD, Daskalakis IG, Wild J, Anderson A, Schorah CJ, Lean MEJ, Levene MI (1996) The influence of dietary folate and methionine on the metabolic disposition of endotoxic homocysteine. *Biochem Mol Med* 59: 104-111
- Ma L, Golden S, Wu L, Maxson R (1996) The molecular basis of Boston-type craniosynostosis: The Pro148 \rightarrow His mutation in the N-terminal arm of the *MSX2* homeodomain stabilizes DNA binding without altering nucleotide sequence preferences. *Hum Mol Genet* 5: 1915-1920
- Ma J, Stampfer MJ, Giovannucci E, Artigas C, Hunter DJ, Fuchs C, Willett WC, Selhub J, Hennekens CH, Rozen R (1997) Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism, dietary interactions, and risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 57: 1098-1102
- Maden M, Graham A, Gale E, Rollinson C, Zile M (1997) Positional apoptosis during vertebrate CNS development in the absence of endogenous retinoids. *Development* 124: 2799-2805
- Marazzi G, Wang Y, Sassoon D (1997) *Msx2* is a transcriptional regulator in the BMP4-mediated programmed cell death pathway. *Dev Biol* 186: 127-138
- Martínez-Frias M-L, Urioste M, Bermejo E, Sanchis A, Rodríguez-Pinilla E (1996) Epidemiological analysis of multi-site closure failure of neural tube in humans. *Am J Med Genet* 66: 64-68
- Matsushita S, Muramatsu T, Arai H, Matsui T, Higuchi S (1997) The frequency of the methylenetetrahydrofolate reductase-gene mutation varies with age in the normal population. *Am J Hum Genet* 61: 1459-1460
- Mayor R, Morgan R, Sargent MG (1995) Induction of the prospective neural crest of *Xenopus*. *Development* 121: 767-777
- McAndrew PE, Brandt JT, Pearl DK, Prior TW (1996) The incidence of the gene for thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in African Americans. *Thromb Res* 83: 195-198

- McMahon JA, Takada S, Zimmerman LB, Fan C-M, Harland RM, McMahon AP (1998) Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. *Genes & Development* 12: 1438-1452
- McPherson MJ, Quirke P, Taylor GR (1991) PCR - A practical approach. Oxford University Press, New York
- Melvin EC, Viles KD, Mackey JF, Lucas A, Franklin A, Albright S, Aylsworth A, Worley G, Brei T, Buran C, Vance JM, Pericak-Vance MA, George TM, Speer MC, NTD Collaborative Group (1997) Investigations of candidate genes for neural tube defects implicated from mouse models. *Am J Hum Genet* 61 (Suppl): 1666
- Miller SA, Dykes DD, Poesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acids Res* 16: 1215
- Mills JL, Tuomilehto J, Yu KF, Colman N, Blaner WS, Koskela P, Rundle WE, Forman M, Toivanen L, Rhoads GG (1992) Maternal vitamin levels during pregnancies producing infants with neural tube defects. *J Pediatr* 120: 863-871
- Mills JL, McPartlin JM, Kirke PN, Lee YJ, Conley MR, Weir DG, Scott JM (1995) Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural-tube defects. *Lancet* 345: 149-151
- Mills JL, Scott JM, Kirke PN, McPartlin JM, Conley MR, Weir DG, Molloy AM, Lee YJ (1996) Homocysteine and neural tube defects. *J Nutr* 126: 756S-760S
- Milunsky A, Ulcickas M, Rothman KJ, Willett W, Jick SS, Jick H (1992) Maternal heat exposure and neural tube defects. *Journal of American Medical Association* 268: 882-885
- Miner SES, Evrovski J, Cole DEC (1997) Clinical chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism: an update. *Clin Biochem* 30: 189-201
- Molloy AM, Kirke P, Hillary I, Weir DG, Scott JM (1985) Maternal serum folate and vitamin B₁₂ concentrations in pregnancies associated with neural tube defects. *Arch Dis Child* 60: 660-665
- Molloy AM, Daly S, Mills JL, Kirke PN, Whitehead AS, Ramsbottom D, Conley MR, Weir DG, Scott JM (1997) Thermolabile variant of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase associated with low red-cell folates: implications for folate intake recommendations. *Lancet* 349: 1591-1593
- Molloy AM, Mills JL, Kirke PN, Ramsbottom D, McPartlin JM, Burke H, Conley M, Whitehead AS, Weir DG, Scott JM (1998) Low blood folates in NTD pregnancies are only partly explained by thermolabile 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase: Low folate status alone may be the critical factor. *Am J Med Genet* 78: 155-159
- Monaghan AP, Davidson DR, Sime C, Graham E, Baldock R, Bhattacharya SS, Hill RE (1991) The Msh-like homeobox genes define domains in the developing vertebrate eye. *Development* 112: 1053-1061
- Moore KL, Persaud TVN (1996) Embryologie. Schattauer, Stuttgart
- Morita H, Taguchi J, Kurihara H, Kitaoka M, Kaneda H, Kurihara Y, Maemura K, Shindo T, Minamino T, Ohno M, Yamaoki K, Ogasawara K, Aizawa T, Suzuki S, Yazaki Y (1997) Genetic polymorphism of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) as a risk factor for coronary artery disease. *Circulation* 95: 2032-2036
- Mornet E, Muller F, Lenois -Furet A, Delezoide A-L, Col J-Y, Simon-Bouy B, Serre J-L (1997) Screening of the C677T mutation on the methylenetetrahydrofolate reductase gene in French patients with neural tube defects. *Hum Genet* 100: 512-514
- Morrison K, Papapetrou C, Hol FA, Mariman ECM, Lynch SA, Burn J, Edwards YH (1998) Susceptibility to spina bifida; an association study of five candidate genes. *Ann Hum Genet* 62: 379-396
- Moser M, Pscherer A, Bauer R, Imhof A, Seegers S, Kerscher M, Buettner R (1993) The complete murine cDNA sequence of the transcription factor AP-2. *Nucl Acids Res* 21: 4844
- Moser M, Pscherer A, Roth C, Becker J, M cher G, Zerres K, Dixkens C, Weis J, Guay-Woodford L, Buettner R, F ssler R (1997) Enhanced apoptotic cell death of renal epithelial cells in mice lacking transcription factor AP-2 . *Genes & Develop* 11: 1938-1948

- Motulsky AG (1996) Nutritional ecogenetics: homocysteine-related arteriosclerotic vascular disease, neural tube defects, and folic acid. *Am J Hum Genet* 58: 17-20
- MRC Vitamin Study Research Group (1991) Prevention of neural tube defects: Results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* 338: 131-137
- Mullis KB, Faloona FA (1985) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Science* 230: 335-350
- Mutchinick OM, López MA, Luna L, Waxman J, Babinsky VE, RYVEMCE Collaborative Group (1999) High prevalence of the thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase variant in Mexico: a country with a very high prevalence of neural tube defects. *Mol Genet Metab* 68: 461-467
- Myers RM, Maniatis T, Lerman LS (1987) Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Meth Enzymol* 155: 501-527
- Neumann PE, Frankel WN, Letts VA, Coffin JM, Copp AJ, Bernfield M (1994) Multifactorial inheritance of neural tube defects: localization of the major gene and recognition of modifiers in *ct* mutant mice. *Nature Genet* 6: 357-362
- Newton CR, Kalsheker N, Graham A, Powell SJ, Gammack A, Riley J, Markham AF (1988) Diagnosis of α 1-antitrypsin deficiency by enzymatic amplification of human genomic DNA and direct sequencing of polymerase chain reaction products. *Nucl Acids Res* 16: 8233-8243
- Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF (1989) Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucl Acids Res* 17: 2503-2516
- Nieto MA, Sargent MG, Wilkinson DG, Cooke J (1994) Control of cell behavior during vertebrate development by *Slug*, a zinc finger gene. *Science* 264: 835-839
- Nottoli T, Hagopian-Donaldson S, Zhang J, Perkins A, Williams T (1998) AP-2-null cells disrupt morphogenesis of the eye, face, and limbs in chimeric mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 13714-13719
- Nye JS, Balkin N, Lucas H, Knepper PA, McLone DG, Charrow J (1998) Myelomeningocele and Waardenburg syndrome (type 3) in patients with interstitial deletions of 2q35 and the PAX3 gene. *Am J Med Genet* 75: 401-408
- Nygard O, Refsum H, Ueland PM, Stensvold I, Nordrehaug JE, Kvale G, Vollset SE (1997) Coffee consumption and plasma total homocysteine: The Hordaland homocysteine study. *Am J Clin Nutr* 65: 136-143
- Oostra R-J, Baljet B, Hennekam RCM (1998) Congenital anomalies in the teratological collection of museum Vrolik in Amsterdam, The Netherlands. IV: Closure defects of the neural tube. *Am J Med Genet* 80: 60-73
- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2766-2770
- Ou CY, Stevenson RE, Brown VK, Schwartz CE, Allen WP, Khoury MJ, Rozen R, Oakley GP, Adams MJ (1996) 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphism as a risk factor for neural tube defects. *Am J Med Genet* 63: 610-614
- Pepe G, Vanegas OC, Giusti B, Brunelli T, Marcucci R, Attanasio M, Rickards O, De Stefano GF, Prisco D, Gensini GF, Abbate R (1998) Heterogeneity in world distribution of the thermolabile C677T mutation in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet* 63: 917-920
- Piccolo S, Sasai Y, Lu B, De Robertis EM (1996) Dorsoventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell* 86: 589-598
- Piedrahita JA, Oetama B, Bennett GD, van Waes J, Kamen BA, Richardson J, Lacey SW, Anderson RGW, Finnell RH (1999) Mice lacking the folic acid-binding protein Folbp1 are defective in early embryonic development. *Nature Genet* 23: 228-232

- Pizette S, Niswander L (1999) BMPs negatively regulate structure and function of the limb apical ectodermal ridge. *Development* 126: 883-894
- Prosser J (1993) Detecting single-base mutations. *Trends Biotechnol* 11: 238-246
- Quaderi NA, Schweiger S, Gaudenz K, Franco B, Rugarli EI, Berger W, Feldman GJ, Volta M, Andolfi G, Gilgenkrantz S, Marion RW, Hennekam RCM, Opitz JM, Muenke M, Ropers HH, Ballabio A (1997) Opitz G/BBB syndrome, a defect of midline development, is due to mutations in a new RING finger gene on Xp22. *Nature Genet* 17: 285-291
- Queißer-Luft A, Wolf HG, Schlaefter K, von Kries R (1996) Häufigkeiten von Neuralrohrdefekten in Deutschland. *Monatsschr Kinderheilkd* 144: 136-140
- Rady PL, Tying SK, Hudnall SD, Vargas T, Kellner LH, Nitowsky H, Matalon RK (1999) Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): the incidence of mutations C677T and A1298C in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Med Genet* 86: 380-384
- Ramsbottom D, Scott JM, Molloy A, Weir DG, Kirke PN, Mills JL, Gallagher PM, Whitehead AS (1997) Are common mutations of cystathionine β -synthase involved in the aetiology of neural tube defects? *Clin Genet* 51: 39-42
- Richter B, Stegmann K, Röper B, Böddeker I, Ngo ETKM, Koch MC (2000) Cystathionine β -synthase (CBS) and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene-gene interaction evaluated in susceptibility to neural tube defects. *Clin Genet* (submitted)
- Risch N, Merikangas K (1996) The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 273: 1516-1517
- Rizzari C, Valsecchi MG, Conter V (1997) MTHFR 677C \rightarrow T mutation and neural-tube defects. *Lancet* 350: 1479-1480
- Roberts HE, Moore CA, Cragan JD, Fernhoff PM, Khoury MJ (1995) Impact of prenatal diagnosis on the birth prevalence of neural tube defects, Atlanta, 1990-1991. *Pediatrics* 96: 880-883
- Roberts RJ (1983) Restriction and modification enzymes and their recognition sequences. *Nucl Acids Res* 11: 135-167
- Rosenquist TH, Ratashak SA, Selhub J (1996) Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube: Effect of folic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 15227-15232
- Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-de Groot AC, Sariola H, Friedman R, Boivin GP, Cardell EL, Doetschman T (1997) TGF β 2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGF β knockout phenotypes. *Development* 124: 2659-2670
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467
- Sarkar G, Kapelner S, Sommer SS (1990) Formamide can dramatically improve the specificity of PCR. *Nucl Acids Res* 18: 7465
- Satokata I, Ma L, Ohshima H, Bei M, Woo I, Nishizawa K, Maeda T, Takano Y, Uchiyama M, Heaney S, Peters H, Tang Z, Maxson R, Maas R (2000) *Msx2* deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nature Genet* 24: 391-395
- Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ, et al (1993) Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 43: 1467-1472
- Schiltenswolf M, Carstens C (1990) Zur Prävalenz der Spina bifida. *Pädiatrie* 3: 303-309
- Schneider JA, Rees DC, Liu Y-T, Clegg JB (1998) Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *Am J Hum Genet* 62: 1258-1260
- Schoenwolf GC, Smith JL (1990) Mechanisms of neurulation: traditional viewpoint and recent advances. *Development* 109: 243-270
- Schorle H, Meier P, Buchert M, Jaenisch R, Mitchell PJ (1996) Transcription factor AP-2 essential for cranial closure and craniofacial development. *Nature* 381: 235-238

- Sechrist J, Nieto MA, Zamanian RT, Bronner-Fraser M (1995) Regulative response of the cranial neural tube after neural fold ablation: spatiotemporal nature of neural crest regeneration and up-regulation of *Slug*. *Development* 121: 4103-4115
- Sefton M, Sánchez S, Nieto MA (1998) Conserved and divergent roles for members of the *Snail* family of transcription factors in the chick and mouse embryo. *Development* 125: 3111-3121
- Sela-Donenfeld D, Kalcheim C (1999) Regulation of the onset of neural crest migration by coordinated activity of BMP4 and Noggin in the dorsal neural tube. *Development* 126: 4749-4762
- Seller MJ (1990) Neural tube defects: are neurulation and canalization forms causally distinct? *Am J Med Genet* 35: 394-396
- Seller MJ (1995a) Sex, neural tube defects, and multisite closure of the human neural tube. *Am J Med Genet* 58: 332-336
- Seller MJ (1995b) Multi-site neural tube closure in humans and maternal folate supplementation. *Am J Med Genet* 58: 222-224
- Semina EV, Reiter R, Leysens NJ, Alward WLM, Small KW, Datson NA, Siegel-Bartelt J, Bierke-Nelson D, Bitoun P, Zabel BU, Carey JC, Murray JC (1996) Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, RIEG, involved in Rieger syndrome. *Nature Genet* 14: 392-399
- Shaw GM, Rozen R, Finnell RH, Wasserman CR, Lammer EJ (1998) Maternal vitamin use, genetic variation of infant methylenetetrahydrofolate reductase, and risk for spina bifida. *Am J Epidemiol* 148: 30-37
- Shaw GM, Todoroff K, Finnell RH, Lammer EJ, Leclerc D, Gravel RA, Rozen R (1999) Infant methionine synthase variants and risk for spina bifida. *J Med Genet* 36: 86-87
- Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM (1993) The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* 16: 325-332
- Shen H, Wilke T, Ashique AM, Narvey M, Zerucha T, Savino E, Williams T, Richman JM (1997) Chicken transcription factor AP-2: Cloning, expression and its role in outgrowth of facial prominences and limb buds. *Dev Biol* 188: 248-266
- Shen LX, Babilion JP, Stanton VP (1999) Single-nucleotide polymorphisms can cause different structural folds of mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 7871-7876
- Shields DC, Kirke PN, Mills JL, Ramsbottom D, Molloy AM, Burke H, Weir DG, Scott JM, Whitehead AS (1999) The "thermolabile" variant of methylenetetrahydrofolate reductase and neural tube defects: An evaluation of genetic risk and the relative importance of the genotypes of the embryo and the mother. *Am J Hum Genet* 64: 1045-1055
- Shimeld SM (1999) The evolution of dorsoventral pattern formation in the chordate neural tube. *Am Zool* 39: 641-649
- Shum ASW, Copp AJ (1996) Regional differences in morphogenesis of the neuroepithelium suggest multiple mechanisms of spinal neurulation in the mouse. *Anat Embryol* 194: 65-73
- Simpson P (1983) Maternal-zygotic gene interactions during formation of the dorsoventral pattern in *Drosophila* embryos. *Genetics* 105: 615-632
- Smith JL, Schoenwolf GC (1997) Neurulation: coming to closure. *Trends Neurosci* 20: 510-517
- Smith WC, Harland RM (1992) Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. *Cell* 70: 829-840
- Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ (1976) Vitamin deficiencies and neural tube defects. *Arch Dis Child* 51: 944-950
- Soriano P (1997) The PDGF α receptor is required for neural crest cell development and for normal patterning of the somites. *Development* 124: 2691-2700
- Speer MC, Worley G, Mackey JF, Melvin E, Oakes WJ, George TM, Group NC (1997) The thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) is not a major risk factor for neural tube defect in American Caucasians. *Neurogenetics* 1: 149-150

- Speer M, Nye J, McLone D, Worley G, Melvin EC, Viles KD, Franklin A, Drake C, Mackey J, George TM, Group NC (1999) Possible interaction of genotypes at cystathionine β -synthase and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) in neural tube defects. *Clin Genet* 56: 142-144
- Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ (1993) Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet* 52: 506-516
- Stegers-Theunissen RPM, Boers GHJ, Trijbels FJM, Eskes TKAB (1991) Neural-tube defects and derangement of homocysteine metabolism. *N Engl J Med* 324: 199-200
- Stegers-Theunissen RPM, Boers GHJ, Trijbels FJM, Finkelstein JD, Blom HJ, Thomas CMG, Borm GF, Wouters GAJ, Eskes TKAB (1994) Maternal hyperhomocysteinemia: a risk factor for neural-tube defects? *Metabolism* 43: 1475-1480
- Stegmann K, Ziegler A, Ngo ETKM, Kohlschmidt N, Schröter B, Ermert A, Koch MC (1999a) Linkage disequilibrium of MTHFR genotypes 677CT/1298AC in the German population and association studies in probands with neural tube defects (NTD). *Am J Med Genet* 87: 23-29
- Stegmann K, Boecker J, Kosan C, Ermert A, Kunz J, Koch M (1999b) Human transcription factor *SLUG*: Mutation analysis in patients with neural tube defects (NTD) and identification of a missense mutation (D119E) in the *Slug* subfamily-defining region. *Mut Res Genomics* 406: 63-69
- Stevenson R, Schwartz C, Du Y-Z, Adams MJ (1997) Differences in methylenetetrahydrofolate reductase genotype frequencies, between Whites and Blacks. *Am J Hum Genet* 60: 229-230
- Stoll C, EUROCAT Working Group (1995) Distribution of single organ malformations in European populations. *Ann Génét* 38: 32-43
- Strachan T, Read AP (1999) *Human Molecular Genetics*, 2nd edn. John Wiley & Sons, New York
- Stumpo DJ, Eddy RL, Haley LL, Sait S, Shows TB, Lai WS, Young WS, Speer MC, Dehejia A, Polymeropoulos M, Blackshear PJ (1998) Promoter sequence, expression, and fine chromosomal mapping of the human gene (MLP) encoding the MARCKS-like protein: Identification of neighboring and linked polymorphic loci for MLP and MACS and use in the evaluation of human neural tube defects. *Genomics* 49: 253-264
- Su MW, Suzuki HR, Solursh M, Ramirez F (1991) Progressively restricted expression of a new homeobox-containing gene during *Xenopus laevis* embryogenesis. *Development* 111: 1179-1187
- Takahashi Y, Le Douarin N (1990) cDNA cloning of a quail homeobox gene and its expression in neural crest-derived mesenchyme and lateral plate mesoderm. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 7482-7486
- Takahashi Y, Monsoro-Burq A-H, Bontoux M, Le Douarin NM (1992) A role for *Quox-8* in the establishment of the dorsoventral pattern during vertebrate development. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 10237-10241
- Tanabe Y, Jessell TM (1996) Diversity and pattern in the developing spinal cord. *Science* 274: 1115-1123
- Tassabehji M, Read AP, Newton VE, Harris R, Balling R, Gruss P, Trachan T (1992) Waardenburg's syndrome patients have mutations in the human homologue of the Pax-3 paired box gene. *Nature* 355: 635-636
- Tassabehji M, Newton VE, Read AP (1994) Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (MITF) gene. *Nature Genet* 8: 251-255
- Terwilliger J, Ott J (1994) *Handbook for human genetic linkage*. Johns Hopkins University Press, Baltimore
- Todesco L, Angst C, Litynski P, Loehrer F, Fowler B, Haefeli WE (1999) Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, plasma homocysteine and age. *Eur J Clin Invest* 29: 1003-1009

- Trembath D, Sherbondy AL, Vandyke DC, Shaw GM, Todoroff K, Lammer EJ, Finnell RH, Marker S, Lerner G, Murray JC (1999) Analysis of select folate pathway genes, *PAX3*, and human *T* in a midwestern neural tube defect population. *Teratology* 59: 331-341
- Valenzuela DM, Economides AN, Rojas E, Lamb TM, Nunez L, Jones P, Ip NV, Ill RE, Brannan CI, Gilbert DJ, Copeland NG, Jenkins NA, Le Beau MM, Harland RM, Yancopoulos GD (1995) Identification of mammalian *Noggin* and its expression in the adult nervous system. *J Neurosci* 15: 6077-6084
- Van Allen MI, Kalousek DK, Chernoff GF, Juriloff D, Harris M, McGillivray BC, Yong SL, Langlois S, MacLeod PM, Chitayat D, Friedman JM, Wilson RD, McFadden D, Pantzar J, Ritchie S, Hall JG (1993) Evidence for multi-site closure of the neural tube in humans. *Am J Med Genet* 47: 723-743
- van den Boogaard M-JH, Dorland M, Beemer FA, Ploos van Amstel HK (2000) *MSX1* mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans. *Nature Genet* 24: 342-343
- van der Put NMJ, Steegers-Theunissen RPM, Frosst P, Trijbels FJM, Eskes TKAB, van den Heuvel LP, Mariman ECM, den Heyer M, Rozen R, Blom HJ (1995) Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet* 346: 1070-1071
- van der Put NMJ, van den Heuvel LP, Steegers-Theunissen RPM, Trijbels FJM, Eskes TKAB, Mariman ECM, den Heyer M, Blom HJ (1996) Decreased methylenetetrahydrofolate reductase activity due to the 677C→T mutation in families with spina bifida offspring. *J Mol Med* 74: 691-694
- van der Put NMJ, Thomas CMG, Eskes TKAB, Trijbels FJM, Steegers-Theunissen RPM, Mariman ECM, de Graaf-Hess A, Smeitink JAM, Blom HJ (1997a) Altered folate and vitamin B₁₂ metabolism in families with spina bifida offspring. *Q J Med* 90: 505-510
- van der Put NMJ, van der Molen EF, Kluijtmans LAJ, Heil SG, Trijbels JMF, Eskes TKAB, van Oppenraaij-Emmerzaal D, Banerjee R, Blom HJ (1997b) Sequence analysis of the coding region of human methionine synthase: relevance to hyperhomocysteinaemia in neural-tube defects and vascular disease. *Q J Med* 90: 511-517
- van der Put NMJ, Gabreels F, Stevens EMB, Smeitink JAM, Trijbels FJM, Eskes TKAB, van den Heuvel LP, Blom HJ (1998) A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: An additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* 62: 1044-1051
- Vargas F, Roessler E, Whitehead S, Hooper G, Stevenson RE, Cordeiro I, Correia P, Schwartz I, Antonarakis S, Strachan T, Gereige R, Belloni E, Scherer S, Tsui LC, Muenke M (1997) Exclusion of the human *Sonic hedgehog* coding and promoter regions as a candidate gene for sacral agenesis, familial neural tube defects, triphalangeal thumb and mirror polydactyly. *Am J Hum Genet* 61 (Suppl): 2413
- Vastardis H, Karimbux N, Guthua SW, Seidman JG, Seidman CE (1996) A human *MSX1* homeodomain missense mutation causes evidence tooth agenesis. *Nature Genet* 13: 417-421
- Viel A, Dall'Agnese L, Simone F, Canzonieri V, Capozzi E, Visentin MC, Valle R, Boiocchi M (1997) Loss of heterozygosity at the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase locus in human ovarian carcinomas. *Br J Cancer* 75: 1105-1110
- Vortkamp A, Gessler M, Grzeschik K-H (1991) *GLI3* zinc-finger gene interrupted by translocations in Greig syndrome families. *Nature* 352: 539-540
- Wakefield MJ, Graves JAM (1996) Comparative maps of vertebrates. *Mamm Genome* 7: 715-716
- Wang SM, Coljee VW, Pignolo RJ, Rotenberg MO, Cristofalo VJ, Sierra F (1997) Cloning of the human *twist* gene: Its expression is retained in adult mesodermally-derived tissues. *Gene* 187: 83-92
- Weil M, Jacobson MD, Raff MC (1997) Is programmed cell death required for neural tube closure? *Curr Biol* 7: 281-284
- Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R (1998) A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) associated with decreased enzyme activity. *Molecular Genetic Metabolism* 64: 169-172

- Wenstrom KD, Johanning GL, Owen J, Johnston KE, Acton S, Cliver S, Tamura T (2000a) Amniotic fluid homocysteine levels, 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase genotypes, and neural tube closure sites. *Am J Med Genet* 90: 6-11
- Wenstrom KD, Johanning GL, Owen J, Johnston KE, Acton S, Tamura T (2000b) Role of amniotic fluid homocysteine level and of fetal 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase genotype in the etiology of neural tube defects. *Am J Med Genet* 90: 12-16
- White MB, Carvalho M, Derse D, O'Brien S, Dean M (1992) Detecting single base substitutions as heteroduplex polymorphisms. *Genomics* 12: 301-306
- Wilcken DEL, Wang XL (1996) Relevance to spina bifida of mutated methylenetetrahydrofolate reductase. *Lancet* 347: 340
- Wilgenbus KK, Lichter P (1999) DNA chip technology *ante portas*. *J Mol Med* 77: 761-768
- Wilkie AOM, Tang Z, Elanko N, Walsh S, Twigg SRF, Hurst JA, Wall SA, Chrzanowska KH, Maxson RE (2000) Functional haploinsufficiency of the human homeobox gene *MSX2* causes defects in skull ossification. *Nature Genet* 24: 387-390
- Williams T, Admon A, Luscher B, Tjian R (1988) Cloning and expression of AP-2, a cell-type-specific transcription factor that activates inducible enhancer elements. *Genes & Develop* 2: 1557-1569
- Williams T, Tjian R (1991) Characterization of a dimerization motif in AP-2 and its function in heterologous DNA-binding proteins. *Science* 251: 1067-1071
- Williamson JA, Boshier JM, Skinner A, Sheer D, Williams T, Hurst HC (1996) Chromosomal mapping of the human and mouse homologues of two new members of the AP-2 family of transcription factors. *Genomics* 35: 262-264
- Wilson A, Platt R, Wu Q, Leclerc D, Christensen B, Yang H, Gravel RA, Rozen R (1999) A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B₁₂) increases risk for spina bifida. *Mol Genet Metab* 67: 317-323
- Winning RS, Shea LJ, Marcus SJ, Sargent TD (1991) Developmental regulation of transcription factor AP-2 during *Xenopus laevis* embryogenesis. *Nucl Acids Res* 19: 3709-3714
- Winograd J, Reilly MP, Roe R, Lutz J, Laughner E, Xu X, Hu L, Asakura T, vander Kolk C, Strandberg JD, Semenza GL (1997) Perinatal lethality and multiple craniofacial malformations in *MSX2* transgenic mice. *Hum Mol Genet* 6: 369-379
- Wolf C, Thisse C, Stoetzel C, Thisse B, Gerlinger P, Perrin-Schmitt F (1991) The *M-twist* gene of *Mus* is expressed in subsets of mesodermal cells and is closely related to the *Xenopus X-twi* and the *Drosophila twist* genes. *Dev Biol* 143: 363-373
- Wolpert L, Beddington R, Brockes J, Jessell T, Lawrence P, Meyerowitz E (1999) *Entwicklungsbiologie*. Spektrum Verlag, Heidelberg
- Wynshaw-Boris A (1996) Model mice and human disease. *Nature Genet* 13: 259-260
- Zhang J, Hagopian-Donaldson S, Serbedzija G, Elsemore J, Plehn-Dujowich D, McMahon AP, Flavell RA, Williams T (1996) Neural tube, skeletal and body wall defects in mice lacking transcription factor AP-2. *Nature* 381: 238-241
- Zhao G-Q, Zhou X, Eberspaecher H, Solursh M, de Crombrughe B (1993) Cartilage homeoprotein 1, a homeoprotein selectively expressed in chondrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 8633-8637
- Zhao Q, Behringer RR, de Crombrughe B (1996) Prenatal folic acid treatment suppresses acrania and meroanencephaly in mice mutant for the *Cart1* homeobox gene. *Nature Genet* 13: 275-283
- Zimmerman LB, de Jesús-Escobar JM, Harland RM (1996) The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* 86: 599-606

8 Lebenslauf

Persönliche Daten	Name	Karolin Stegmann
	Anschrift	Umgehungsstr. 21 35043 Marburg
	Geburtsdatum	14.09.1970
	Geburtsort	Hamburg
Schule	1977 – 1981	Grundschule Trenknerweg in Hamburg
	1981 – 1987	Gymnasium Othmarschen in Hamburg
	1987 – 1990	Johann-Rist-Gymnasium in Wedel (Holstein)
		Abschluß: Abitur
Universität	1990 – 1997	Studium der Humanbiologie an der Philipps-Universität Marburg
	Hauptfach:	Pharmakologie
	Nebenfächer:	Biochemie, Immunologie, Humangenetik
	1993 – 1996	zusätzlich Studium der Philosophie Schwerpunkt Wissenschaftstheorie
	Februar 1996	Abschluß als zusätzliches Diplom-Nebenfach
	03/1996 – 03/1997	Diplomarbeit am Medizinischen Zentrum für Humangenetik Thema: „Kandidatengen- und Deletionsanalysen bei Spina bifida“
	März 1997	Abschluß: Diplom
	07/1997 – 06/2000	Promotion

Marburg, den 14. Juni 2000

9 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren die folgenden Damen und Herren:

Barth, Beato, Bieri, Brandt, Elsässer, Fischer, Frenking, Fruhstorfer, Fuhs, Golenhofen, Gromes, Grzeschik, Habermehl, Hartmann D, Hartmann K-U, Heubel, Hobom, Ihm, Janich, Jungclas, Kaffarnik, Kern, Kirchner, Koch, Koolman, Koppelberg, Lauer, Legrum, Löffler, Lührmann, Melsheimer, Müller R, Müller U, Netter, Niessing, Pauen, Petzoldt, Psarros, Reufel, Röhm, Schachtschabel, Schindler, Scholz, Schulz, Sedlacek, Seifart, Seitz, Siegwart, Sommer, Suske, Unsikker, Voigt, von Löw, Waßmuth, Wesemann, Westphal, Zitterbarth

10 Danksagung

Die vorliegende Dissertation habe ich im Medizinischen Zentrum für Humangenetik der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Frau Prof. Dr. M. C. Koch in der Zeit von Juli 1997 bis Juni 2000 angefertigt. Mein Dank gilt allen, die durch ihre freundliche Unterstützung zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben:

- Herrn Prof. Dr. K.-H. Grzeschik dafür, daß er mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit im Medizinischen Zentrum für Humangenetik anzufertigen;
- Frau Prof. Dr. M. C. Koch für die Bereitstellung des interessanten und aktuellen Themas, für die sehr gute Betreuung, die anregenden Diskussionen und die produktive Zusammenarbeit;
- Herrn Dr. Ermert (Mainz), Frau Dr. Strehl (Erlangen), Frau Dr. Piecha-Ngo (Marburg), Frau Dr. Schröter (Mainz), Herrn Dr. Kohlschmidt (Mainz), Herrn Dr. Finnell (Omaha, Nebraska) und Frau Dr. Capra (Genua) für die Aufnahme der Probanden in diese Studie;
- Herrn Dr. Andreas Ziegler und Frau Inke Böddeker vom Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie für statistische Berechnungen;
- den Patienten und ihren Familien für ihre Mitarbeit.

Allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts möchte ich für die sehr angenehme Zusammenarbeit, ihre Hilfe und Unterstützung danken. Besonders dankbar bin ich den Mitgliedern der Arbeitsgruppe:

- Christopher Schwarz für seine stetige technische Unterstützung, ohne die die Masse der Untersuchungen kaum zu bewältigen gewesen wäre;
- Julia Boecker für eine wunderbare Zeit der Teamarbeit sowie für ihre Freundschaft und ihr Engagement über ihre Zeit am Institut hinaus;
- Bärbel Richter für die positiven Überraschungen, ihre fachliche und menschliche Kompetenz und dafür, daß die Weiterführung des Projekts in ihren Händen gut aufgehoben ist;
- Birgit Becker, Britta Röper und Gerti Panzner für ihre freundschaftliche und hilfreiche Mitarbeit;
- Dr. Jutta Köhler für die herzliche Anteilnahme an meiner Arbeit und die wertvollen Kommentare zu den Artikelmanuskripten.

Herzlich danken möchte ich ebenso:

- Dorothea Bornholdt für ihre Hilfe bei Fragen aller Art, ihren Idealismus und ihre außergewöhnliche Hilfsbereitschaft;
- Christian Kosan für seine tatkräftige Unterstützung und seinen aufmunternden Humor;
- Alexander Schelbert für seinen immer zuverlässigen und enorm kompetenten Rat;
- Hartmut Engel für seine technische Unterstützung und seine kundigen Tips.

Auch allen nicht erwähnten Mitarbeitern danke ich für das gute Arbeitsklima. Ich habe sehr gerne am Institut gearbeitet und werde mit Freude an die Zeit zurückdenken.

11 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

„Assoziationsstudien und Kandidatengenanalysen bei Neuralrohrdefekten“
im Medizinischen Zentrum für Humangenetik unter Leitung von Frau Prof. Dr. M.C. Koch ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht (Kap. 12).

Marburg, den 14. Juni 2000

(Karolin Stegmann)

12 Publikationen

12.1 Originalarbeiten

- Koch MC, Stegmann K (1997) Neuralrohrdefekte: Genetische Faktoren und Umwelteinflüsse. *Der Kinderarzt* 28: 303-311
- Koch MC, Stegmann K, Ziegler A, Schröter B, Ermert A (1998) Evaluation of the *MTHFR* C677T allele and *MTHFR* gene locus in a German spina bifida population. *Eur J Pediatr* 157: 487-492
- Stegmann K, Ziegler A, Ngo ETKM, Kohlschmidt N, Schröter B, Ermert A, Koch MC (1999a) Linkage disequilibrium of *MTHFR* genotypes 677C/T-1298A/C in the German population and association studies in probands with neural tube defects. *Am J Med Genet* 87: 23-29
- Stegmann K, Boecker J, Kosan C, Ermert A, Kunz J, Koch MC (1999b) Human transcription factor SLUG: mutation analysis in patients with neural tube defects and identification of a missense mutation (D119E) in the Slug subfamily-defining region. *Mut Res Genomics* 406: 63-69
- Busse K, Köhler J, Stegmann K, Pongratz D, Koch MC, Schreiber H (2000) An inherited 4q35-*EcoRI*-DNA-fragment of 35 kb in a family with a sporadic case of facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD). *Neuromuscul Disord* 10: 178-181
- Richter B, Stegmann K, Röper B, Böddeker I, Ngo ETKM, Koch MC (2000) Cystathionine β -synthase (*CBS*) and methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) gene-gene interaction evaluated in susceptibility to neural tube defects. *Clin Genet* (eingereicht)
- Stegmann K, Richter B, Röper B, Capra V, Finnell RH, Strehl E, Koch MC (2000) Analysis of developmental genes *CART1*, *TWIST*, and *NOGGIN* potentially involved in human neural tube defects (NTD). *Am J Hum Genet* (in Vorbereitung)
- Stegmann K, Boecker J, Richter B, Ngo ETKM, Capra V, Finnell RH, Ermert A, Koch MC (2000) Sequence analyses of candidate risk factors *AP2 α* and *MSX2* in patients with neural tube defects (NTD). *Eur J Hum Genet* (in Vorbereitung)

12.2 Poster

- Stegmann K, Schröter B, Ermert A, Ziegler A, Koch MC (1998) No association between folate pathway mutation *MTHFR* C677T and spina bifida aperta in the German population. *Med Genet* 10: 124
- Stegmann K, Becker B, Ngo ETKM, Ziegler A, Koch MC (1999) Association studies in probands with neural tube defects for *MTHFR* genotypes 677C/T and 1298A/C. *J Med Genet* 36: S57
- Stegmann K, Kosan C, Boecker J, Ermert A, Koch MC, Kunz J (1999) Genomic characterization of human transcription factor SLUG and mutation analysis in neural tube defects. *Med Genet* 11: 179
- Kunz J, Stegmann K, Boecker J, Kosan C, Ermert A, Koch MC (1999) Human transcription factor SLUG: genomic characterization and mutation analysis in patients with neural tube defects. *Am J Hum Genet* 65: A190

12.3 Vortrag

- Stegmann K, Boecker J, Becker B, Koch MC (1999) Susceptibility genes in the aetiology of neural tube defects (NTD). International NTD-/INTEGGER-meeting, Schlangenbad.