

**Genetische Ursachen
von
Neuralrohrdefekten beim Menschen –
Assoziationsstudien und Kandidatengenanalysen**

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Bärbel Felder
aus Tett nang

Marburg/Lahn 2003

Die Untersuchungen zu der vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von November 1999 bis Dezember 2002 am Institut für Humangenetik der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Prof. Dr. Karl-Heinz Grzeschik durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 27.6. 2003 angenommen.

Erstgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Renate Renkawitz-Pohl
(Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg)

Zweitgutachterin: Prof. Dr. med. Manuela C. Koch
(Fachbereich Humanmedizin, Philipps-Universität Marburg)

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Juli 2003

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Epidemiologie und phänotypische Ausprägung von Neuralrohrdefekten (NRD)	1
1.2	Embryonalentwicklung des Menschen	4
1.2.1	Die Neurulation	4
1.2.2	Das Modell der multiplen Verschluss-Stellen	6
1.3	Ursachen von Neuralrohrdefekten	8
1.3.1	Genetische Ursachen	8
1.3.2	Folsäuresupplementierung	9
1.3.3	Ursachenforschung bei komplexen Erkrankungen	10
1.3.4	Tiere als Modelle menschlicher Krankheiten	11
1.3.5	Gene, die im Tiermodell zu NRD führen (NRD-Gene)	12
1.3.6	Gene, die an der Neurulation beteiligt sind (Neurulationsgene)	14
1.3.7	Assoziationsstudien bei komplexen Erkrankungen	15
1.4	Fragestellung der vorliegenden Arbeit	17
2	Material und Methoden	19
2.1	Material	19
2.1.1	Geräte und Zubehör	19
2.1.2	Chemikalien	20
2.2	Medien und Standardlösungen	21
2.2.1	Enzyme und DNA-Längenstandards	23
2.2.2	Verwendete Fertigsysteme (Kits)	23
2.2.3	PCR-Reagenzien	23
2.2.4	Ladepuffer	24
2.2.5	Nukleinsäuren, Nukleotide	24
2.2.6	Oligonukleotide	25
2.2.6.1	<i>CART1</i> Oligos	25
2.2.6.2	<i>BMP4</i> Oligos	26
2.2.6.3	<i>T-Gen</i> Oligos	26
2.2.6.4	<i>PDGFRα</i> Oligos	26
2.2.6.5	<i>TWIST</i> Oligos	26
2.3	Software und Datenbanken	27
2.3.1	Software	27
2.3.2	Datenbanken	27

2.4	Methoden	28
2.4.1	Molekularbiologische Standardmethoden	28
2.4.1.1	Gewinnung genomischer DNA aus Blutleukozyten	28
2.4.1.2	Gewinnung genomischer DNA aus Gewebe	28
2.4.1.3	DNA-Konzentrationsmessung	29
2.4.1.4	RNA Isolierung aus Blut	29
2.4.1.5	cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA	29
2.4.1.6	PCR – Optimierung	29
2.4.1.7	Restriktionsspaltung von DNA	30
2.4.1.8	Gelelektrophorese	30
2.4.1.9	Photodokumentation	30
2.4.1.10	SSCA (Single-stranded conformational analysis)	30
2.4.1.11	Silberfärbung	31
2.4.1.12	Klonierung von PCR-Produkten	32
2.4.1.13	Plasmid Minipräparation	32
2.4.1.14	PAC Präparation	32
2.4.1.15	DNA-Transfer auf Nylonmembran (Southern Blot)	33
2.4.1.16	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	33
2.4.1.17	Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Fragmenten	33
2.4.1.18	Nachweis der Signale mittels PhosphorImager	33
2.4.1.19	Nachweis der Signale mittels Autoradiographie	34
2.4.1.20	Sequenzierung	34
2.4.1.21	Lokalisation von Genen anhand eines Chromosomenpanels	34
2.4.2	Statistische Methoden	35
2.4.2.1	Fall-Kontroll-Vergleich	36
2.4.2.2	Familienbasierte Analyse (TDT)	36
2.5	Probanden und Kontrollen	37
3	Ergebnisse	38
3.1	<i>CART1</i> (12q21- q22)	38
3.1.1	<i>CART1</i> als Kandidatengen für NRD	38
3.1.2	<i>CART1</i> in der Datenbank	38
3.1.3	Experimentelle Ermittlung der genomischen Organisation von <i>CART1</i>	40
3.1.3.1	Intron-überspannende PCR (Intron 1 und 2)	41
3.1.3.2	Klonierung und Sequenzierung der PCR-Produkte	41
3.1.3.3	Intron-überspannende PCR (Intron 3)	42
3.1.3.4	Lokalisation von <i>CART1</i> auf Chromosom 12	42
3.1.3.5	Datenbankrecherche	45
3.1.3.6	Nachweis von <i>CART1</i> im Southern Blot	46
3.1.3.7	Isolierung eines genomischen <i>CART1</i> PAC Klons	48
3.1.3.8	Direkte Sequenzierung des PAC-Klons H031123	50
3.1.3.9	Genomische Struktur von <i>CART1</i>	51
3.1.3.10	Datenbankanalyse zur Identifizierung genregulatorischer Bereiche	52
3.1.3.11	Vergleich der Exon- und Introngrößen zwischen Mensch und Maus	53
3.1.4	<i>CART1</i> Mutationsscreen	54
3.1.4.1	Fall-Kontroll-Vergleich bei <i>CART1</i> Sequenzvarianten	56

3.2	<i>BMP4</i> (14q22-q23)	57
3.2.1	<i>BMP4</i> als Kandidatengen für NRD	57
3.2.2	<i>TGF-β</i> Genfamilie	57
3.2.3	Genstruktur von <i>BMP4</i>	59
3.2.4	SSCA-Mutationsscreen	60
3.2.5	<i>BMP4</i> Polymorphismus 455T? C	61
3.2.5.1	Fall-Kontroll-Vergleich	61
3.2.5.2	Familienbasierte Analyse (Transmission Disequilibrium Test, TDT)	62
3.3	<i>T</i> (6q27)	63
3.3.1	<i>T</i> als Kandidatengen für NRD	63
3.3.2	Untersuchung des intronischen Polymorphismus <i>T</i> IVS7+ 79T? C	64
3.3.2.1	Fall-Kontroll-Vergleich	64
3.3.2.2	Familienbasierte Analyse (TDT)	65
3.4	<i>PDGFRα</i> (4q12)	66
3.4.1	<i>PDGFRα</i> als Kandidatengen für NRD	66
3.4.2	Untersuchung der <i>PDGFRα</i> Promotor-Haplotypen	66
3.4.2.1	Genotypverteilung der <i>PDGFRα</i> Promotor-Haplotypen	67
3.4.2.2	Fall-Kontroll-Vergleich	68
3.5	<i>TWIST</i> (7p21)	69
3.5.1	<i>TWIST</i> als Kandidatengen für NRD	69
3.5.2	Genstruktur von <i>TWIST</i>	70
3.5.3	Mutationsscreen	70
4	Diskussion	71
4.1	Multifaktorielle Genese von NRD	71
4.2	Heterogene Ätiologie von NRD	71
4.3	Nachweis von Geneffekten bei komplexen Erkrankungen	72
4.4	Kandidatengenansatz	74
4.5	Die Rolle der Folsäure	75
4.6	Entwicklungsgene	76
4.6.1	Tiermodelle	76
4.6.2	Die Maus als Modell	77
4.7	Die Rolle von Transkriptionsfaktoren bei der Entstehung von Krankheiten	79
4.7.1	Funktion von Transkriptionsfaktoren	79
4.7.2	Mutationen in Transkriptionsfaktoren als Krankheitsursache	79
4.8	Methodisches: PCR / SSCA	82
4.9	<i>CART1</i>	84
4.9.1	Sequenzvarianten in <i>CART1</i> bei NRD-Patienten	88
4.9.2	<i>Cart1</i> -KO Maus als Modell für NRD beim Menschen	89

4.10	<i>BMP4</i>	91
4.11	<i>T</i>	93
4.12	<i>PDGFRa?</i>	95
4.13	<i>TWIST</i>	97
4.14	Statistische Methoden	99
	4.14.1 Phänotypische und ätiologische Heterogenität von NRD	99
	4.14.2 Wahl der Kontrollgruppe	99
	4.14.3 Wahl des statistischen Testverfahrens	101
4.15	Ausblick	102
5	Zusammenfassung	104
6	Abkürzungsverzeichnis	105
7	Literatur	108
8	Publikationen	118
	8.1 Originalarbeiten	118
	8.2 Poster	118
	8.3 Vortrag	118
9	Danksagung	Fehler! Textmarke nicht definiert.
10	Ehrenwörtliche Erklärung	Fehler! Textmarke nicht definiert.
11	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie und phänotypische Ausprägung von Neuralrohrdefekten (NRD)

Neuralrohrdefekte (NRD) sind angeborene Fehlbildungen von Gehirn und Rückenmark, die in der frühen Embryonalentwicklung durch eine Störung des Neuralrohrschlusses entstehen. Jährlich werden weltweit ca. 400.000 Kinder mit Neuralrohrdefekten geboren [Larsen 1997]. NRD sind damit nach Herzfehlern und Lippen-Kiefer-Gaumenspalten die häufigsten angeborenen Fehlbildungen beim Menschen. Die Häufigkeit, mit der NRD bei Geburt auftreten (Prävalenz), unterscheidet sich dabei in verschiedenen Bevölkerungsgruppen erheblich (Tab.1-1). Eine in Europa besonders hohe Prävalenz tritt in Irland mit 7:1000 Neugeborenen auf; in Skandinavien sind NRD seltener (0,5:1000) [Elwood et al. 1992, Stoll and EUROCAT Working group 1995]. In Deutschland traten NRD kurz nach dem Zweiten Weltkrieg besonders häufig auf (~ 5:1000). In den letzten Jahrzehnten fiel dieser Wert auf eine Prävalenz von 1:1000 Neugeborenen [Koch und Fuhrmann 1984, Queißer-Luft et al. 1996]. Da der Rückgang schon seit den 60er Jahren zu verzeichnen ist, kann er nicht allein durch die Verbesserung pränataldiagnostischer Methoden erklärt werden, die erst in den letzten zwei Jahrzehnten zunehmend Anwendung finden [Roberts et al. 1995]. Bei pränatalen Untersuchungen können NRD heutzutage durch Ultraschalldiagnostik und Bestimmung der Alphafetoprotein- und Acetylcholinesterasewerte im Fruchtwasser diagnostiziert werden [Fuhrmann und Weitzel 1985].

Tabelle 1-1 NRD-Prävalenzen in unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen

	Prävalenz
¹ Deutschland	1 - 1,5 : 1000
² Irland	7 : 1000
² England / Wales	0,7 : 1000
² Italien	0,4 : 1000
² Skandinavien	0,5 : 1000
² USA	1 - 2 : 1000

Literatur: ¹ [Koch und Fuhrmann 1984] ² [Elwood et al. 1992]

Unter dem Begriff NRD werden verschiedene klinische Phänotypen zusammengefasst, die sich in Lokalisation und Ausprägung des Defekts unterscheiden (Tab 1-1, [Botto et al. 1999, Moore und Persaud 1996]). Liegt der Defekt im Bereich der Wirbelsäule, spricht man von Spina bifida (SB). Am häufigsten tritt mit 55% die Spina bifida aperta (SBA) auf, bei der die Rückenmarkshäute (Meningen) und oft auch Teile des Rückenmarks (Myelon) durch einen Spalt der Wirbelbögen nach außen treten. Sind nur die Meningen betroffen, spricht man von einer Meningocele; treten sowohl Meningen als auch Rückenmark durch den Spalt aus, ist eine Meningomyelocele vorhanden (Abb.1-1). Die Beeinträchtigung der sensiblen und motorischen Nervenbahnen kann - je nach Höhe des Defekts (thorakal, lumbal oder sakral)- zu einer Querschnittslähmung führen. Die meisten SBA Patienten mit thorako-lumbalem Defekt sind rollstuhlpflichtig.

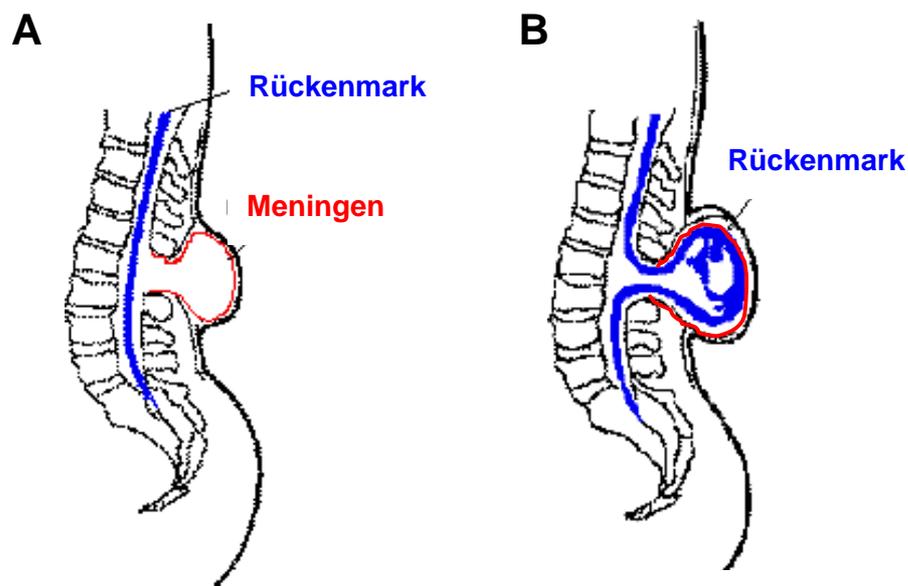


Abbildung 1-1 Verschiedene anatomische Varianten der Spina bifida aperta (SBA)

A Meningocele: Die Meningen treten durch offene Wirbelbögen nach außen. Das Rückenmark verbleibt im Rückenmarkskanal.

B Myelomeningocele: Das Rückenmark tritt samt Meningen durch die offenen Wirbelbögen nach außen.

Eine weitere Form, die im engeren Sinne keinen Neuralrohrdefekt darstellt, ist die Spina bifida occulta (SBO). Bei der SBO, die nur im lumbo-sakralen Bereich auftritt, ist das Rückenmark nicht fehlgebildet. Der Defekt liegt bei dieser Form im Bereich der Wirbelbögen, die nicht korrekt miteinander verschmolzen sind. Die SBO ist äußerlich meist nicht erkennbar und kann nur durch eine röntgenologische Untersuchung festgestellt werden. Sie tritt verhältnismäßig häufig auf (10% der Bevölkerung), die betroffenen Personen sind jedoch symptomlos.

Fehlbildungen im Bereich des Gehirns verursachen besonders schwere Formen von NRD, die zum Tod der betroffenen Kinder schon vor oder kurz nach der Geburt führen. Bei der Anencephalie (35-40% aller NRD) fehlen große Teile des Gehirns und des Schädeldachs. Wenn die Fehlbildung auch den Rückenbereich einschliesst, spricht man von Craniorachischisis. Eine seltene Form ist die Encephalocele, bei der Teile der Gehirnssubstanz (Encephalon) durch eine offen gebliebene Schädelstutur austreten (Gehirnprolaps). Die Häufigkeit der schweren Defekte ist bei Neugeborenen geringer als die verschiedenen Formen der Spina bifida. Dies bedeutet jedoch nicht, dass sie embryonal seltener entstehen. Es ist wahrscheinlich, dass es bei Feten mit besonders schwerwiegenden Fehlbildungen (besonders des Gehirns) zu einem spontanen Abort kommt.

Tabelle 1-2 Wichtige NRD-Phänotypen beim Menschen

Phänotyp	Lokalisation	Defekt	Ursache
Craniorachischisis	craniospinal	offen	primäre Neurulation
Anencephalie	cranial	offen	primäre Neurulation
Encephalocele	cranial	geschlossen	Mesodermdefekt
SBA	spinal	offen	primäre Neurulation
SBO	spinal	geschlossen	?

SBA = Spina bifida aperta

SBO = Spina bifida occulta

1.2 Embryonalentwicklung des Menschen

Der morphologische Entwicklungsstand des menschlichen Embryos wird in 23 Carnegie Stadien (CS) eingeteilt [O'Rahilly und Muller 1987]. Das Alter des Embryos sollte sinnvollerweise vom Zeitpunkt der Befruchtung aus berechnet werden (days postfertilization, dpf), da andere Definitionen (z.B. Gestationsalter) begrifflich nicht genau zu definieren sind und in der Literatur in unterschiedlichem Sinne verwendet werden [O'Rahilly und Muller 2000]. Da die Dauer der Schwangerschaft vom Zeitpunkt des 1. Tages der letzten Menstruation berechnet wird, bedeutet dies bei einem 28-tägigen Menstruationszyklus, dass die Befruchtung erst nach der 2. Schwangerschaftswoche (SSW) stattfindet. Zu Beginn der Neurulation in der 4. SSW ist der Embryo demnach erst gut 2 Wochen alt. Dies entspricht Carnegie Stadium 7 (16. Tag der Embryonalentwicklung).

1.2.1 Die Neurulation

Unter Neurulation versteht man die Gesamtheit der embryonalen Entwicklungsprozesse, die zur Bildung des Neuralrohrs führen, aus dem Gehirn und Rückenmark entstehen. Im Verlauf dieses Vorgangs unterlaufen die beteiligten Gewebe erheblichen zellmorphologischen Veränderungen, die zur Bildung der neuen Strukturen erforderlich sind. Epithelial-mesenchymale Grenzbereiche müssen neu definiert werden, um eine Abgrenzung des Neuralrohrs von Epidermis und Mesenchym zu gewährleisten. Induktionssignale aus dem umliegenden Ektoderm und Mesoderm, die nach einem räumlich und zeitlich exakt koordinierten Muster erfolgen, unterstützen sowohl Zellabgrenzungs- als auch Verschmelzungsprozesse. Bei Säugern findet man zwei unterschiedliche Mechanismen der Neurulation im cranialen und caudalen Bereich, die primäre und sekundäre Neurulation.

Im cranialen Bereich, etwa vom Rostrum bis zur Höhe des 1. Sakralwirbels, was dem 31. Somitensegment entspricht, findet die primäre Neurulation statt. Sie beginnt beim Menschen etwa am 16. Tag der Embryonalentwicklung (Carnegie Stadium 7) durch eine vom Mesoderm induzierte Umwandlung des primitiven Ektoderms zur Neuralplatte. Die Zellen der Neuralplatte unterlaufen erheblichen Veränderungen der Zellform, die schliesslich zur Entstehung der Neuralrinne und den lateralen Neuralwülsten führen. Bemerkenswert ist, dass alle Strukturveränderungen nur durch Veränderung der Zellform bewerkstelligt werden; das Neuralrohr behält seinen epithelialen (einschichtigen) Charakter. Die Einzelheiten der zellulären Mechanismen, die den Formveränderungen der Zellen zugrunde liegen, sind noch

weitgehend unbekannt. Die Auffaltung und anschließende Fusion der Neuralwülste an der zentralen Mittellinie findet zwischen dem 21. und 24. Tag (Carnegie Stadien 9-11) der Embryogenese statt. Damit einhergehend ist eine Ablösung vom epidermalen Ektoderm, das sich über dem ins Mesoderm verlagerten Neuralrohr schließt. Mit dem Verschluss des anterioren (24.Tag) und posterioren (26.Tag) Neuroporus endet der primäre Neurulationsprozess. Caudal des posterioren Neuroporus, also etwa ab dem 2. Sakralwirbel, findet die sekundäre Neurulation statt. Das Neuralrohr wird hier als massiver Stab mesenchymaler Zellen angelegt. Das Lumen des Neuralkanal wird erst nachträglich gebildet. Die sekundäre Neurulation beginnt erst nach dem Verschluss des posterioren Neuroporus, also ab dem 26. Tag der Embryonalentwicklung (Carnegie Stadium 12).

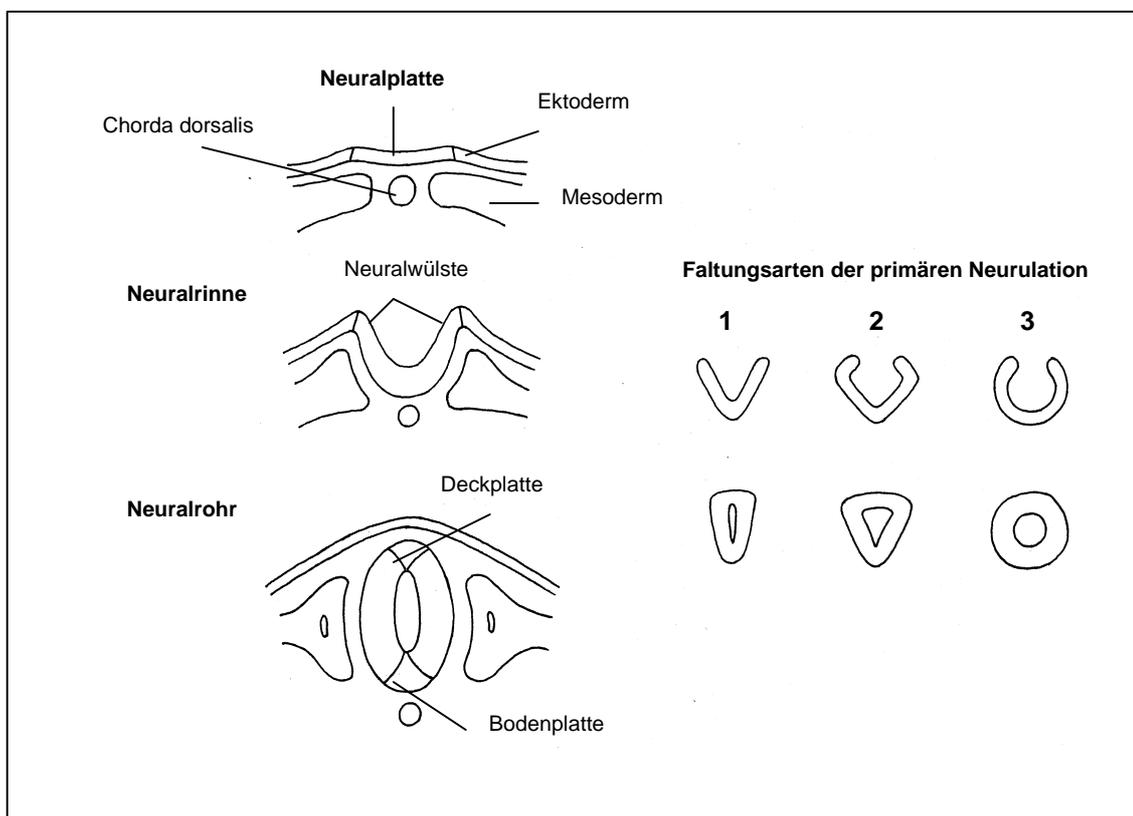


Abbildung 1-2 Schematische Darstellung der primären Neurulation

Im Bereich des Rückenmarks finden sich von rostral nach caudal drei unterschiedliche Modi der Neuralrohrfaltung [Shum und Copp 1996].

- 1** (cerviko-thorakal): ein Scheitelpunkt entsteht in der Mitte der Neuralplatte, V-förmiges Lumen.
- 2** (thorako-lumbal): ein Scheitelpunkt in der Mitte, zwei dorsolaterale Scheitelpunkte, Lumen dreieckig.
- 3** (sakral): kein Scheitelpunkt, gesamtes Neuroepithel gebogen, Lumen kreisförmig.

Die Neuralleistenzellen nehmen eine Sonderstellung innerhalb der aus dem Neuroektoderm gebildeten Zellen ein. Ihre Ablösung erfolgt aus den Rändern der Neuralwülste. Im Bereich des zukünftigen Gehirns geschieht diese Ablösung zeitlich *vor* der Fusion der Neuralwülste, während im Bereich des zukünftigen Rückenmarks zuerst der Neuralrohrschluss stattfindet. Neuralleistenzellen sind aufgrund ihrer Herkunft zunächst unbewegliche Epithelzellen, die im Laufe eines Reifungsprozesses zu migratorischen Zellen mesenchymalen Charakters umgewandelt werden. Dieser Prozess wird durch die differentielle Expression verschiedener Gene des umliegenden Gewebes gesteuert. Die zunächst noch stationären prä migratorischen Neuralleistenzellen wandern im Laufe der Embryonalentwicklung an ihre verschiedenen Bestimmungsorte im Körperinneren. Aus der Neuralleiste entstehen unterschiedlichste Zelltypen wie die Knorpelzellen des Kopfskeletts, die Melanozyten von Haut und anderen Geweben, endokrine Zellen des Nebennierenmarks sowie Neuronen des peripheren Nervensystems.

1.2.2 Das Modell der multiplen Verschluss-Stellen

Die Vorstellung über den Ablauf des Neuralrohrschlusses hat innerhalb der letzten Jahre große Veränderungen durchgemacht. Ursprünglich nahm man an, dass eine einzige Initiationsstelle vorhanden sei, von der aus die Fusion nach cranial und caudal fortschreitet (Reißverschlussmodell). Nachdem gezeigt werden konnte, dass es bei Mäusen vier Initiationsstellen des Neuralrohrschlusses gibt [Golden und Chernoff 1993], wurde für den Menschen ein ähnliches Modell vorgeschlagen. Fetalpathologische Beobachtungen schienen die Annahme zu stützen, dass beim Menschen fünf Verschluss-Stellen vorhanden seien [Van Allen et al. 1993]. Mehrere Studien ordneten die verschiedenen NRD Phänotypen den fünf postulierten Verschluss-Stellen zu [Martínez-Frías et al. 1996, Oostra et al. 1998].

Neuere Untersuchungen an menschlichen Embryonen zeigten jedoch, dass es wahrscheinlich nur drei Initiationsstellen gibt, von denen ausgehend sich der Verschluss des Neuralrohrs fortsetzt (Abb. 1-3) [Nakatsu et al. 2000]. Nach diesem Modell beginnt der Neuralrohrschluss an Verschluss-Stelle 1 auf der Höhe des zukünftigen Hals-Bereichs und schreitet rostral und caudal fort. Eine zweite Initiationsstelle liegt an der Grenze von Mesencephalon zu Rhombencephalon; auch hier findet die Fusion in beide Richtungen statt, so dass der kleine Spalt zwischen den beiden Initiationsstellen schnell geschlossen wird. Vom rostralen Ende des Embryos beginnend fusionieren die Neuralfalten des zukünftigen Prosencephalons in Richtung des vorderen Neuroporus.

Die unterschiedlichen NRD-Phänotypen lassen sich auch bei diesem Modell den Verschluss-Stellen zuordnen. Die häufige Spina bifida aperta betrifft demnach einen Defekt der nach caudal fortschreitenden Verschluss-Stelle 1. Weiter cranial gelegene Defekte wie Anencephalie und Encephalocele treten vermutlich bei einer Störung der Initiationstellen 2 und/oder 3 auf. Sind mehrere Verschluss-Stellen betroffen, entstehen NRD, die sich vom Gehirn über den gesamten Rückenbereich erstrecken. Bestimmte NRD-Phänotypen scheinen in einzelnen Bevölkerungsgruppen gehäuft aufzutreten, was für die Hypothese spricht, dass der Defekt einer bestimmten Verschluss-Stelle zu einer speziellen Form der Fehlbildung führt. Alle bisher beschriebenen NRD-Phänotypen sind offenbar die Folge einer gestörten primären Neurulation. Morphologische Untersuchungen menschlicher Embryonen haben gezeigt, dass die beobachteten Neuralrohrdefekte zeitlich schon vor dem Schluss des posterioren Neuroporus vorhanden sind [Nakatsu et al. 2000]. Damit ist eine gestörte sekundäre Neurulation als Ursache der Fehlbildungen auszuschließen, da sie erst nach diesem Zeitpunkt beginnt.

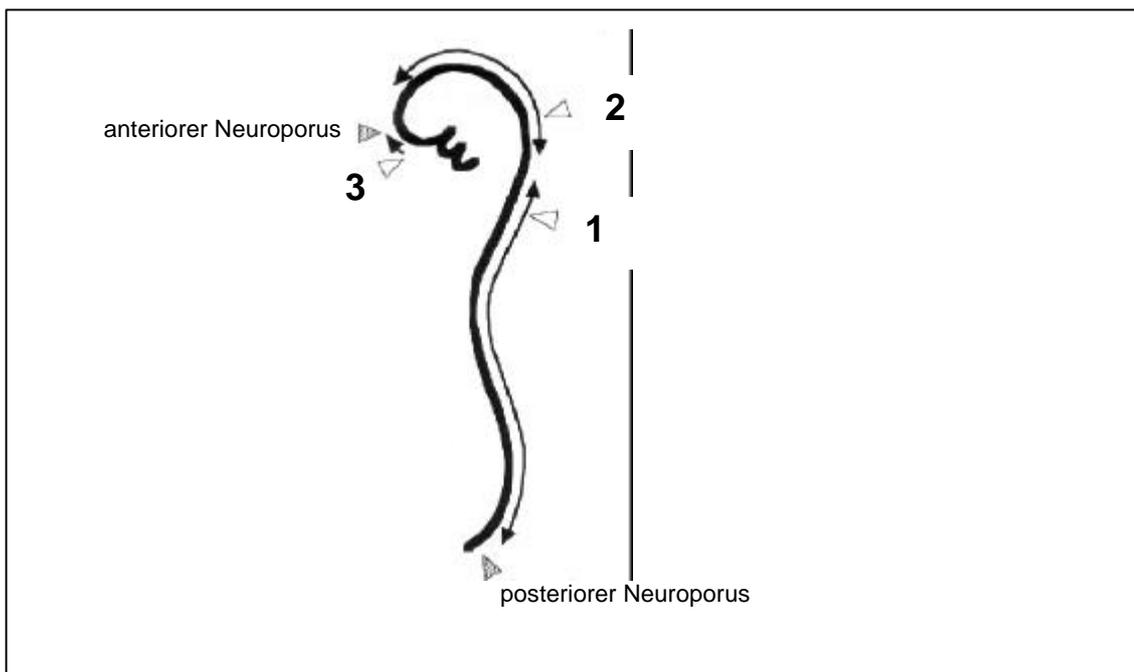


Abbildung 1-3 Die drei postulierten Verschluss-Stellen beim Menschen

(verändert nach Nakatsu et al. 2000)

Die Positionen 1, 2 und 3 stellen die Initiationstellen des Neuralrohrschlusses dar.

1 Beginn des Neuralrohrschlusses an der zukünftigen Zervikal-Region.

2 Verschluss-Stelle an der Grenze von Mesencephalon/Rhombencephalon.

3 Verschluss-Stelle am äußersten rostralen Ende des Embryos (rostral des anterioren Neuroporus), die nur in caudale Richtung fortschreitet.

Die schwarzen Pfeile geben die Richtung an, in die der Verschluss fortschreitet. Die grau hinterlegten Pfeilköpfe geben die Positionen der Neuroporen an.

1.3 Ursachen von Neuralrohrdefekten

Obwohl Neuralrohrdefekte zu den häufigen angeborenen Fehlbildungen gehören und seit vielen Jahren intensiv erforscht werden, sind die Ursachen ihrer Entstehung noch weitgehend unbekannt. Es wird angenommen, dass NRD durch eine multifaktorielle Genese bedingt sind. Dies bedeutet, dass sowohl Umwelteinflüsse als auch genetische Faktoren zusammenwirken und die Fehlbildung verursachen. Mütterliche Einflüsse wie Ernährung (Folsäure, Alkohol), Erkrankungen (Diabetes mellitus) und Medikamente (Antiepileptika wie Valproat) zählen zu den Umweltfaktoren, die die Entstehung von NRD beeinflussen [Fleming et al. 1997, Lindhout und Schmidt 1986].

Es ist vorstellbar, dass das unterschiedliche Ausmaß der Beteiligung von genetischen und Umweltfaktoren die Variabilität des Vererbungsmodus bedingt. Die meisten NRD (70-80%) sind nicht-syndromal (isoliert) und treten sporadisch, d.h. nicht familiär gehäuft, auf [Hall und Solehdin 1998b]. Nur in sehr seltenen Fällen folgt der Defekt Mendelnden Erbgängen [Fuhrmann und Weitzel 1985]. Ebenfalls selten sind familiäre Fälle, bei denen mindestens ein Verwandter ersten Grades betroffen ist. Gelegentlich tritt der Neuralrohrdefekt im Rahmen von Syndromen (Meckel-Gruber-Syndrom, Waardenburg-Syndrom) oder chromosomalen Anomalien auf (Trisomie 13 und 18).

1.3.1 Genetische Ursachen

Für das Vorhandensein genetischer Risikofaktoren sprechen epidemiologische Beobachtungen. Bei Angehörigen einer Ethnie treten bestimmte NRD-Phänotypen gehäuft auf. So finden sich frontoethmoidale Encephalocelen fast ausschließlich bei Thais [Flatz und Sukthomya 1970]. Dies kann damit erklärt werden, dass die verschiedenen NRD-Formen durch Störung unterschiedlicher Verschluss-Stellen auftreten, für die eine Bevölkerungsgruppe genetisch prädisponiert ist. Dass diese Prädisposition nicht ausschließlich von Umweltbedingungen verursacht wird, zeigt die Beobachtung, dass das NRD-Risiko einer Population auch erhalten bleibt, wenn sich die geographische Umgebung verändert. So haben die aus Nordindien stammenden Sikhs auch dann ein höheres NRD-Risiko, wenn sie nach Kanada ausgewandert sind [Hall et al. 1988].

Ein weiterer Hinweis für die genetische Komponente der Erkrankung ist das erhöhte Wiederholungsrisiko bei Verwandten. Das empirisch festgestellte Krankheitsrisiko von Geschwistern und Kindern eines NRD-Patienten ist mit 3% etwa 30fach höher als das der Allgemeinbevölkerung [Koch und Fuhrmann 1985]. Zwillingsstudien zeigen, dass die Konkordanz in Art und Stärke der Ausprägung des NRD bei eineiigen Zwillingen signifikant höher ist, als bei zweieiigen [Hall et al. 1988].

Es wird heute allgemein angenommen, dass NRD multifaktoriell bedingt sind, dass also erst das Zusammenwirken mehrerer Gene und Umweltfaktoren letztendlich zur Entstehung des Defekts führt. Der Beitrag eines einzelnen „defekten“ Gens ist dabei geringer als bei Krankheiten mit klassischem Mendelschen Erbgang. Um abschätzen zu können, wie hoch der genetische Beitrag zu einer komplexen Krankheit ist, kann das relative Risiko λ berechnet werden, das sich aus dem Wiederholungsrisiko für Verwandte ersten Grades ergibt [Risch und Merikangas 1996]:

$\lambda = \text{Krankheitshäufigkeit bei Verwandten ersten Grades} / \text{Krankheitshäufigkeit in der Bevölkerung}$
für NRD ergibt sich damit: $\lambda = 0,03 / 0,001 = 30$

Krankheiten mit rein genetischer Ursache wie Cystische Fibrose haben einen sehr viel höheren Wert ($\lambda = 500$), andere komplexe Erkrankungen wie Diabetes mellitus allerdings einen niedrigeren (3,5). Es kann also als gesichert gelten, dass prädisponierende genetische Faktoren an der Ätiologie von NRD beteiligt sind.

1.3.2 Folsäuresupplementierung

Einen Anhaltspunkt für umweltbedingte Ursachen von NRD stellt die empirische Beobachtung dar, dass nahrungsergänzende Folsäureeinnahme die Häufigkeit von Neuralrohrdefekten verringern kann. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass eine perikonzeptionelle Folsäuresupplementierung (0,4 mg/d oral) das NRD-Risiko um bis zu 70% senkt, und dies sogar bei Müttern, die schon ein Kind mit NRD haben [Berry et al. 1999, Czeizel und Dudás 1992, MRC Vitamin Study Research Group 1991]. Die aus diesen Studien abgeleiteten Empfehlungen zur perikonzeptionellen Folsäuresupplementierung gelten in Deutschland seit 1995. Der Mechanismus des präventiven Effekts der Folsäure ist jedoch noch nicht aufgeklärt.

Gene der am Folsäurestoffwechsel beteiligten Enzyme wie MTHFR (Methylentetrahydrofolat-Reduktase), MTRR (Methyltransferase-Reduktase) und CBS (Cystathionin- γ -Synthase) sowie die Gene der Folatezeptoren FR α und FR β , werden seit einigen Jahren auf ihre Beteiligung an der NRD-Ätiologie untersucht [Capra et al. 1997, Doolin et al. 2002, Richter et al. 2001]. So wird insbesondere der Polymorphismus 677C \rightarrow T der Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR) als genetischer Risikofaktor für NRD diskutiert. Einige Studien konnten eine Assoziation des 677TT-Genotyps mit NRD feststellen [Shields et al. 1999, van der Put et al. 1995]; in anderen Populationen konnte diese Assoziation aber nicht bestätigt werden [Koch et al. 1998, Morrison et al. 1998, Stegmann et al. 1998]. Bisher gibt es keine eindeutigen Hinweise auf eine Assoziation zwischen Polymorphismen in den untersuchten Genen und der Entstehung von NRD [Kalter 2000, van Waes und Finnell 2001].

1.3.3 Ursachenforschung bei komplexen Erkrankungen

Die in den vergangenen Jahrzehnten erzielten Erfolge der Molekulargenetik bei der Entschlüsselung krankheitsverursachender Genmutationen beschränken sich weitgehend auf monogene Krankheiten, deren Ursachen mit Hilfe von klassischen Kopplungsanalysen aufgeklärt werden konnten. Die Erforschung genetisch komplexer Krankheiten erfolgt jedoch unter Annahme eines völlig anderen Vererbungsmodells. Die bei der Untersuchung monogener Krankheiten angewandten Methoden führen daher bei der Entschlüsselung von NRD nicht weiter. Klassische parametrische Kopplungsanalysen, die eine bestimmte Verteilung der Grundgesamtheit voraussetzen, erfordern die genaue Kenntnis des Erbgangs (Dominanz/Rezessivität, Grad der Penetranz), eine Familienstruktur mit mehreren Betroffenen und einen eindeutig klassifizierbaren Phänotyp (Tabelle 1-3). Bei der Ursachenforschung von komplexen Erkrankungen wie NRD, bei denen das zugrundeliegende Vererbungsmodell nicht bekannt ist, werden daher nicht-parametrische Analysen (Assoziationsstudien, Kap. 1.3.7.) angewandt.

Für Assoziationsstudien ist der Kandidatengenansatz geeignet. Als Kandidatengene bezeichnet man alle Gene, die aufgrund bekannter Eigenschaften (z.B. Expressionsmuster, Auswirkungen des Funktionsverlusts *in vivo*) im Zusammenhang mit der Entstehung von NRD stehen können. Die ausgewählten Kandidatengene werden auf Sequenzveränderungen untersucht, mit dem Ziel, Sequenzvarianten zu finden, die bei NRD-Patienten gehäuft auftreten. Das Vorhandensein einer Assoziation deutet auf eine Beteiligung der Sequenzveränderung an der Pathogenese von NRD hin.

Eine grundlegende Schwierigkeit bei der Anwendung des Kandidatengenansatzes besteht in der Auswahl geeigneter Gene. Angesichts der Vielzahl der an der Neurulation beteiligten Gene ist die Eingrenzung auf einige wenige Kandidaten unvermeidbar. Erkenntnisse aus Tiermodellen werden daher als wichtige Kriterien für die Eignung eines Kandidatengens herangezogen.

Tabelle 1-3 : Statistische Verfahren zur Identifikation krankheitsrelevanter Gene

	Art der Analyse	Studiendesign	Voraussetzungen
parametrische Analyse	Kopplungsanalyse	Kopplung	bekannter Erbgang, große Familien, eindeutiger Phänotyp
nicht-parametrische Analyse	Assoziationsstudie	Fall-Kontroll-Studie	passende Kontrollgruppe vorhanden, ausreichende Gruppengröße
		TDT	Familie (Eltern) vorhanden
	familienbasierte Assoziationsstudien	ASA	betroffene Geschwister vorhanden
		APM	ausreichend große Familien mit Betroffenen

TDT = Transmission Disequilibrium Test; ASA = Affected Sib-pair Analysis; APM = Affected Pedigree Member

1.3.4 Tiere als Modelle menschlicher Krankheiten

Tiere als Modellorganismen zur Analyse humaner Erkrankungen sind für die medizinische Forschung von großer Bedeutung. Sie liefern grundlegende Einsichten in biochemische Stoffwechselwege, Signaltransduktionskaskaden und Genregulationsmechanismen. Mit ihrer Hilfe lassen sich die Auswirkungen einer veränderten Genexpression und -regulation auf den Organismus *in vivo* beobachten. Eine zentrale Rolle nimmt hier die Hausmaus (*Mus musculus*) ein, die das Standard-Säugetier-Modell schlechthin darstellt. Gerechtfertigt erscheint dies durch die große Ähnlichkeit der Morphologie und der starken evolutionären Konservierung vieler Signalwege innerhalb der Embryonalentwicklung von Vertebraten. Die Maus ist zudem bis heute der einzige Säuger, an dem gezielte genetische Manipulationen möglich sind, wie z.B. die Ausschaltung eines einzelnen Gens bei Knock-out Mäusen. Der Phänotyp dieser Mäuse liefert Hinweise auf die Funktion des ausgeschalteten Gens, und findet im Idealfall die Entsprechung in den Symptomen des menschlichen Krankheitsbildes.

Es gibt inzwischen viele Fälle, in denen die Übertragung vom Tiermodell auf den Menschen erfolgreich war. Gehörlosigkeit tritt als Symptom mehrerer erblicher Erkrankungen des Menschen auf (Waardenburg-Syndrom, Tietz-Syndrom). Mindestens fünf der verantwortlichen Gene (*Pax3*, *Mitf*, *Myo15* u.a.) wurden durch die Identifikation des mutierten Gens bei der Maus entdeckt [Probst und Camper 1999]. Ein weiteres Beispiel ist die durch spontane Mutation entstandene NOD-Mausmutante, die an Diabetes leidet und als Modell für den insulinabhängigen Diabetes mellitus des Menschen gilt [Adorini et al. 2002, Yoshida und Kikutani 2000]. Auch andere Organismen haben erfolgreich als Modelle gedient. So sind bei angeborenen Herzfehlbildungen Gene mutiert, die bei der Herzentwicklung von Huhn und *Drosophila* identifiziert wurden [Brand et al. 1999].

Zur Selektion vielversprechender Kandidatengene für NRD werden zwei Hauptkriterien herangezogen: das räumlich und zeitliche Expressionsmuster eines Gens während der Neurulation und die Auswirkungen seines Funktionsverlust *in vivo*. Damit lassen sich die für NRD diskutierten Entwicklungsgene in zwei Kategorien einteilen: Gene, die an der Neurulation beteiligt sind (Neurulationsgene), und Gene, die im Tiermodell zu einem NRD führen (NRD-Gene). NRD-Gene, die durch den Phänotyp von Mausmutanten entdeckt wurden, werden im folgenden Kapitel behandelt.

1.3.5 Gene, die im Tiermodell zu NRD führen (NRD-Gene)

Mittlerweile ist eine Vielzahl von Mausmutanten mit NRD beschrieben [Copp 1998, Harris und Juriloff 1999, Juriloff und Harris 2000]. Eine Auswahl der Mausmutanten und der betroffenen Gene zeigt Tabelle 1-4.

Auffällig ist, dass die meisten Mausmutanten craniale NRD entwickeln, während isolierte lumbosakrale SBA selten sind. Eines der besten Modelle für lumbosakrale SBA (*Curly tail*) scheidet für Kandidatengen-Analysen aus, da das betreffende Gen der spontanen Mutation noch nicht bekannt ist. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass NRD bei Mäusen meist zusammen mit anderen Fehlbildungen auftreten, während beim Menschen isolierte NRD überwiegen. Trotzdem gibt es Hinweise auf Gemeinsamkeiten bei der Entstehung von NRD. Valproat löst in beiden Spezies NRD aus, beim Menschen in Form einer SBA, bei der Maus in Form von Exencephalie [Copp et al. 1990]. Dies lässt vermuten, dass der Defekt trotz unterschiedlicher phänotypischer Ausprägung auf der Störung ähnlicher Mechanismen beruht.

Tabelle 1-4 Mausmutanten, die NRD entwickeln

Mutante	Gen	Art der Mutation	präventiver Effekt	Defekt	andere FB	Literatur
Ap2?	<i>Ap2?</i>	KO	—	EX	+	[Stegmann et al. 2001, Zhang et al. 1996]
Axial-defects	<i>Axd</i>	spontan	Methionin	SB	+	[Essien et al. 1990]
Patch (<i>Ph</i>)	<i>Pdgfra</i>	spontan	—	SBO (<i>Ph/Ph</i>)	+	[Payne et al. 1997, Stephenson et al. 1991]
undulated (<i>un</i>)	<i>Pax1</i>	spontan	—	Wirbelfehlbildungen	+	[Balling 1994]
undulated/ Patch	<i>Pax1/ Pdgfra</i>	spontan	—	SBO (<i>Ph/+</i> , <i>un/+</i>)		[Helwig et al. 1995]
Extra-toes (<i>Xt</i>)	<i>Gli3</i>	spontan	—	EX	+	[Hui und Joyner 1993]
Spotch (<i>Sp-2H</i>)	<i>Pax3</i>	spontan	Folsäure	EX (+ SB)	+	[Fleming und Copp 1998, Takahashi 1996]
Spotch (<i>Sp</i>)	<i>Pax3</i>	spontan	kein Effekt durch Folsäure	SB	+	[Gefrides et al. 2002]
Short-tail	<i>Brachyury (T)</i>	spontan	—	SB	+	[Beddington et al. 1992]
Curly tail (<i>ct</i>)	unbekannt	spontan	Inositol	SBA (+ EX)	–	[Greene und Copp 1997, Neumann et al. 1994, van Straaten und Copp 2001]
Cart1	<i>Cart1</i>	KO	Folsäure	EX	–	[Zhao et al. 1996]
Loop-tail (<i>Lp</i>)	<i>Ltap (Lpp1)</i>	spontan	—	RACH (<i>Lp/Lp</i>) SB (<i>Lp/+</i>)	+	[Copp et al. 1994, Kibar et al. 2001, Murdoch et al. 2001a]
Circletail (<i>Crc</i>)	<i>Scrb1 (Scribble)</i>	spontan	—	RACH	+	[Murdoch et al. 2003, Murdoch et al. 2001b]
Twist	<i>Twist</i>	KO	—	EX	+	[Soo et al. 2002]
Folbp1	<i>Folbp1</i>	KO	Folsäure	EX	früh letal	[Piedrahita et al. 1999]
Crooked tail (<i>Cd</i>)	unbekannt	spontan	Folsäure	EX (<i>Cd/Cd</i>)	+	[Carter et al. 1999]
Cited2	<i>Cited2</i>	KO	Folsäure	EX	+	[Barbera et al. 2002]

FB = Fehlbildungen; SB = Spina bifida; SBA = Spina bifida aperta; SBO = Spina bifida occulta; EX = Exencephalie; RACH = Rachischisis oder Craniorachischisis; KO = Knock-out

Literatur: Übersicht [Copp 1998] [Harris und Juriloff 1999] [Juriloff und Harris 2000]

Induktive Signale aus dem umliegenden Mesoderm sind auch von großer Bedeutung für die Etablierung dorso-ventraler Zellgrenzen. *Bmp4* ist ein sezerniertes Signalpeptid, das zusammen mit seinem Inhibitor *Noggin* für die Musterbildung im sich entwickelnden Neuralrohr verantwortlich ist (Abb.1-4). *Bmp4* wird zuerst im angrenzenden epidermalen Ektoderm und später im dorsalen Teil des Neuralrohrs (Deckplatte) exprimiert. Vom Chordamesenchym wird das Signalpeptid Sonic hedgehog (Shh) freigesetzt, das die Zelldifferenzierung zur Etablierung des ventralen Neuralrohrs (Bodenplatte) induziert.

Die Chorda dorsalis spielt außerdem eine wichtige Rolle bei der Bildung der Wirbelkörper. Direkt angrenzend an das Chordamesenchym lagern sich Chondrozyten an, die den Knorpelvorläufer des späteren Wirbelkörpers bilden. Zu den Genen, die speziell in der Chorda exprimiert werden, gehört das *T*-Gen (*Brachyury*), das ebenfalls in dieser Arbeit untersucht wurde. Die *T*-Knock-out Maus zeigt erhebliche Defekte in allen mesodermalen Strukturen und entwickelt einen spinalen NRD [Wilson et al. 1995]. In Tabelle 1-5 sind mehrere der Entwicklungsprozesse aufgeführt, deren Störung möglicherweise zur Entstehung von NRD beiträgt.

Tabelle 1-5 Mechanismen, die zur Entstehung von NRD beitragen können

gestörter Mechanismus	Struktur / Gewebe	exprimierte Gene
Unterstützung durch das Mesoderm	Kopfmesenchym	<i>Cart1, Twist, Pdgfra</i>
Differenzierung des Neuralrohrs	Neuralfalten und Neuralrohr (Deckplatte)	<i>Bmp4</i>
Bildung des Wirbelkörpers	Chorda dorsalis	<i>T</i>

1.3.7 Assoziationsstudien bei komplexen Erkrankungen

Komplexe Erkrankungen sind in der Bevölkerung weitaus häufiger als monogene Erkrankungen mit Mendelndem Erbgang. Sie sind in diesem Sinne „Volkskrankheiten“ (Diabetes mellitus, Asthma, Krebserkrankungen), deren Therapie erhebliche gesundheitsökonomische Relevanz besitzt. Die Tatsache, dass mehrere Gene zusammenwirken, erschwert jedoch den Nachweis von Gen-Effekten in der statistischen Analyse. Mit nicht-parametrischen Analysen (Assoziationsstudien) lassen sich jedoch auch schwache Effekte nachweisen, die bei Durchführung einer Kopplungsanalyse einen unrealistisch großen Stichprobenumfang erfordern würden.

Von einer Assoziation zwischen einem definierten Allel und einer Krankheit spricht man, wenn dieses Allel häufiger oder seltener bei den erkrankten Personen als bei nicht-betroffenen Personen (Kontrollen) auftritt.

Falls eine Assoziation beobachtet wird, kann sie durch folgendes bedingt sein:

- a) das assoziierte Allel selbst beeinflusst das Risiko für die Erkrankung
- b) ein weiterer Genort in der Nähe des assoziierten Allels hat Auswirkungen auf das Krankheitsrisiko

In letzteren Fall besteht ein Kopplungsungleichgewicht zwischen beiden Allelen, was bedeutet, dass beide Allele häufiger (oder seltener) zusammen auftreten, als aufgrund der einzelnen Allelfrequenzen erwartet wird (erwartete Häufigkeit: Produkt der Allelfrequenzen). Die überwiegende Mehrheit der durchgeführten Assoziationsstudien untersucht einen oder einige wenige bekannte Polymorphismen in einem Kandidatengen hinsichtlich einer Assoziation mit einer Krankheit. Dabei werden die Merkmale (Allele eines Polymorphismus) einer Gruppe von betroffenen Patienten denen einer Kontrollgruppe aus gesunden Personen gegenübergestellt (Fall-Kontroll-Studie). Wenn sich die Kontrollgruppe in den untersuchten Merkmalen von den Patienten unterscheidet, wird der statistische Test eine Assoziation erbringen. Dabei muss ausgeschlossen werden, dass die Unterschiede an einer abweichenden Populationszusammensetzung der Kontrollgruppe liegen. Um solche Stratifikationseffekte zu vermeiden, können sogenannte „interne Kontrollen“, d.h. Familienmitglieder (Eltern) auf das betreffende Merkmal untersucht werden. Damit ist sichergestellt, dass Betroffene und Kontrollen aus der gleichen Population stammen (familienbasierte Assoziationsstudien). Da sich die an der Entstehung von NRD beteiligten Gene möglicherweise bei den verschiedenen Ethnien unterscheiden, gilt die Aussage einer Assoziationsstudie ausschließlich für die Bevölkerungsgruppe, in der sie durchgeführt wurde. Dies bedeutet, dass positive Assoziationsstudien anderer Ethnien auf ihre Relevanz für die deutsche Population überprüft werden müssen.

1.4 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Neuralrohrdefekte sind häufige Erkrankungen, die zu schweren gesundheitlichen Beeinträchtigungen der Betroffenen führen. Die Identifikation genetischer Risikofaktoren birgt die Möglichkeit, genetische Prädisponierung für NRD zu erkennen, und dementsprechende Empfehlungen (z.B. Folsäuresupplementierung) für Risikopersonen geben zu können. Außerdem dienen die bei der Aufklärung von Krankheitsursachen gewonnenen Erkenntnisse auch einem besseren Verständnis der ungestörten Neurulation. Da Neuralrohrdefekte offensichtlich durch einen fehlerhaften Neuralrohrschluss entstehen, scheint es naheliegend, dass genetische Auslöser der Fehlbildung im Umfeld des Neurulationsprozesses zu suchen sind.

Für diese Arbeit wurden mehrere Kandidatengene ausgewählt, die im Tiermodell an der Neurulation und/oder der Entstehung von NRD beteiligt sind. Dazu zählen die Transkriptionsfaktoren *CART1*, *T*, und *TWIST*, das sezernierte Signalpeptid *BMP4* sowie das Rezeptorprotein *PDGFRa*. Alle werden während der Neurulation entweder direkt im Neuralrohr (*BMP4*) in den Abkömmlingen der Neuralleiste (*PDGFRa*, *BMP4*) oder im umliegenden Mesoderm (*CART1*, *TWIST*, *T*) exprimiert. Außerdem ist bekannt, dass der Funktionsverlust sowohl von *Cart1*, *Twist*, *T* als auch von *Pdgfra* in der Maus zu NRD führt. *Cart1* ist zudem ein besonders vielversprechendes Kandidatengen für Folsäure-abhängige NRD, da Folsäuregabe die Schädelfehlbildungen der *Cart1* Knock-out Maus verhindern kann.

Genomische DNA von Betroffenen mit NRD sollte auf Sequenzveränderungen in den ausgewählten Kandidatengen untersucht werden. Da hierzu die genomische Sequenz des entsprechenden humanen Gens bekannt sein muss, sollte zunächst mittels Datenbankrecherchen überprüft werden, welche humanen Sequenzen bereits vorhanden waren. Wenn keine Gesamtsequenzen zugänglich, sollten sie, soweit möglich, aus bereits vorhandenen Teilsequenzen zusammengesetzt werden. Da die Einträge in den Datenbanken oft redundant sind und möglicherweise Fehler enthalten, wurde großen Wert darauf gelegt, verlässliche (d.h. mehrfach verifizierte) Sequenzen als Grundlage der Mutationsscreens zu verwenden. Wenn die Exon-Intron-Struktur eines Gens noch nicht bekannt, sollte sie experimentell ermittelt werden.

Mit Hilfe der Single-Stranded-Conformational-Analyse (SSCA) sollten die Gene auf Sequenzveränderungen bei NRD-Patienten untersucht werden. Die durch PCR amplifizierten Fragmente sollten so entworfen werden, dass sich eine optimale Detektions-Sensitivität der SSCA ergibt. Die gefundenen Sequenzveränderungen sollten mit Hilfe von Fall-Kontroll- und familienbasierten Assoziationsstudien auf eine mögliche Assoziation mit NRD überprüft werden. Polymorphismen und Mutationen, die eine positive Assoziation zeigen, sollten hinsichtlich ihres möglichen Beitrags zur Entstehung von NRD untersucht werden. Dazu sollten Sequenzvergleiche mit homologen Genen anderer Spezies erfolgen, um beurteilen zu können, ob die gefundenen Sequenzveränderungen möglicherweise zu einer eingeschränkten Funktion des Proteins führen (z.B. Stop-Mutationen, Nonsense-Mutationen).

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse sollten damit als Ausgangspunkt für die Selektion geeigneter NRD-Kandidatengene für weiterführende funktionelle Studien dienen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Zubehör

Autoklav	Gössner, Hamburg
ABI Prism 377 DNA-Sequencer	Applied Biosystems, USA
ABI Prism 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, USA
Biodyne B Nylonmembran	Pall, Dreieich
Brutschrank Typ B5042E	Heraeus, Hanau
Einmachfolie (Zellglas)	Folia Paper, Wendelstein
Hamilton Spritze	Hamilton, Schweiz
Hofer SE 600 Elektrophorese Unit	Amersham, Freiburg
Hybridisierungssofen Sonder 30	Bachofer, Reutlingen
Imaging-Platten, Fuji BAS-III S	Fuji, Japan
IP-Kassetten, Fuji BAS	Fuji, Japan
pH-Meter CG836	Schott, Hofheim
Phosphoimager Fuji BAS 1000	Fuji, Japan
Photometer GeneQuant <i>pro</i>	Amersham, Freiburg
Pipetten	
Eppendorf Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Finnpipetten	Labsystems, Finnland
Multipette	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen Biosphere Quality	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße	
Falcon Tubes (50 ml)	Falcon, USA
MicroAmp Reaction Tubes	Perkin Elmer Cetus, USA
Micro Test Tubes (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
MicroTubes (0,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Röntgenfilm X-OMAT	Eastman Kodak, USA
Röntgenfilmentwicklungsgerät QX 60	Sakura, Japan
Röntgenkassetten Cronex	DuPont, USA
Schüttelinkubator G25	New Brunswick Scientific, USA
Sterilbank Microflow Intermed	Stolco, Düsseldorf
Thermoblock Techne DB 3	Kobe, Marburg

Thermocycler :

GeneAmp PCR System 9600

Applied Biosystems, USA

TRIO Thermoblock TB1

Biometra, Göttingen

UV-Transilluminator UVT-40M

Herolab, Wiesloch

Vortexer Reax 2000

Heidolph, Hamburg

Waagen

Präzisionswaage 2254

Sartorius, Göttingen

Feinwaage AE 240

Mettler, Schweiz

Wasserbäder

Typ 3042

Köttermann, Hänigsen

Typ 1083

GFL, Burgwedel

Typ M3

Lauda, Königshofen

Whatman-Papier 3M

Whatman, USA

Zentrifugen:

Sorvall RT 6000B

DuPont, Dreieich

Sorvall GLC-2B

DuPont, Dreieich

Eppendorf 5415 R Kühlzentrifuge

Eppendorf, Hamburg

Biofuge 13

Heraeus, Hanau

2.1.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen: Sigma (München), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Riedel-de-Haen (Seelze), Roche Diagnostics (Mannheim), Serva (Heidelberg), FMC BioProducts (USA).

Long Ranger Gel Solution

BioWhittaker Molecular Applications, USA

2.2 Medien und Standardlösungen

Zur Sterilisation wurden Medien und Lösungen 30 min bei 123°C autoklaviert. Falls nicht anders angegeben, wurde für alle Puffer und Lösungen A.dest. benutzt.

DNA-Extraktion

RCLB-Puffer	10 mM Tris 5 mM MgCl ₂ 10 mM NaCl pH 7,6 mit HCl einstellen
SE-Puffer	75 mM NaCl 25 mM EDTA pH 8,0 mit NaOH einstellen
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH 8,0 mit 1 M Salzsäure einstellen
DNA-Extraktionspuffer	100 mM Tris 100 mM EDTA 1 % (w/v)SDS pH 9,0 mit NaOH einstellen

Gelelektrophorese

5 x TBE-Puffer	0,45 M Tris 0,45 M Borsäure 10 mM EDTA
10 x TPE-Puffer	80 mM Tris 20 mM EDTA pH 8,3 mit Phosphorsäure (85%) einstellen

Nährmedien

LB-Flüssigmedium:	10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Bacto-Hefeextract 10 g/l NaCl pH 7,5 mit 1 M Tris (pH 7,5) einstellen
LB-Agar	10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Bacto-Hefeextract 10 g/l NaCl 20 g/l Bacto-Agar pH 7,5 mit 1 M Tris (pH 7,5) einstellen

Antibiotika (Stammlösungen)

Ampicillin	100 mg/ml
Kanamycin	50 mg/ml

Lösungen für Southern Blot und Hybridisierung

Depurinierungslösung	0,25 M HCl
Denaturierungslösung	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
20 x SSC	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat pH 7,0 einstellen
2 x Waschlösung	2 x SSC 0,1% (w/v) SDS

Sonstige

IPTG-Stammlösung	100 mM
Ethidiumbromid-Stammlösung	10 mg/ml EtBr
APS	10 % (w/v) Ammoniumpersulfat in H ₂ O

2.2.1 Enzyme und DNA-Längenstandards

Alle Restriktionsenzyme wurden von MBI Fermentas (St.Leon-Rot) bezogen.

DNA-Längenstandards:

100 bp DNA Leiter	Gibco BRL, Eggenstein
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
?-DNA, <i>EcoRI</i> / <i>HindIII</i> geschnitten	Gibco BRL, Eggenstein

2.2.2 Verwendete Fertigsysteme (Kits)

Advantage-GC Genomic PCR Kit	Clontech, Heidelberg
GeneAmp XL PCR Kit	ABI, Weiterstadt
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Large Construct Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy™ Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden
TOPO® TA Cloning Kit	Invitrogen, USA
DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit	Amersham, Freiburg
Megaprime DNA labelling System	Amersham, Freiburg
Superscript™ First-Strand Synthesis	Invitrogen, NL

2.2.3 PCR-Reagenzien

10 x PCR-Puffer	Amersham, Freiburg
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Amersham, Freiburg
Platinum <i>Taq</i> DNA Polymerase	Gibco, Eggenstein
MgCl ₂ (25 mM)	Amersham, Freiburg
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
Betaine 5 M	Sigma, München

2.2.4 Ladepuffer

6 x Agarosegel-Ladepuffer	15 % (w/v) Ficoll 0,05 % Bromphenolblau 0,05 % Xylencyanol
SSCA-Gelladepuffer	95 % Formamid 20 mM EDTA (pH 7,4) 0,05 % Bromphenolblau 0,05 % Xylencyanol
PAA-Gelladepuffer	30 % Glycerol 0,05 % Bromphenolblau 0,05 % Xylencyanol

2.2.5 Nukleinsäuren, Nukleotide

α -³²P-dCTP (3000 Ci/mmol) Amersham, Braunschweig

Der *Cart1* cDNA Klon der Ratte (1,7 kb full-length *Cart1* cDNA in pBluescript®KS+) wurde freundlicherweise von Dr. H. Eberspächer (M.D. Anderson Cancer Center, University of Texas, USA) zur Verfügung gestellt.

Die verwendeten PAC Klone wurden vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (RZPD, Heidelberg) bezogen.

Klon	RZPD-Identifikationsnummer	Vektor
H031123	RPCIP704H031123Q2	pCYPAC2
D15164	RPCIP704D15164Q12	pCYPAC2
O06211	RPCIP704O06211Q12	pCYPAC2
H03190	RPCIP704H03190Q12	pCYPAC2
B14309	RPCIP704B14309Q12	pCYPAC2
K20154	RPCIP704K20154Q12	pCYPAC2
A13883	RPCIP704A13883Q2	pCYPAC2
J24261	RPCIP704J24261Q12	pCYPAC2

2.2.6 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von Sigma-Genosys (UK) in *desalted* Qualität bezogen.

Primer	Sequenz 5'? 3'	Primer	Sequenz 5'? 3'	Verwendung	Produkt
M13 f	gtaaacgacggccag	M13 r	caggaacacgctatgac	Vektorprimer	abhängig von Insert
GAPDH f	gtccagtagtattccaccacgg caagtt	GAPDH r	tgcccagcccagcatcaaa ggtagaagagt	Test auf genomische Verunreinigung bei cDNA	

2.2.6.1 *CART1* Oligos

forward Primer	Sequenz 5'? 3'	reverse Primer	Sequenz 5'? 3'	Verwendung	Produkt
Cart 1f	agcgctctccagtttctgtg	Cart 1r	ctccagaggacctcctgc	PCR Mutations-Screen	139 bp
Cart 2.1r	gctgctgtcctgacagggcg	Cart 2f	atggagtttctgagcgagaag	PCR Mutations-Screen	225 bp
Cart i-15f	aaagcgtctgcaggcaaat	Cart i-15r	tcgctcccacttttctctt	PCR Mutations-Screen	206 bp
Cart i-16f	cctgagaactgtgttttctt	Cart i-16r	cgtatcacatttatcccaagt	PCR Mutations-Screen	184 bp
Cart 3f	aggacagccccttcacaccga	Cart 4r	cggcgcctccgtttcttac	PCR Mutations-Screen	156 bp
Cart i-17f	gaagggagagctggatgaac	Cart i-17r	atccatccatcaaggcctc	PCR Mutations-Screen	230 bp
Cart 20f	acctggtttacctttctgttt	Cart 20r	ggtagctgtcagctcctg	PCR Mutations-Screen	220 bp
Cart i3-7f	caaatacaacaagcgaag	Cart i3-7r	aataaagcctatgctaaccatt	PCR Mutations-Screen	160 bp
Cart i3-5f	cccaataggagcaacaatgaa	Cart i3-5r	gaggcagtgagaataagggtg	PCR Mutations-Screen	225 bp
Cart 10f	cggacagattccagtttacac	Cart 11r	acatggccatgaaatattg	PCR Mutations-Screen	211 bp
Cart 16f	gaggtcttccagtagtcgag	Cart 12r-2	tccacacacagcagctattg	PCR Mutations-Screen	167 bp
Cart i-13f	gtgcgctggagaggacc	Cart i-13r	cacgggagacattcggagac	Amplifizierung Intron 1	~ 3,3 kb
Cart i-5f	actcattaccggatgtg	Cart i-5r	tcgctgtgtattttggc	Amplifizierung Intron 2	~ 3,2 kb
Cart i-8f	atcagttttccaaggac	Cart i-11r	ctgtccgaggcagtgag	Amplifizierung Intron 3 (unspezifisches Produkt)	
Cart i-9f	ggactgacagctaccac	Cart i-10r	gaataagggtgcatacag	Amplifizierung Intron 3 (unspezifisches Produkt)	
Cart 16f	gaggtcttccagtagtcgag	Cart 12r-2	tccacacacagcagctattg	Chromosomenpanelscreen 3' Bereich von <i>CART1</i> (Exon 4 + UTR)	167 bp
Cart 1f	agcgctctccagtttctgtg	Cart 1r	ctccagaggacctcctgc	Chromosomenpanelscreen 5' Bereich von <i>CART1</i> (UTR + Exon 1)	139 bp
3'UTR 2f	gtttaccatgtgccagtctccac	3'UTR 2r	catataaattccaactcgtgatgc	Sonde PAC-Bank Screening PAC Direktsequenzierung	720 bp
Cart i3-1f	ttttgctgccacctatgata			PAC Direktsequenzierung	
Cart i-8f	atcagttttccaaggac			PAC Direktsequenzierung	
		Cart i3-1r	aaccctgtgtaactggaa	PAC Direktsequenzierung	
		Cart i3-2r	ccgtgtaactggaatctgtc	PAC Direktsequenzierung	
		Cart i3-3r	gaggcagtgagaataaggt	PAC Direktsequenzierung	
		Cart i3-4r	ccccgtgtaactggaatct	PAC Direktsequenzierung	

2.2.6.2 BMP4 Oligos

Primer	Sequenz 5'? 3'	Primer	Sequenz 5'? 3'	Verwendung	Produkt
bone 1f	tcccctccccctcccagag	bone 1r	agaagtgtgcctcgaagtc	PCR Mutations-Screen	210 bp
bone 2f	ctcagggcagagccatgagc	bone 2r	acgcagactgggggaagaga	PCR Mutations-Screen	258 bp
bone 3f	ctttccccttcctcctaa	bone 3r	gggggctcataacctcat	PCR Mutations-Screen + 455T? C Polymorphismus	220 bp
bone 4f	ggggcttccaccgtataaacat	bone 4r	ccgagtctgatggaggtgagtc	PCR Mutations-Screen	218 bp
bone 5f	gctggaccgggagaagcag	bone 5r	tcctggcccgtctgagtg	PCR Mutations-Screen	240 bp
bone 6f	caagcgtagccctaagcatc	bone 6r	caatggcatggttggtga	PCR Mutations-Screen	200 bp
bone 7f	cctttccactggctgacc	bone 7r	atctcaaggactgctgat	PCR Mutations-Screen	224 bp

2.2.6.3 T-Gen Oligos

Primer	Sequenz 5'? 3'	Primer	Sequenz 5'? 3'	Verwendung	Produkt
TIVS7 f	tgctgtgactcacgctgtttcc	TIVS7 r	gaaccagtaagtggcagaaccagg	455T? C SNP Typisierung	268 bp

2.2.6.4 PDGFRa Oligos

Primer	Sequenz 5'? 3'	Primer	Sequenz 5'? 3'	Verwendung	Produkt
Pdgfra 1f	cggtttttgagcccatta	Pdgfra 1r	tctttcccttaccttctcc	Promoter-Haplotypisierung	150 bp
Pdgfra 2f	agcattccgaacaaggggctgt	Pdgfra 2r	tgcgctgggggtccattg	Promoter-Haplotypisierung	150 bp
Pdgfra 8f	tgaccccaacccaacagg	Pdgfra 8r	cgctgatgctccaggaaccaga	Promoter-Haplotypisierung	122 bp
Pdgfra 9f	ggctcagctgcaattccaagg	Pdgfra 9r	gcgtttgaggaatcgtaccacc	Promoter-Haplotypisierung	123 bp

2.2.6.5 TWIST Oligos

Primer	Sequenz 5'? 3'	Primer	Sequenz 5'? 3'	Verwendung	Produkt
twist 2f	gccccgctcttctcctctgc	twist 13r	cgctccgacgccccaccc	PCR Mutations-Screen	240 bp
twist 5f	gggggctgctggaggc	twist 5r	ccatgaccgctgctct	PCR Mutations-Screen	166 bp
twist 8f	gggagtccgagctttacga	twist 8r	gccagcttgagggtctgaat	PCR Mutations-Screen	164 bp
twist 9f	tcggacaagctgagcaagattc	twist 3r	ggtctccggccctgctgag	PCR Mutations-Screen	231 bp

2.3 Software und Datenbanken

2.3.1 Software

Textverarbeitung	Word 2000, Microsoft
Datenverwaltung	Excel 2000, Microsoft
	Access 2000, Microsoft
Primerdesign	Oligo 5.0, NBI
Literaturverwaltung	Endnote 6.0, Niles Software
Grafik	PowerPoint, Microsoft
	Photoshop 6.0, Adobe
Sequenzanalyse	Sequencher 4.1, Gene Codes
Statistik	StatXact 4.0, Cytel Software

2.3.2 Datenbanken

Datenbank	Internetadresse
NCBI (National Center of Biotechnology Information)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
EMBL (European Molecular Biology Laboratory)	http://www.embl-heidelberg.de/
BCM-Search Launcher (Alignment)	http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/multi-align/multi-align.html
UCSC – Genome Bioinformatics	http://genome.ucsc.edu/
Rebase (Restriction Enzyme Database)	http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html
HGMP (Human Genome Mapping Project Resource Center)	http://www.hgmp.mrc.ac.uk/
Webcutter 2.0	http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html
Expasy Molecular Biology Server	http://www.expasy.org/
HUGO Nomenclature Committee	http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/
RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH)	http://www.rzpd.de/
SWISS-Prot	http://www.expasy.ch
Ensembl	http://www.ensembl.org/
Eukaryotic Promotor Database EPD	http://www.epd.isb-sib.ch/
Whitehead Institute	http://www-genome.wi.mit.edu/
OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/
The Jackson Laboratory	http://www.jax.org/
Mouse knockout and mutation database (BMN)	http://research.bmn.com/mkmd
LEO	http://dict.leo.org/

2.4 Methoden

2.4.1 Molekularbiologische Standardmethoden

2.4.1.1 Gewinnung genomischer DNA aus Blutleukozyten

Zur Gewinnung genomischer DNA der Probanden wurde EDTA-Blut (frisch oder eingefroren) verwendet. 10 ml Blut wurden mit 20 ml Red Cell Lysis Buffer (RCLB) versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Während dieser Zeit lysieren die Erythrozyten im hypotonischen Puffer, die Leukozyten bleiben intakt und können durch einen anschließenden Zentrifugationsschritt (10 min bei 3000 rpm, 4°C) sedimentiert werden. Das Pellet aus Leukozyten wurde in 5 ml SE-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl SDS (10%) und 2,5 µl Proteinase K (10 mg/ml) wurde die Suspension bei 55°C 3h schüttelnd inkubiert. Danach wurden die abgebauten Proteinreste durch Zugabe von 2 ml NaCl (5 M) ausgefällt, und bei Raumtemperatur abzentrifugiert (10 min, 3000 rpm). Der DNA-haltige Überstand wurde mit 40 ml eiskaltem 95%igem Ethanol (EtOH) gefällt. Die DNA wird mit einem sterilen Glashaken entnommen, mit 70%igem EtOH gewaschen und in ca. 500 µl TE-Puffer über Nacht bei 4°C gelöst.

2.4.1.2 Gewinnung genomischer DNA aus Gewebe

50 mg tiefgefrorenes (-20°C) Gewebe (vorzugsweise Leber) wurde mit 500 µl DNA-Extraktionspuffer und 50 µl SDS (10%) im Mörser zerkleinert. Nach Zugabe von 15 µl Proteinase K (20 mg/ml) wurde der Ansatz 2-3 h bei 55°C (ohne Schütteln) inkubiert. Danach wurden dem Ansatz 140 µl Kaliumacetat (8 M) zugegeben und nach kurzem vortexen 30 min auf Eis inkubiert. Zelltrümmer wurden danach 10 min bei 8000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, Phenol/Chloroform extrahiert und anschließend mit EtOH gefällt. Die DNA wurde danach in ca. 200 µl TE-Puffer über Nacht bei 4°C gelöst.

2.4.1.3 DNA-Konzentrationsmessung

Die Konzentration von DNA wurde mit einem Photometer gemessen. DNA mit einer Dichte von 50 ng/µl besitzt bei 260 nm Wellenlänge eine Extinktion von 1. Die Konzentration der gemessenen DNA kann also folgendermaßen berechnet werden:

$$[\text{DNA } (\mu\text{g/ml})] = E_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor } (\mu\text{g/ml})$$

Die DNA wurde über einen Wellenlängenbereich von 200-300 nm gemessen. Der Quotient aus E_{260} und E_{280} ist ein Maß für die Verunreinigung der DNA mit Proteinen; er sollte zwischen 1,8 und 1,9 liegen.

2.4.1.4 RNA Isolierung aus Blut

Die Gewinnung von Gesamt-RNA aus 4,5 ml frisch abgenommenem EDTA-Blut erfolgte mit dem RNeasy Blood Mini Kit von QIAGEN nach Angaben des Herstellers. Die übliche Ausbeute lag bei 100 – 250 ng RNA/µl. Um auszuschließen, dass sich Reste genomischer DNA im Ansatz befanden, wurde das Lysat noch auf der Säule mit DNase verdaut (siehe Tipps in QIAGEN Anleitung). Die so erhaltene RNA wurde anschließend für die cDNA-Synthese eingesetzt.

2.4.1.5 cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA

Zur cDNA-Synthese wurde SuperScript von Gibco benutzt (nach Angaben des Herstellers). Die Inkubation erfolgte im Thermocycler. Nach der Synthese wurde restliche RNA mit RNase H verdaut (20 min, 37°C). Um sicherzugehen, dass der cDNA Ansatz keinerlei Reste genomischer DNA enthielt, wurde eine Test-PCR mit GAPDH Primern durchgeführt. Diese Primer amplifizieren auf cDNA Ebene ein 300 bp großes Fragment, bei genomischer DNA entsteht ein ca. 700 bp großes Produkt.

2.4.1.6 PCR – Optimierung

Besondere Sorgfalt wurde auf die Auswahl der Primer verwendet. Das hierfür verwendete OLIGO 5.0 Programm erlaubt die Einstellung zahlreicher Parameter, die für die jeweilige Anwendung der Primer (PCR, Direktsequenzierung) optimiert werden können.

Die meisten Templates konnten mit geeigneten Primerpaaren bei Standardbedingungen amplifiziert werden. Die Annealing-Temperatur wurde für Spezifität und Ausbeute des PCR-Produktes optimiert. Bei schwierigen Templates (z.B. GC-reiche Sequenzen) wurden Zusätze wie DMSO (2-15 %), Betain und Formamid (2-10 %) eingesetzt. Bei großen PCR-Produkten (ab 1 kb) wurde die Elongationszeit verlängert und die Synthese-Temperatur auf 68°C herabgesetzt, um bessere Ausbeuten an Produkt zu erhalten.

2.4.1.7 Restriktionsspaltung von DNA

Doppelsträngige DNA kann durch Restriktionsendonukleasen gespalten werden. Da die Sequenzspezifität der Restriktionsenzyme erheblich von Art und Konzentration der in der Reaktionslösung vorhandenen Ionen abhängt, wurde der vom Hersteller empfohlene Reaktionspuffer eingesetzt. Die Spaltung genomischer DNA wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt, mit 1-5 Units des Enzyms pro 1 µg genomischer DNA.

Für die Spaltung von Plasmid-DNA wurden 5 Units des Restriktionsenzym pro 1 µg Plasmid-DNA in einem Gesamtansatz von 20 µl eingesetzt. Die Inkubation erfolgte 1 – 2 h im Thermoblock bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur.

2.4.1.8 Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten zwischen 100 bp und 40 kb erfolgte in 0,8-2,5%igen Agarosegelen. Als Laufpuffer wurde 0,5 x TBE verwendet. Für Gele mit längerer Laufzeit (> 12h) wurde TPE-Puffer eingesetzt. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit Ladepuffer vermischt, um die Laufweite im Gel später abschätzen zu können.

Für die Auftrennung kleinerer Fragmente (< 100 bp) wurden Polyacrylamid-Gele (PAA-Gele) benutzt, die die Auftrennung von bis zu 3 bp erlauben.

2.4.1.9 Photodokumentation

Agarosegele wurden vor dem Giessen mit Ethidiumbromid (EtBr) versetzt, um die DNA unter UV-Licht sichtbar machen zu können (2 µl der EtBr-Stammlösung (10 mg/ml) auf 100 ml des Agarosegels). PAA-Gele wurden erst nach dem Lauf in einer höher konzentrierten Ethidiumbromid-Lösung (50 µl EtBr-Stammlösung auf 500 ml TBE-Puffer) angefärbt (5 min bei 2 mm Schichtdicke).

Zur Dokumentation wurden die Gele unter UV-Licht fotografiert. Die Verwaltung und Auswertung der Bilder erfolgte mit E.A.S.Y.Rh3 Software (Herolab).

2.4.1.10 SSCA (Single-stranded conformational analysis)

Zur Mutationssuche in den Kandidatengenomen wurde die Einzelstrang-Konformations-Analyse eingesetzt (SSCA). Dazu wird denaturierte, einzelsträngige DNA auf ein nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen. Im Gel nimmt die DNA durch Basenpaarung mit sich selbst komplexe Konformationen ein, die von der Nukleinsäuresequenz und der Temperatur abhängen. Schon eine einzige mutierte Base kann zu veränderten Laufeigenschaften des Fragments im Gel führen. Die Sensitivität der SSCA hängt dabei von der Länge der PCR-Produkte ab, die optimale Größe liegt zwischen 130 – 300 bp.

Das jeweilige Gen wurde aus genomischer DNA mit überlappenden PCR-Produkten von maximal 250 bp amplifiziert. Diese wurden mit SSCA-Ladepuffer (formamidhaltig) versetzt, denaturiert und danach auf ein nicht-denaturierendes PAA-Gel (12 %, 49:1) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 2 Temperaturen durchgeführt, 20°C und 10°C. Anschließend wurde eine Silberfärbung durchgeführt. Die so gefärbten Gele wurden in Zellglas (Einmach-Folie) verpackt und getrocknet. Sie sind auf diese Weise dauerhaft haltbar. Aberrante Fragmente wurden aus dem Gel ausgestochen und in Wasser gelöst. Die aus dem Gel gelöste DNA wurde anschließend mit PCR reamplifiziert und sequenziert. Die SSCA Bedingungen wurden für jedes einzelne PCR-Produkt optimiert: aufgetragene DNA-Menge, Spannung und Laufzeit wurden individuell variiert.

2.4.1.11 Silberfärbung

Bei der Silberfärbung lagern sich die positiv geladenen Silberionen an die negativ geladenen Phosphatreste der DNA an. Durch das in der Entwicklerlösung enthaltene Formaldehyd werden die Silberionen reduziert und anschließend mit Natriumcarbonat gefällt. Das Gel wird so lange in der Entwicklerlösung inkubiert, bis die Fragmente die gewünschte Farbintensität zeigen. Durch Einlegen des Gels in den Fixierer (Essigsäure) wird die Reaktion abgestoppt.

?? 10% Ethanol	5 min
?? 1% Salpetersäure	5 min
?? H ₂ O	1 x kurz spülen
?? Silbernitrat-Lösung	30 min
?? H ₂ O	2 x gründlich spülen
?? Entwickler	in der Lösung bewegen, bis sich Fragmente zeigen
?? Fixierer	2 min
?? H ₂ O	1 x 2 min spülen
?? Konservierer	mindestens 30 min

Lösungen:

Silbernitrat-Lösung	12 mM AgNO ₃
Entwickler	0,14 M Na ₂ CO ₃ 0,038 % Formaldehyd
Fixierer	10 % Essigsäure

2.4.1.12 Klonierung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden mit dem TOPO® TA Cloning Kit kloniert. Um eine möglichst effektive Ligation der DNA mit dem Vektor zu gewährleisten, wurde der letzte PCR-Syntheseschritt verlängert (10-15 min je nach Länge des PCR-Produkts). Das PCR-Produkt wurde außerdem möglichst frisch verwendet, da die Adenosin-Überhänge mit der Zeit abgebaut werden. Musste für die Amplifikation eine andere Polymerase als *Taq* verwendet werden, die keine Adenosin-Überhänge generiert, wurde das fertige PCR-Produkt nochmals für 15 min bei 72°C mit *Taq* inkubiert. Transformiert wurde mit den ebenfalls im Kit enthaltenen chemisch kompetenten Zellen des Stamms TOP10. Ligation und Transformation erfolgten nach Anleitung des Herstellers.

2.4.1.13 Plasmid Minipräparation

Die Präparation von Plasmiden erfolgte mittels Alkalischer Lyse nach Standard-Protokollen. Die durchschnittliche Ausbeute lag bei 2 – 4 µg/µl. Für spezielle Anwendungen, bei denen die Reinheit des Plasmid besonders entscheidend ist (z.B. Direktsequenzierung), wurde das Plasmid über eine Säule aufgereinigt (QIAprep Plasmid Mini Kit).

2.4.1.14 PAC Präparation

Die Präparation großer Vektoren wie PACs und BACs (ca. 150 kb) erfolgt nach speziellen Protokollen. Problematisch ist die Trennung der Vektor-DNA von der genomischen Bakterien-DNA, da hier nicht nach Größe getrennt werden kann. Es wurden unterschiedliche Methoden zur Präparation gewählt: Der QIAprep Large Construct Kit enthält einen optionalen Schritt mit zusätzlichem Exonuklease-Verdau, der die Entfernung genomischer sowie „genickter“ DNA garantieren soll. Der Nachteil dieses Schritts besteht darin, dass auch beschädigte Vektor-DNA abgebaut wird, was zu sehr geringen Ausbeuten führen kann.

Zur Anzucht wurden 500 ml LB/Kan mit 3 ml einer Übernacht-Kultur (LB/Kan) des Klons im 1 l Erlenmeyerkolben angeimpft. Nach 4 h schüttelnder Inkubation bei 37°C wurde die Kultur mit 500 µl 1 M IPTG induziert (Endkonzentration 1 mM). Nach weiteren 4 h Inkubation wurde die Kultur mit 4000 U/min 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das Pellet bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren. Die Präparation erfolgte nach Anleitung des Kits, je nach gewünschter Verwendung mit oder ohne Exonuklease-Verdau.

2.4.1.15 DNA-Transfer auf Nylonmembran (Southern Blot)

Für den Southern Blot mit genomischer, mit Restriktionsenzymen gespaltener DNA wurde ein 0,8 %iges TPE-Agarosegel (200 ml) benutzt. 6 – 10 µg der gespaltenen DNA wurden pro Tasche aufgetragen und bei 40 V über Nacht (24 h) aufgetrennt. Danach wurde das Gel in 2fachem Volumen Depurinierungslösung 15 min depuriniert. Anschließend erfolgte die Denaturierung der DNA 30 min in Denaturierungspuffer. Bei der verwendeten Biodyne B Membran ist keine vorherige Neutralisierung des Gels notwendig, sie wurde auf das noch alkalische Gel trocken aufgelegt. Die Übertragung der DNA auf die Nylonmembran nach Standardbedingungen (Kapillarblot) wurde über Nacht durchgeführt. Die Membran wurde anschließend bei 80°C 30 min gebacken und mit A.dest. gespült.

2.4.1.16 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Hierfür wurde das Megaprime™ DNA labelling System (Amersham) benutzt. Der Einbau der radioaktiven Nukleotide erfolgt durch „*random priming*“. Es wurden 25 ng der doppelsträngigen Template-DNA (z.B. PCR-Produkt, mit QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt) eingesetzt und nach Angaben des Herstellers radioaktiv mit ³²P markiert.

2.4.1.17 Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Fragmenten

Sowohl Prähybridisierung (30 min, 65°C) als auch Hybridisierung (über Nacht, 65°C) erfolgte im Rapid-hyb-Puffer (Amersham). Anschließend wurde die Membran 2 x 5 min mit 2 x SSC / 0,1 % SDS gewaschen (65°C), die Signalstärke mit dem Kontaminationsmonitor überprüft und ggf. mit 0,2 x SSC / 0,1 % SDS 1 min nachgewaschen. Die Membran wurde danach in Klarsichtfolie eingelegt, um ein Austrocknen zu verhindern. Dadurch wird die markierte DNA-Sonde nicht irreversibel an die Membran gebunden, und konnte zur erneuten Hybridisierung der Membran wieder entfernt werden („Strippen“, in 0.1% SDS-Lösung bei 90°C, schüttelnd auf RT abkühlen lassen).

2.4.1.18 Nachweis der Signale mittels PhosphorImager

Die Technologie des PhosphorImager ermöglicht einen raschen Nachweis der erhaltenen ³²P-Signale. Die hybridisierte Membran wurde dazu in der IP-Kassette auf einen speziell beschichteten Screen aufgelegt, dessen Kristalle durch die ionisierende Energie des ³²P in einen angeregten Zustand versetzt werden. Nach erfolgter Exposition mit der Membran (ca. 1h je nach Signalstärke) wurde der Screen im PhosphoImager-Gerät mittels Laser abgelesen. Die Auswertung der Signale erfolgte mit dem angegliederten TINA Programm.

2.4.1.19 Nachweis der Signale mittels Autoradiographie

Alternativ zur PhosphorImager Technologie wurden radioaktive Signale mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. Die hybridisierte Membran wurde dazu je nach Signalstärke 1 h bis 2 Tage mit Röntgenfilm exponiert. Um auch schwache Signale detektieren zu können, wurde bei Bedarf eine Verstärkerfolie aufgelegt und bei -70°C für 2 Tage exponiert. Nach der Exposition wurden die Röntgenfilme in einem automatisierten Röntgenfilm-Entwicklungsgerät entwickelt.

2.4.1.20 Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgte durch Cycle Sequencing. Die Methode folgt dem Prinzip des Kettenabbruch-Verfahrens nach Sanger et al. 1977, wobei die *in vitro* DNA Polymerisation unter den Bedingungen einer PCR durchgeführt wird. Da nur ein Primer verwendet wird, erfolgt die Anreicherung der DNA nicht potentiell, sondern linear.

Zur Sequenzierung wurden der DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit und das automatische Sequenziergerät ABI 373 verwendet. Mit diesem System können Didesoxynukleotide verwendet werden, die mit vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Dies hat den Vorteil, dass sowohl die Sequenzreaktion als auch der Gellauf in einem Ansatz durchgeführt werden kann. Beim Lauf durch das denaturierende PAA-Gel werden die Farbstoffe von einem Laser angeregt und die Emission gemessen. Mit der angegliederten Software von ABI (Sequencher und Sequence Navigator) wurden die Ergebnisse graphisch dargestellt (Elektropherogramm) und ausgewertet.

2.4.1.21 Lokalisation von Genen anhand eines Chromosomenpanels

Mit einem Chromosomenpanel (Mapping Panel Version 2, NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repository, [Drwina et al. 1993]) konnte getestet werden, aus welchem Chromosom ein bestimmtes PCR-Produkt amplifiziert wurde.

Das Panel besteht aus 24 Reaktionsgefäßen mit DNA aus somatischen Mensch/Nagetier Zellhybriden, von denen jedes ein humanes Chromosom enthält (Chromosom 1 bis 22, X und Y). Die DNA jedes Chromosoms wird als Template für eine PCR-Reaktion mit genspezifischen Primern eingesetzt, die unter stringenten Bedingungen durchgeführt wird. Fragmente der erwarteten Produktgröße erscheinen bei denjenigen Chromosomen, die die Zielsequenz enthalten. Als Negativ-Kontrolle wurde bei jeder PCR genomische DNA von Maus (*Mus musculus*) und Chinesischem Streifenhamster (*Cricetulus griseus*) benutzt. Damit konnte ausgeschlossen werden, dass die im Panel aufgetretenen PCR-Produkte auf die für die Zellhybriden benutzte Nagetier-DNA zurückzuführen waren.

2.4.2 Statistische Methoden

Der statistische Test dient dazu, zu entscheiden, ob beobachtete Unterschiede (in diesem Fall genetische Merkmale) von Stichproben zufallsbedingt (Nullhypothese H_0) aufgetreten sind oder nicht (Alternativhypothese H_1). Ist der Unterschied nicht zufallsbedingt, spricht man von einer Assoziation des untersuchten Merkmals mit der Grundgesamtheit (z.B. „NRD-Patienten“), aus der die Stichprobe stammt. Dies bedeutet, dass sich beide Grundgesamtheiten („NRD-Patienten“ und „Personen ohne NRD“) hinsichtlich des untersuchten Merkmals unterscheiden. Mit statistischen Testverfahren (χ^2 , McNemar, Cochran-Armitage Trend Test) wird aus den beobachteten Messwerten der zugehörige p-Wert ermittelt. Der p-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der man sich irrt, wenn man die Nullhypothese H_0 ablehnt. Ist diese Wahrscheinlichkeit niedriger als das Signifikanzniveau α , wird H_0 verworfen. Damit wird die Alternativhypothese angenommen, und das Ergebnis wird als statistisch signifikant bezeichnet. Hierbei sind zwei Fehlermöglichkeiten gegeben: Wird die Alternativhypothese als richtig unterstellt, obwohl das nicht zutrifft, liegt ein **Fehler 1. Art** (α -Fehler) vor. Wird die Alternativhypothese dagegen verworfen, obwohl sie in Wahrheit zutrifft, spricht man vom **Fehler 2. Art** (β -Fehler). In einem statistischen Testverfahren lässt es sich nicht umsetzen, beide Fehlerwahrscheinlichkeiten beliebig klein zu wählen. Die Fehlerwahrscheinlichkeiten α und β hängen direkt voneinander ab, so dass der eine Fehler umso geringer ist, je größer der andere wird. Es ist daher wichtig, das Signifikanzniveau α derart zu wählen, dass die Fehlerwahrscheinlichkeiten in einem sinnvollen Rahmen liegen. Um ein falsch-positives Ergebnis nach Möglichkeit auszuschließen, wird meist $\alpha = 0,05$ gesetzt.

Weiterhin 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 Merkmals (Allel oder Genotyp) ist. Um die Genauigkeit der OR beurteilen zu können, wurde das zugehörige CI angegeben. Ein CI ist ein 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. Bei Krankheiten mit niedriger Prävalenz, zu denen auch NRD zählen, wird die OR gleich dem Relativen Risiko. Das Relative Risiko (RR) gibt den multiplikativen Faktor an, um den sich die Erkrankungswahrscheinlichkeit erhöht, wenn man dem untersuchten Risikofaktor ausgesetzt ist (z.B. Vorliegen eines bestimmten Genotyps). Ein Relatives Risiko von 1 besagt, dass das untersuchte Merkmal keinen Einfluss auf die Erkrankung ausübt.

2.4.2.1 Fall-Kontroll-Vergleich

In Fall-Kontroll-Vergleichen wird ein genetisches Merkmal auf eine Assoziation mit dem Krankheitsphänotyp geprüft [Gambaro et al. 2000]. Eine Assoziation liegt vor, wenn das Merkmal bei Betroffenen (Fälle) signifikant häufiger auftritt als bei Nicht-Betroffenen (Kontrollen). Die Wahl des geeigneten statistischen Tests hängt vom zugrundeliegenden biologischen Modell und anderen Parametern (z.B. Gruppengröße) ab. Das klassische Testinstrument ätiologischer Fragestellung ist der χ^2 -Test auf Unabhängigkeit. χ^2 -Tests können allerdings nur verwendet werden, wenn der Stichprobenumfang (d.h. die in der Studie untersuchten Personen) hinreichend groß ist. Bei kleiner Gruppengröße muss man sich exakter Testverfahren (z.B. Cochran-Armitage Trend Test, Fisher's Exact Test) bedienen.

In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl der χ^2 -Test auf Unabhängigkeit als auch der Cochran-Armitage-Trend-Test benutzt. Beim Cochran-Armitage Trend Test fließen alle drei möglichen Genotyphäufigkeiten (homozygot Wildtyp, heterozygot, homozygot mutiert) gleichrangig in die Berechnung ein [Agesti 1991]. Dies ist dann sinnvoll, wenn nicht bekannt ist, welches der beiden Allele potentiell krankheitsauslösend ist.

2.4.2.2 Familienbasierte Analyse (TDT)

In familienbasierten Assoziationsstudien wird ebenfalls geprüft, ob ein spezifisches Allel bei betroffenen Personen überzufällig häufig auftritt. Der TDT (Transmission Disequilibrium Test) ist ein statistischer Test, mit dem überprüft werden kann, ob ein bestimmtes Allel des untersuchten Merkmals der Eltern überzufällig häufig an das betroffene Kind weitergegeben wurde [Knapp 1999]. Welches Allel weitergegeben wurde, kann nur bei Eltern, die zwei unterschiedliche Allele haben, nachvollzogen werden. Für den TDT sind daher nur in Bezug auf das Merkmal heterozygote Eltern „informativ“, d.h. tragen zur Aussage des Tests bei. Als „interne“ Kontrolle dienen bei diesem Test die nicht-transmittierten Allele der Eltern, so dass Fehlermöglichkeiten durch eine unpassende Kontrollgruppe ausgeschlossen sind [Spielman et al. 1993]. Der TDT ist ein kombinierter Kopplungs-Assoziationstest. Er detektiert eine Assoziation nur, wenn gleichzeitig Kopplung vorhanden ist. Wenn das untersuchte genetische Merkmal mit der Krankheit weder assoziiert noch gekoppelt ist, erwartet man eine (zufällige) Transmission des Merkmals von 50%. Die berechnete Prüfgröße ist $\chi^2 = (\text{Anzahl der transmittierten Allele} - \text{Anzahl der nicht-transmittierten Allele})^2 / (\text{Anzahl der transmittierten Allele} + \text{Anzahl der nicht-transmittierten Allele})$

Der p-Wert wurde in der vorliegenden Arbeit mit dem exakten Test McNemar berechnet. Ein signifikantes TDT-Ergebnis bedeutet, es liegt Kopplung *und* Assoziation vor. Ist das Ergebnis nicht signifikant, liegt keine Kopplung *oder* keine Assoziation vor.

2.5 Probanden und Kontrollen

Die NRD-Betroffenen wurden von Frau Prof. Dr. M.C. Koch (Marburg), Herrn Dr.A. Ermert (Mainz), Frau Dr.E. Strehl (Erlangen), Frau Dr.E.T.K.M. Piecha (Marburg) und Herrn Dr.N.Kohlschmidt (Mainz) rekrutiert. Zusätzliche DNA-Proben von Feten mit cranialen NRD wurden im Rahmen einer Kooperation von Herrn Prof.Dr.R.H. Finnell (Institute of Biosciences and Technology, Texas, USA) und Frau Dr.V.Capra (Genova, Italien) zur Verfügung gestellt.

Die Betroffenen bzw. ihre Eltern wurden über das Vorhaben der Studie mündlich und schriftlich informiert. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Philipps-Universität Marburg geprüft und anerkannt.

In dieser Studie stand DNA von 196 Betroffenen mit nicht-syndromalen NRD sowie von Elternteilen (n = 245) zur Verfügung. Die NRD wurden in drei phänotypische Kategorien eingeteilt (Tab.1-1): SBA (Spina bifida aperta), Anencephalie (Craniorachischisis oder Anencephalie in Kombination mit SBA) und Encephalocele. Die meisten Betroffenen hatten eine sporadisch aufgetretene SBA.

Die Kontrollgruppe bestand aus 300 gesunden (d.h. ohne NRD) nicht-verwandten Personen deutscher Herkunft. Somit wurden insgesamt 496 Personen in der Studie untersucht.

Tabelle 2-1 Probandenkollektiv

Betroffene (incl. Feten)		196 (incl. 21 Feten)
Phänotyp	SBA	185
	Anencephalie + Craniorachischisis	9
	Encephalocele	2
Auftreten	sporadisch	185
	familiär	11
Familienstruktur	Trios (Vater, Mutter, Kind)	107
	Eltern/Kind Paare	31
	Einzel-Patienten	58
Kontrollen	kein NRD vorhanden	300

SBA = Spina bifida aperta

3 Ergebnisse

3.1 *CART1* (12q21- q22)

Felder B, Stegmann K, Koch MC (2003) SNPs in homeobox transcription factor CART1 in cases with neural tube defects. (eingereicht Hum Genet Mai 2003)

3.1.1 *CART1* als Kandidatengen für NRD

CART1 (*Cartilage homeobox gene 1*) codiert für einen Transkriptionsfaktor, der zur Klasse der *paired* Homeoproteine gehört. Aufgrund seines Expressionsmusters und des Phänotyps der *Cart1* Knock-out Maus gehört *CART1* zu den vielversprechendsten Kandidatengenen für NRD. In der Maus wird *Cart1* im Kopfmesenchym und anderen Abkömmlingen der Neuralleiste exprimiert [Zhao et al. 1996]. Ein intaktes Kopfmesenchyms ist zur Unterstützung der Neurulation im cranialen Bereich besonders wichtig, was auch an anderen Knockout Mäusen (z.B. *Twist*-KO) gezeigt werden konnte [Chen und Behringer 1995]. Die gestörte Entwicklung des Kopfmesenchyms führt bei *Cart1* Knock-out Mäusen zu Fehlbildungen des gesamten Schädelbereichs. Die homozygoten Mutanten entwickeln eine Exencephalie, was dem menschlichen Phänotyp der Anencephalie entspricht. Außerdem wurde festgestellt, dass die Schädelfehlbildungen der Knock-out Maus durch pränatale Folsäuregaben bei etwa 76% der Nachkommen verhindert werden können [Zhao et al. 1996]. Dies deutet auf einen Wirkungsmechanismus hin, der der Entstehung von NRD beim Menschen möglicherweise sehr nahe kommt. Da *CART1* aus diesem Grund als eines der wichtigsten Kandidatengene für folsäurepräventierbare NRD gilt, wurde es für die Untersuchung in der vorliegenden Arbeit ausgewählt.

3.1.2 *CART1* in der Datenbank

Um im Mutationsscreen möglichst viele relevante Bereiche (offener Leserahmen, Spleißstellen, eventuell Promotorsequenzen) erfassen zu können, muss der strukturelle Aufbau des Gens bekannt sein. In der GenBank Datenbank waren aber nur die cDNA Sequenzen von Mensch (NM_006982, [Gordon et al. 1996] und Ratte (NM_012921, Zhao et al. 1993) vorhanden. Um einen Anhaltspunkt für die genomische Struktur des Gens zu erhalten, wurde nach einer genomischen Sequenz einer anderen Spezies (z.B. Maus) gesucht. Da aus der Veröffentlichung der *Cart1* Knock-out Maus [Zhao et al. 1996] hervorgeht, dass *Cart1* der Maus mehrere Exons enthält, wurde zu Beginn dieser Arbeit davon ausgegangen, dass die

genomische Sequenz der Maus bekannt ist. In der Veröffentlichung von [Zhao et al. 1996] wurde aber keine Referenzsequenz des murinen *Cart1* angegeben. Genomische Sequenzen oder ein genomischer Klon waren auch auf Anfrage nicht zu bekommen (de Crombrugge, pers. Information 2000).

In den gängigen Datenbanken wurde daher nach genomischen Sequenzdaten der Maus gesucht, um einen Anhaltspunkt für die Positionen der potentiellen Introns beim Menschen zu erhalten. Zu diesem Zeitpunkt waren jedoch nur überlappende ESTs vorhanden, mit denen die cDNA Sequenz von *Cart1* rekonstruiert werden konnte. Es zeigte sich, dass die cDNAs von Mensch, Maus und Ratte evolutionär sehr stark konserviert sind (Abb. 3-1).

```

1
hCART1 MEFLSEKFAKSPPSKNSDFYMGAGGP--LEHVMETLDNESFYKASAGKCVQAFGPLP-----RAEHHVR
mCart1 MEFLSEKFAKSPPSKNSDFYMGAGGP--LEHVMETLDNESFYKATAGKCVQAFGPLP-----RAEHHVR
rCart1 MEFLSEKFAKSPPSKNSDFYMGAGGP--LEHVMETLDNESFYKATAGKCVQAFGPLP-----RAEHHVR
xCart1 MDFLTDKFLSKNQPSKAGDEFMAGGAGTLEHVMDSDMTESFYKSPAVVAAAAGASKCVQGGFSAIHRAEHHVR

65                                     ?
hCART1 LERTSPCQDSSVNYGITKVEGQPLHTELNRAMDNCNLSLRMSPVKGMQEKGEDELGDKCDSNVSSSKKRRHRTTF
mCart1 LDRTSPCQDSSVNYGITKVEGQPLHTELNRAMDNCNLRMSPVKGMPEKSELDELGDKCDSNVSSSKKRRHRTTF
rCart1 LDRTSPCQDSSVNYGITKVEGQPLHTELNRAMDNCNLRMSPVKGMPEKSELDELGDKCDSNVSSSKKRRHRTTF
xCart1 MERASPCQENNANYGLAKVEGQTVHTELGSRSMDTCCSLAVSPGKSMADKVELDELGDKCDSNVSSSKKRRHRTTF

140
hCART1 TSLQLEELEKVFQKTHYPDVYVREQLALRTELTEARVQVWFQNRRAKWRKRERYGQIQAKSHFAATYDISVLPR
mCart1 TSLQLEELEKVFQKTHYPDVYVREQLALRTELTEARVQVWFQNRRAKWRKRERYGQIQAKSHFAATYDISVLPR
rCart1 TSLQLEELEKVFQKTHYPDVYVREQLALRTELTEARVQVWFQNRRAKWRKRERYGQIQAKSHFAATYDISVLPR
xCart1 TSLQLEELEKVFQKTHYPDVYVREQLALRTELTEARVQVWFQNRRAKWRKRERYGQIQAKSHFAATYDISVLPR

215
hCART1 TDSYPQIQNNLWAGNASGGSVVTSCLMPRDTSSCMTPTYSHSPRTDSSYTGFSNHQNFQSHVPLNFFTDSELLTGA
mCart1 TDSYPQIQNNLWAGNASGGSVVTSCLMPRDTSSCMTPTYSHSPRTDSSYTGFSNHQNFQSHVPLNFFTDSELLTGA
rCart1 TDSYPQIQNNLWAGNPSGGSVVTSCLMPRDTSSCMTPTYSHSPRTDSSYTGFSNHQNFQSHVPLNFFTDSELLTGT
xCart1 ADSYPQIQNNLWAGNPSGGSVVTSCLMPREPSSCMTPTYSHSPRTDSSYTGFTNHQNFQSHMPLNIFFTESLLSGLS

290
hCART1 TNGHAFETKPEFERRSSSI AVLRMKAKEHTANISWAM
mCart1 TNGHAFETKPEFERRSSSI AVLRMKAKEHTANISWAM
rCart1 TNGHAFETKPEFERRSSSI AVLRMKAKEHTANISWAM
xCart1 ANGHSPFAKPEFERRSSSI AVLRMKAKEHTANISWAM

```

Abbildung 3-1 Homologe *Cart1* Proteine bei Vertebraten

Alignment der homologen *Cart1* AS-Sequenzen von Mensch (NP_008913), Maus (XP_125879), Ratte (NP_037053) und *Xenopus* (U15276)). Die Maus-Sequenz (Nukleotidsequenz BC010923) ist unter der Bezeichnung „similar to *Cart-1*“ erst seit November 2002 in der GenBank Datenbank.

Die Aminosäuresequenz von *Cart1* ist innerhalb der Vertebraten sehr stark konserviert. Alle Abweichung von der Konsensus-Sequenz befinden sich außerhalb der **Homeodomäne** (Fettdruck) und auch außerhalb der aristaless-Domäne (auch als OAR-Domäne bezeichnet, Fettdruck+ Kursiv dargestellt), die für *paired-class* Transkriptionsfaktoren typisch ist.

Die Aminosäure an Position 125 des humanen Proteins wurde aufgrund eigener Sequenzierungsergebnisse von Threonin (lt. NP_008913) zu Serin korrigiert (?). Sie unterscheidet sich demnach an dieser Stelle nicht von den AS-Sequenzen von Maus, Ratte und *Xenopus*.

Durch die Datenbankrecherche stellte sich heraus, dass eine in der Datenbank (fälschlicherweise) als „*Cart1*“ bezeichnete Sequenz der Maus vorhanden ist, die für ein Zinkfingerprotein codiert (*Traf4*). Unter dem Suchbegriff „*Cart*“ war zudem ein weiteres Gen (*CART*: Cocaine- and amphetamine-regulated transcript) bei Mensch und Maus zu finden (Tab. 3-1). Die begriffliche Verwirrung durch die vielfältige Verwendung der Bezeichnung „*Cart*“ ist besonders problematisch, da keine Referenz-Sequenz zu der veröffentlichten *Cart1* Knock-out Maus existiert. Letztendlich kann dadurch nicht nachvollzogen werden, um welches Gen es sich bei dem Knock-out tatsächlich handelt.

Tabelle 3-1 Verschiedene mit „*Cart*“ abgekürzte Gene (cDNAs) in der Datenbank

Mensch	Maus	Ratte	Gen
<i>CART1</i> (12q) NM_006982	similar to <i>Cart1</i> (Chr.10) BC010923	<i>Cart1</i> NM_012921	cartilage paired-class homeoprotein 1
<i>CART (TRAF4)</i> (17q) NM_004295	<i>Cart (Traf4)</i> (Chr.11) NM_009423	—	TNF receptor-associated factor
<i>CART</i> (5q)	<i>Cart-pending</i> (Chr.13)	<i>Cart</i>	Cocaine- and amphetamine- regulated transcript

3.1.3 Experimentelle Ermittlung der genomischen Organisation von *CART1*

Da nur die cDNA Sequenz von *CART1* vorhanden war (NM_006982), der Mutationscreen jedoch auch die Spleißstellen beinhalten sollte, wurde die genomische Struktur des Gens experimentell ermittelt. Für die PCR/SSC Analyse wurde die gesamte cDNA-Sequenz von *CART1* durch überlappende PCR-Produkte abgedeckt. Dabei traten drei PCR-Produkte auf, die erheblich größer waren, als aufgrund der cDNA Sequenz zu erwarten war (Primerpaare i-5f/i-5r, i-13f/i-13r und i-8f/i-11r). Daraus wurde geschlossen, dass sich im Bereich dieser PCR-Produkte Introns befanden. Um die genaue Position der Exon-Intron-Übergänge definieren zu können, sollten die PCR-Produkte kloniert und sequenziert werden.

3.1.3.1 Intron-überspannende PCR (Intron 1 und 2)

Zunächst wurden die PCR-Reaktionen für die Amplifikation längerer Produkte (> 3 kb) angepasst, um Fragmente ohne unspezifische Nebenprodukte zu erhalten. Der letzte Syntheseschritt wurde auf 15 min verlängert, um in voller Länge synthetisierte Fragmente zu gewährleisten. Zwei der PCR-Reaktionen (Primerpaare i-13f/i-13r und i-5f/i-5r) ergaben Produkte im Größenbereich von ca. 3,2 kb (Abb. 3-2).

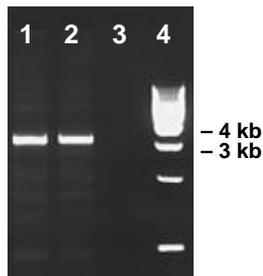


Abbildung 3-2 Intron-überspannende PCR

Spur 1: Primerpaar i-13f+ i-13r (Intron 1)
 Spur 2: Primerpaar i-5f+i-5r (Intron 2)
 Spur 3: Negativ-Kontrolle ohne DNA
 Spur 4: 1 kb DNA-Marker

3.1.3.2 Klonierung und Sequenzierung der PCR-Produkte

Beide PCR-Produkte wurden ungerichtet in pCR2.1 kloniert (TOPO TA Cloning Kit) und mit M13 Oligonukleotiden von beiden Seiten des Vektors sequenziert. Jeweils 3 Klone aus mehreren PCR-Reaktionen wurden für jedes der beiden intron-überspannenden Produkte sequenziert. Als korrekt wurde ein Exon-Intron Übergang erachtet, wenn die Konsensus-Sequenzen gt-ag am 5'-Ende bzw. 3'-Ende des potentiellen Introns vorhanden waren und keine Leserasterverschiebung auf Aminosäureebene entstand. Dies traf für die sequenzierten Übergangsstellen von Intron 1 (~ 3,1 kb) und Intron 2 (~ 3 kb) zu. Das Elektropherogramm einer Sequenzierung von Exon 1/Intron1 ist in Abb.3-3 beispielhaft dargestellt.

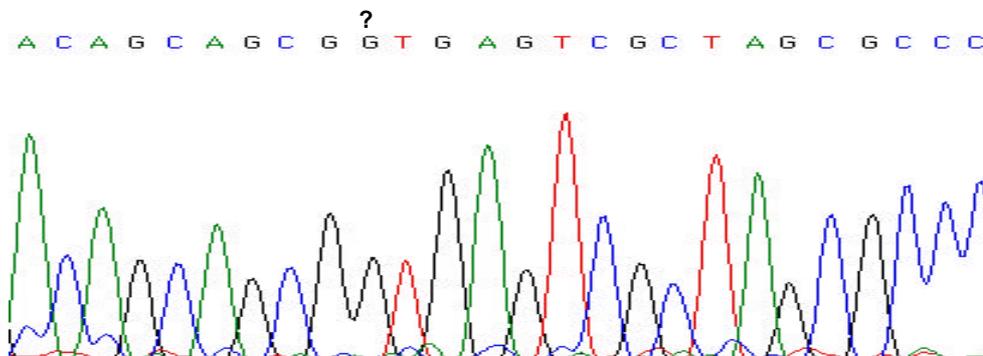


Abbildung 3-3 Übergang von Exon 1 zu Intron 1

Sequenzierung des klonierten PCR-Produkts (Primerpaar i-13f/i-13r), das den Übergang von Exon1 zu Intron 1 enthält. Die Sequenzierung wurde mit Vektorprimern (M13 forward und reverse) durchgeführt. Der Beginn von Intron 1 ist mit Pfeil (?) markiert.

3.1.3.3 Intron-überspannende PCR (Intron 3)

Das dritte PCR-Produkt (Primerpaar i-8f/i-11r, ~ 3 kb), das die Sequenz des potentiellen Introns 3 beinhalten sollte, wurde ebenfalls in pCR2.1 kloniert. Die Sequenzierung des Plasmids ergab jedoch keine Übereinstimmung mit den geforderten Konsensus-Sequenzen gt-ag. Außerdem enthielten die drei sequenzierten Klone unterschiedliche Sequenzen, die bei einer Datenbanksuche (BLAST) keinerlei Ähnlichkeit zu anderen bekannten Sequenzen aufwiesen. Um auszuschließen, dass es sich um eine unspezifische PCR-Reaktion handelte, wurde dieselbe Stelle mit einem weiteren PCR-Produkt abgedeckt. Obwohl dabei ein Fragment der gleichen Größe (~ 3 kb) entstand, konnte anhand einer weiteren Sequenzierung festgestellt werden, dass es sich bei der klonierten Sequenz nicht um *CART1* handelte. Auch hier ergab die Datenbanksuche keine Übereinstimmung mit anderen bekannten Sequenzen. Somit konnten die Grenzen von Intron 3 nicht durch die Methode der intron-überspannenden PCR bestimmt werden.

3.1.3.4 Lokalisation von *CART1* auf Chromosom 12

Da die PCR im Bereich des potentiellen Introns 3 keine *CART1*-spezifischen Fragmente ergab, sollte geprüft werden, ob die verwendeten Oligonukleotide mögliche weitere, bekannte oder unbekannte Mitglieder einer möglichen *CART1*-Genfamilie amplifizieren. Nahe verwandte, strukturell sehr ähnliche Gene (*ALX3*, *ALX4*) sind in Abbildung 3-4 aufgeführt.

```

142
CART1  KRRRHRTTFTSLQLEELEKVFQKTHYPDVYVREQLALRTELTEARVQVWFQNRRAKWRKRERYGQIQQAKSHFAA
ALX4   KRRRNRTTFTSYQLEELEKVFQKTHYPDVYAREQLAMRTDLTEARVQVWFQNRRAKWRKRERFGQMQQVTRTFST
ALX3   KRRRNRTTFTSTFQLEELEKVFQKTHYPDVYAREQLALRDLTEARVQVWFQNRRAKWRKRERYGKIQEGRNPTTA

217
CART1  TYDISVLPRTDSTYPQIQNNLWAGNASGGSVVTSCMLPRDTS-SCMTPYSHSPTDSS----YTGFNSHQNQFSHV
ALX4   AYELPLLTRAENYAQIQNPSWLGNGAASPVPACVVECDVPACMSPHAHPPGSGASSVTDFLSVSGAGSHVGQT
ALX3   AYDISVLPRTDSTHPQLQNSLWAGPGSGSPGGCLVSEEGIPSPCMSPYSHPHGSVAG-----F----MGVPAPSA

292
CART1  PLNNFPTDSLITGATNGHAFETKPEFERRSSSIAVLRMKAKEHTANISWAM
ALX4   HMGSLFGAASLSPGLNG--YELNGEPDRKTSIIAALRMKAKEHSAALSWAT
ALX3   AHPGIYSIHGFPPTLGGHSFEPSSDGDYKSPSLVSLRVKPKPPGLLNWTT

```

Abbildung 3-4 AS-Sequenzen der *CART1*-Familie

Alignment der AS-Sequenzen von *CART1* (NP_008913), *ALX3* (NP_006483) und *ALX4* (NP_068745) (die AS-Sequenz ist erst ab der Homeodomäne aufgeführt, da die Ähnlichkeit in stromaufwärts gelegenen Bereichen nur gering ist).

Die im Bereich der Homeodomäne sehr hohe Konservierung (auch auf Nukleotidebene) zwischen den einzelnen Mitgliedern der Genfamilie wurde bei der Anwendung von PCR-Methoden berücksichtigt. Bei der Auswahl der Oligonukleotide wurde (wenn möglich) darauf geachtet, dass besonders das 3'-Ende der Oligos auf einem für *CART1* spezifischen Sequenzabschnitt lag, um Amplifikation falscher Produkte zu vermeiden. Trotzdem konnte eine möglicherweise unspezifische Amplifikation nicht ausgeschlossen werden. Durch die Verwendung des Chromosomenpanels sollte die Spezifität der Oligos und die Lokalisation von *CART1* auf Chromosom 12 [Gordon et al. 1996] überprüft werden. Weder *ALX3*, *ALX4* noch andere bekannte, *CART1* nahe verwandte Gene lokalisieren auf Chromosom 12.

Für die Lokalisation wurde ein Chromosomenpanel benutzt, dessen Mensch/Nagetier-Hybrid DNA als PCR-Ausgangsmaterial verwendet wurde. Zwei PCR-Reaktionen wurden mit der DNA des Chromosomenpanels durchgeführt: Primerpaare 1f/1r (5'-UTR+ Exon 1) und 16f/12r-2 (putatives Exon 4+ 3'-UTR). Da besonders die 3'-UTR einen wenig konservierten Bereich des Gens darstellt, sollte 16f/12r-2 spezifisch auf Chromosom 12 lokalisieren.

Das Primerpaar in Exon 1 ergab ein spezifisches Produkt (139 bp) bei Chromosom 12 (Abb. 3-5). Die Kontrollreaktion mit humaner Gesamt-DNA zeigte ebenfalls das erwartete Fragment, während bei Maus- und Hamster-DNA kein Fragment amplifiziert wurde.



Abbildung 3-5 Chromosomenpanelscreen mit Primerpaar 1f/1r (Exon 1)

PCR-Reaktion mit Primerpaar 1f/1r (Exon 1). Ein deutliches Fragment der passenden Größe (139 bp) wurde aus Chromosom 12 amplifiziert.

A: Kontroll-DNA Mensch

B: Kontroll-DNA Maus

C: Kontroll-DNA Hamster

M: 100 bp Marker

Spuren 1- 15: Chromosomen 1-15.

Die Ergebnisse der PCR-Reaktionen aus den Chromosomen 16 bis 22, X und Y (in denen keine weiteren Fragmente auftraten) sind nicht dargestellt.

Das im putativen Exon 4 gelegene Primerpaar amplifizierte dagegen neben dem erwarteten Fragment (167 bp, Chromosom 12) noch weitere Fragmente (Abb. 3-6). Aus DNA von Chromosom 1 wurde ein deutliches Fragment der gleichen Größe amplifiziert. Allerdings trat dieses Fragment auch in der Kontrollreaktion mit Maus-DNA auf. Somit konnte nicht geklärt werden, ob auf Chromosom 1 des Menschen ein weiterer Transkriptionsfaktor der *CART1* Genfamilie lag, oder ob es sich um unspezifische Amplifikationsprodukte aus der Maus-DNA handelte. *Cart1* der Maus liegt allerdings, wie inzwischen bekannt ist, auf Chromosom 10.

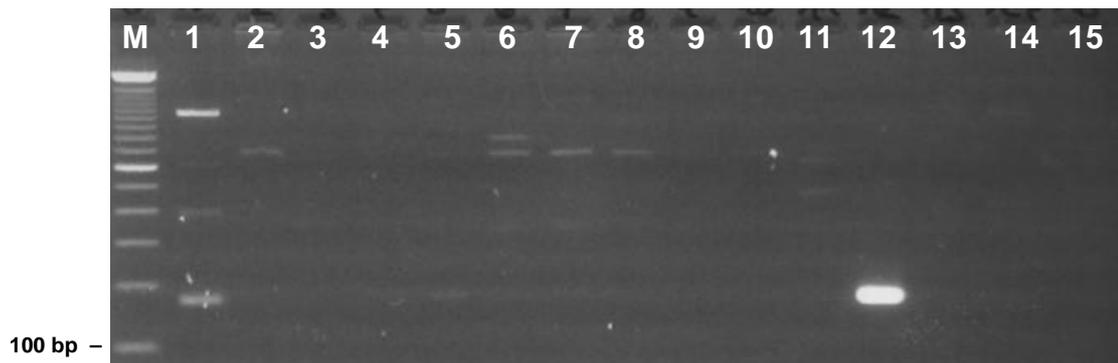


Abbildung 3-6 Chromosomenpanelscreen mit Primerpaar 16f/12r-2 (Exon 4)

PCR-Reaktion mit Primerpaar 16f / 12r-2 (Exon 4). Ein deutliches Fragment der passenden Größe (167 bp) wurde aus Chromosom 12 amplifiziert. Die zusätzlichen Fragmente, die in der PCR-Amplifikation von Chromosom 1 auftraten, waren ebenfalls in der Kontroll-Reaktion mit Maus-DNA sichtbar (nicht dargestellt).

M: 100 bp Marker

Spuren 1-15: Chromosomen 1-15

3.1.3.5 Datenbankrecherche

Die HTGS-Abteilung (High Throughput Genomic Sequences) der GenBank enthält Sequenzen, die im Zuge der Sequenzierung des gesamten humanen Genoms in „high-throughput-sequencing“ Projekten produziert werden. Da die Einträge vorläufigen Charakter haben und häufig erneuert werden, wurde die HTGS-Sektion regelmäßig auf vorhandene *CART1*-Sequenzen durchsucht. Im August 2000 wurde ein humanes genomisches Contig (AC053514, BAC Klon Sequenzierung) in die Datenbank gestellt, das den 3' Bereich von *CART1* (Exon 4 + 3'UTR) bis zur potentiellen Position des Introns 3 enthielt (Abb. 3-7). Da damit die Position des Introns in der cDNA Sequenz festgelegt war, konnten auch die Größen von Exon 3 (129 bp) und Exon 4 (627 bp) bestimmt werden. Der 7,7 kb lange 5'-Bereich der BAC-Klon Sequenz enthielt jedoch keinen Übergang in Bereiche des 3. Exons. Die Vermutung lag daher nahe, dass es sich bei dem entsprechenden Bereich um einen Teil des 3. Introns handelte. Intron 3 schien damit erheblich länger (über 7,7 kb) zu sein als Intron 1 und 2.

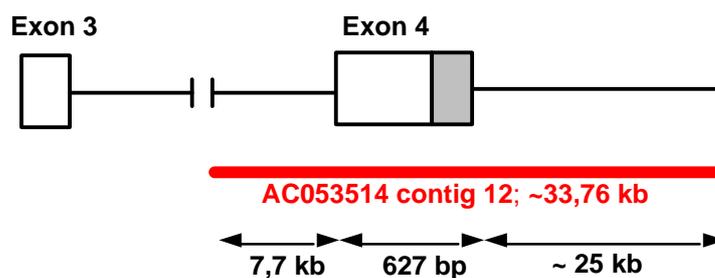


Abbildung 3-7 Vergleich der *CART1* cDNA mit einem genomischen BAC-Klon

3' Bereich von *CART1*; der 627 bp umfassende Bereich des Contigs 12 stimmt zu 100% mit dem entsprechenden Bereich der *CART1* cDNA-Sequenz (NM_006982) überein. Die weiter stromaufwärts gelegene Sequenz enthält 7,7 kb von Intron 3.

3.1.3.6 Nachweis von *CART1* im Southern Blot

Um einen Anhaltspunkt für die Größe des 3. Introns zu erhalten und um den entsprechenden Bereich (Intron 3) zu klonieren, wurde ein Southern Blot mit genomischer DNA durchgeführt. Als Sonde wurde die von Dr. H. Eberspächer (University of Texas, USA) freundlicherweise zur Verfügung gestellte full-length *Cart1* cDNA der Ratte (1,7 kb) benutzt. Zur Etablierung der Bedingungen wurde genomische DNA aus Rattenleber isoliert und mit verschiedenen Restriktionsenzymen behandelt. Genomische DNA von Kontrollpersonen wurde unter gleichen Bedingungen gespalten. Die Auswahl der verwendeten Restriktionsenzyme (*EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, *PstI*) war am Vorhandensein der entsprechenden Schnittstellen in pBluescript®KS orientiert, da die Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten und in den Vektor kloniert werden sollten.

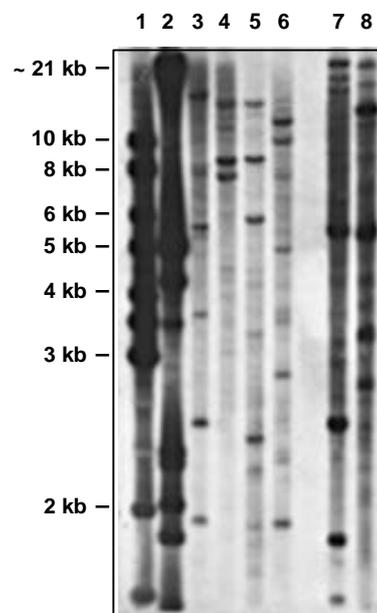


Abbildung 3-8 Autoradiogramm Southern Blot mit heterologer Sonde (*Cart1* cDNA der Ratte)

Autoradiogramm des Southern Blots mit genomischer DNA von Mensch und Ratte. Als Sonde diente *Cart1* cDNA der Ratte (1,7 kb). Durch die cDNA-Sonde werden alle Exons von *CART1* nachgewiesen. Die Hybridisierung erfolgte bei 60°C. Der Waschschrift wurde 5 min mit 2 x Waschlösung durchgeführt (niedrige Stringenz).

Da keine genomischen Sequenzen von Mensch und Ratte zur Verfügung standen, konnte keine Vorhersage für die zu erwartenden Fragmentgrößen getroffen werden.

Spur 1: 10 kb DNA-Leiter

Spur 2: ?-DNA, *EcoRI* / *HindIII* gespalten

Spur 3: genomische DNA (Mensch), *BamHI*

Spur 4: genomische DNA (Mensch), *HindIII*

Spur 5: genomische DNA (Mensch), *PstI*

Spur 6: genomische DNA (Mensch), *EcoRI*

Spur 7: genomische DNA (Ratte), *EcoRI*

Spur 8: genomische DNA (Ratte), *HindIII*

Die mit Restriktionsenzymen gesplante DNA von Mensch und Ratte wurde in einem Agarose-Gel aufgetrennt und durch Southern Blotting auf eine Nylonmembran übertragen. Nach Hybridisierung mit der radioaktiv (^{32}P) markierten Sonde (*Cart1* cDNA der Ratte) und anschließendem Waschen der Membran unter nicht-stringenten Bedingungen (2 x Waschlösung) erfolgte die Exposition auf Röntgenfilm (Abb. 3-8). Wie erwartet zeigte das Autoradiogramm multiple Fragmente pro Restriktionsansatz, da die Sonde Fragmente aus allen vorhandenen Exons nachweist. Die meisten der nachgewiesenen Fragmente waren in einem Größenbereich von über 3 kb.

Da durch die Verwendung der heterologen Sonde nicht ausgeschlossen werden konnte, dass Fragmente anderer *CART1*-ähnlicher Homeoboxgene detektiert wurden, wurde dieselbe Nylonmembran mit einer homologen Sonde hybridisiert (Abb. 3-9). Dazu diente ein 720 bp langes PCR-Produkt, das sowohl Teile der 3'UTR von *CART1* als auch weiter stromabwärts gelegene Bereiche der BAC-Klon Sequenz (AC053514) umfasste. Damit sollte sichergestellt sein, dass die Sonde (pro Restriktionsspaltung) nur *ein* spezifisches Fragment aus dem 3' Bereich des Gens detektiert.

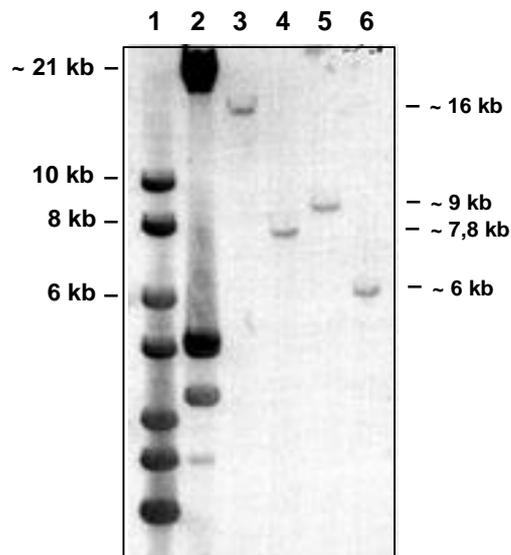


Abbildung 3-9 **Autoradiogramm Southern Blot mit homologer Sonde
(PCR-Produkt 3'UTR 2f/2r)**

Southern Blot mit genomischer DNA des Menschen. Als Sonde wurde eine homologe 720 bp PCR-Sonde (Primerpaar 3'UTR 2f/2r) verwendet.

Spur 1: 10 kb DNA-Leiter;

Spur 2: ?-DNA, *EcoRI* / *HindIII* gespalten

Spur 3: genomische DNA (Mensch), *BamHI*

Spur 4: genomische DNA (Mensch), *HindIII*

Spur 5: genomische DNA (Mensch), *PstI*

Spur 6: genomische DNA (Mensch), *EcoRI*

Die stringente Hybridisierung (65°C) mit dieser homologen Sonde ergab keine Signale auf der Ratten-DNA und jeweils ein spezifisches Fragment auf der menschlichen DNA. Die Größe der Fragmente lag je nach Restriktionsspaltung bei 6 – 16 kb. Die Fragmente wurden aus einem weiteren Gel ausgeschnitten und aufgereinigt. Eine Ligation der Fragmente mit einem Standard-Vektor (pBluescript®KS+) wurde mehrmals mit unterschiedlichem Vektor-Insert Verhältnis versucht, führte aber nicht zum Erfolg. Die Fragmentgrößen lagen mit > 6 kb offenbar über der Aufnahmekapazität des Vektors. Da nicht geklärt war, ob die mit der Sonde detektierten Fragmente den Übergang von Exon 3 zu Intron 3 enthielten, wurde ein Schneiden der DNA mit weiteren Restriktionsenzymen (um kleinere Fragmente zu erhalten) verworfen. Für den Übergang von Intron 3 zu Exon 4 lagen durch den vorhandenen BAC-Klon (AC053514) schon Hinweise vor. Da Sequenzdaten aus der Datenbank jedoch nicht immer zuverlässig sind, sollte der Exon-Intron Übergang zusätzlich durch eigene Sequenzierungen verifiziert werden. Für diese Verifizierung und um die Spleißregion im Übergang von Exon 3 zu Intron 3 zu erhalten, wurde daher eine direkte Sequenzierung eines genomischen Klons als sinnvoll erachtet. Die Verwendung eines Klons bringt gegenüber gesamtgenomischer DNA außerdem den Vorteil, dass keine unerwünschte unspezifische Amplifikation anderer, ähnlicher Gene stattfindet, sofern sie nicht ebenfalls im Klon vorhanden sind. Da die bisher bekannten Mitglieder der *CART1*-Genfamilie nicht auf demselben Chromosom liegen, wurde diese Wahrscheinlichkeit als gering erachtet.

3.1.3.7 Isolierung eines genomischen *CART1* PAC Klons

Um einen genomischen Klon des menschlichen *CART1* Gens zu erhalten, wurde das Screening einer humanen PAC-Bank (RPC11,3-5 Human PAC, no. 704) im Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD) in Auftrag gegeben. Als Sonde wurde die homologe 720 bp PCR-Produkt Sonde verwendet (Primerpaar 3'UTR 2f/2r), da sie im Southern Blot ein hochspezifisches Ergebnis gezeigt hatte (Abb. 3-9) und da vorrangig der 3' Bereich von *CART1* detektiert werden sollte. Das Screening ergab 9 positive Klone (Tab. 3-2), die dann beim Ressourcenzentrum bestellt wurden. Mittels PCR (*E.coli* Übernächtkultur als Ausgangsmaterial) wurde getestet, ob in der PAC-DNA *CART1*-spezifische Sequenzen vorhanden waren (Abb. 3-10). Bei einem Klon (H031123) waren PCR-Reaktionen in allen Exons erfolgreich (Abb. 3-11). Der Klon enthält demnach das gesamte Gen, sofern keine Rearrangements aufgetreten sind. Bei der Präparation des PAC-Klons wurde auf besonders hohe Qualität der DNA geachtet, um reproduzierbare Ergebnisse bei der anschließenden Direktsequenzierung zu erhalten. Die DNA wurde bei der Präparation mit Exonuklease behandelt, um Kontaminationen genomischer DNA aus *E.coli* auszuschließen.

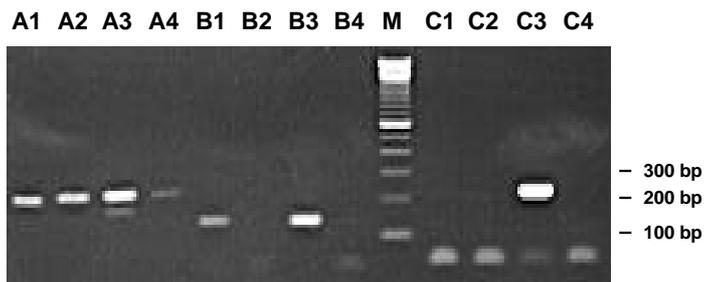


Abbildung 3-10 PCR-Test auf Vorhandensein von *CART1* Sequenzen in ausgewählten PAC-Klonen

PCR-Reaktionen zur Überprüfung auf *CART1*-spezifische Sequenzen am Beispiel von 4 ausgewählten Klonen. Da die Präparation von PAC-DNA aufwendig ist, wurde zunächst anhand einer PCR-Reaktion überprüft, ob die Klone Bereiche von *CART1* enthielten. Dazu wurden je 20 µl einer *E.coli* Übernachtskultur der Klone denaturiert und als Ausgangsmaterial für PCR-Reaktionen in Exon 1, 2 und im putativen Exon 4 eingesetzt.

M: 100 bp-Marker

PCR A: PCR-Produkt aus Exon 4, Primerpaar 10f / 11r (**211 bp**)

PCR B: PCR-Produkt aus Exon 2, Primerpaar 3f / 4r (**156 bp**)

PCR C: PCR-Produkt aus Exon 1, Primerpaar 2f / 2.1r (**225 bp**)

1: PAC-Klon O06211

2: PAC-Klon J24261

3: PAC-Klon H031123

4: PAC-Klon K20154

Tabelle 3-2 Genomische Klone des RZPD-Screenings (*CART1*-Sonde)

Klon	RZPD-Identifikationsnummer	Vektor	Exon 1	Exon 2	Exon 4
H031123	RPCIP704H031123Q2	pCYPAC2	+	+	+
D15164	RPCIP704D15164Q12	pCYPAC2	-	-	-
O06211	RPCIP704O06211Q12	pCYPAC2	-	+	+
H03190	RPCIP704H03190Q12	pCYPAC2	-	-	-
B14309	RPCIP704B14309Q12	pCYPAC2	-	-	-
K20154	RPCIP704K20154Q12	pCYPAC2	-	-	+
A13883	RPCIP704A13883Q2	pCYPAC2	-	-	-
P11634	RPCIP704P11634Q2	pCYPAC2	-	-	-
J24261	RPCIP704J24261Q12	pCYPAC2	-	-	+

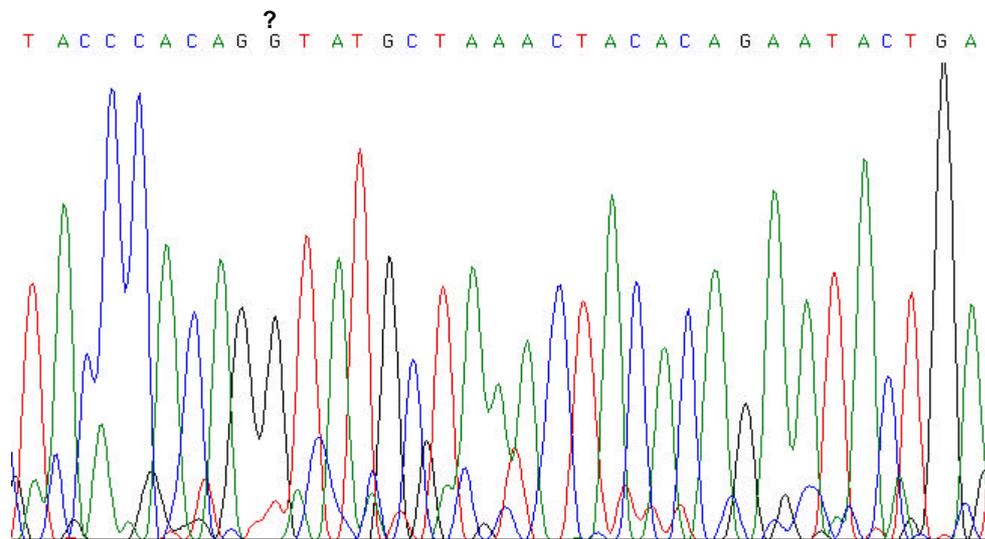
Genomische PAC-Klone, die ein positives Signal mit PCR-Sonde 3'UTR 2f/2r ergaben.

Die Test-PCRs, die im entsprechenden Exon ein korrektes Fragment zeigten, sind mit + gekennzeichnet. Da als Ausgangsmaterial für die Test-PCRs *E.coli* Übernachtskultur eingesetzt wurde, in der aufgrund der geringen Kopienzahl der PAC-Vektoren nur wenig Ziel-DNA vorhanden ist, schließen die negativen PCR Ergebnisse das Vorhandensein von *CART1* in den entsprechenden Klonen nicht aus.

3.1.3.8 Direkte Sequenzierung des PAC-Klons H031123 mit genspezifischen Primern

Nachdem PCR-Reaktionen mit genspezifischen Oligos gezeigt hatten, dass PAC-Klon H031123 alle Exons von *CART1* enthält, wurden die Exon-Intron Übergänge durch direkte Sequenzierung des Klons bestimmt. Als Primer wurden verschiedene *CART1*-spezifische Oligos verwendet. Die besten Resultate wurden mit Primern erzielt, die sich mindestens 35 bp vor bzw. hinter der Intronregion befanden (i-8f als Vorwärtsprimer und i-11r als Rückwärtsprimer). Pro Sequenzierung wurden 200 ng der aufgereinigten PAC-DNA eingesetzt. Bei einer erfolgreichen Reaktion konnten durchschnittlich 500 bp gelesen werden.

A



B

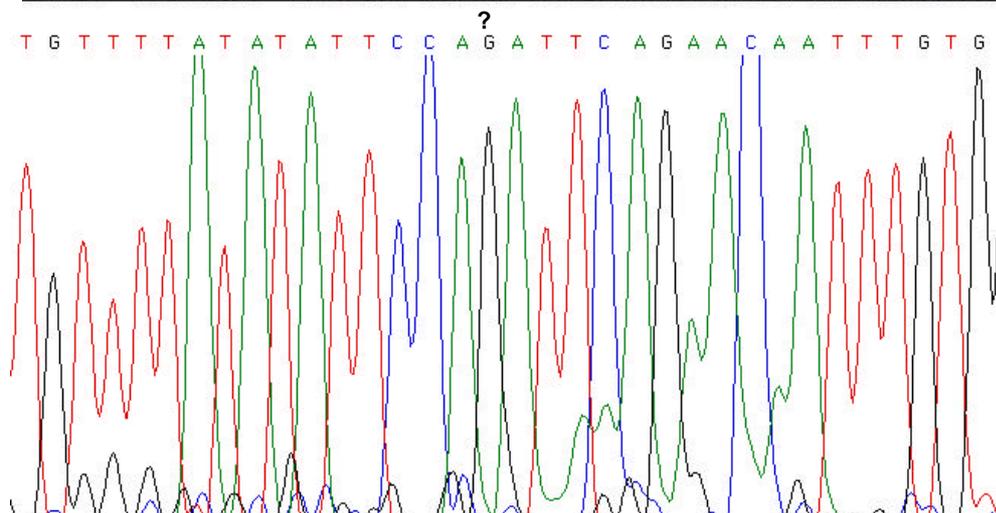


Abbildung 3-11 Direkte Sequenzierung des PAC-Klons H031123

A: Sequenzierung mit Vorwärts Primer i-8f (Beginn Intron 3)

B: Sequenzierung mit Rückwärts Primer i-11r (Ende Intron 3)

Beide Sequenzen sind in 5' – 3' Richtung angegeben. Pfeile (?) markieren den Beginn bzw. das Ende von Intron 3.

Die Auswertung der Direktsequenzierungen zeigte, dass die Position von Intron 3 an derselben Stelle lag, die aufgrund der BAC-Sequenz aus der Datenbank (AC053514) vermutet worden war. Sowohl der Beginn als auch das Ende von Intron 3 enthielt die geforderten Konsensussequenzen der Spleißregion (gt-ag), und es fand keine Rasterverschiebung auf Aminosäureebene statt. Aufgrund der Länge des Introns von über 7,7 kb wurde der PAC-Klon in beiden Richtungen nur ansequenziert (ca. 300 bp), um Sequenzinformation für Oligos zu erhalten, die für den Mutationsscreen verwendet werden sollten.

Um die Ergebnisse der intron-überspannenden PCR (Intron 1 und 2) zu überprüfen, die mit gesamtgenomischer DNA durchgeführt worden war, wurden beide PCR-Reaktionen (Intron 1 und 2) auch mit DNA des PAC-Klons durchgeführt. Die anschließende Sequenzierung ergab keine Abweichungen von den aus genomischer DNA erhaltenen Sequenzen. Die Ergebnisse der PAC-Klon Sequenzierung wurden in der EMBL Datenbank abgelegt (Exon-Intron-Übergänge 1 und 2: AJ558236; Übergang Intron 3: AJ558237).

3.1.3.9 Genomische Struktur von *CART1*

Nachdem durch die intron-überspannende PCR (Intron 1 und 2) und die Direktsequenzierung des PAC-Klons H031123 (Intron 3) alle Exon-Intron-Übergänge sequenziert waren, war die genomische Organisation des Gens aufgeklärt (Abb. 3-12). *CART1* besteht aus 4 Exons und 3 Introns, die sich über einen Bereich von ca. 21 kb erstrecken. Intron 1 und 2 sind mit ca. 3 kb wesentlich kleiner als das dritte Intron (> 14 kb).

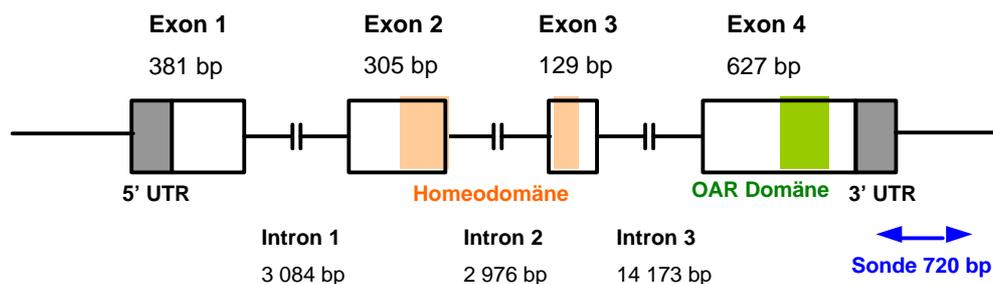


Abbildung 3-12 Genomische Organisation von *CART1* des Menschen

Exon 1: 381 bp (155 bp 5'UTR+ 226 bp)

Exon 2: 305 bp

Exon 3: 129 bp

Exon 4: 627 bp (321 + 306 bp 3'UTR)

cDNA: 1442 bp, 326 AS

Die Oligonukleotide für die beim PAC-Bankenscreen verwendete Sonde (PCR-Produkt, Primerpaar 3'UTR 2f/2r) wurden auf die Sequenz von AC053514 (siehe Abb. 3-13) gelegt. Das PCR-Produkt umfasst einen Teil der 3' UTR von *CART1* und weiter stromabwärts gelegene Bereiche.

3.1.3.10 Datenbankanalyse zur Identifizierung genregulatorischer Bereiche

Seit April 2003 ist in GenBank die Sequenz eines humanen genomischen Contigs von Chromosom 12 (NT_019546) zugänglich, die die gesamte genomische Sequenz von *CART1* einschließlich aller drei Introns und weiter 5' stromaufwärts gelegener Regionen enthält (Abb. 3-13). Dieser Bereich wurde mit Hilfe von Datenbank-Suchalgorithmen auf potentiell regulatorische Abschnitte untersucht.

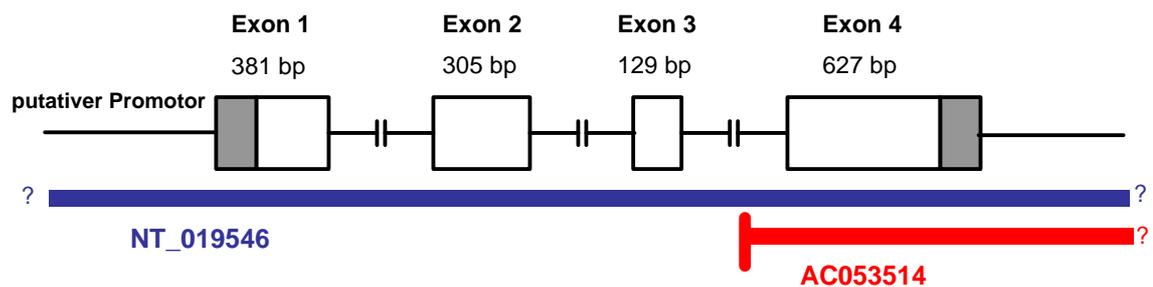


Abbildung 3-13 **Übereinstimmende Bereiche genomischer Sequenzen aus der Datenbank mit *CART1***

GenBank Acc.No.NT_019546, seit April 2003 in GenBank
 GenBank Acc.No.AC053514, (Contig 12) seit August 2000 in GenBank

Die stromaufwärts des 1. Exons gelegene Sequenz enthält eine mögliche „TATA“-Box (194 bp stromaufwärts des Translationsstarts) als auch eine „CAAT“-Box, die 560 bp in 5'-Richtung lokalisiert ist (Abb. 3-14). Daneben wurden weitere putative Bindestellen für Transkriptionsfaktoren identifiziert (NF- κ B). Im 3' Bereich des Gens befindet sich eine mögliche Polyadenylierungsstelle (AATAAA) 290 bp stromabwärts des Stopcodons.

Anhand der putativen Promotorsequenz von NT_019546 wurden drei Primerpaare gelegt, um die Sequenz auf genomischer DNA zu verifizieren. Als Ausgangsmaterial für die PCR diente sowohl genomische DNA als auch PAC-DNA von Klon H031123. Keine der PCR-Reaktionen führte zu einem diskreten Fragment. Es wurde daher versucht, den PAC-Klon von der cDNA-Sequenz ausgehend in 5'-Richtung (stromaufwärts) direkt zu sequenzieren. Dazu wurden mehrere Oligonukleotide verwendet, die anhand der 5'UTR cDNA Sequenz gelegt worden waren. Keine der Sequenzierungen führte zu auswertbaren Ergebnissen, so dass nicht geklärt werden konnte, ob die Sequenz im 5' Bereich von NT_019546 den putativen *CART1* Promotor darstellt.

```

-577          CAAT-Box
      CAAGTTCCTTAAGACGCCTCTAAATCTTTCTGGTAGTGAGTGGCCGGCATGGGGCGGGGTGGGACGGGTGGCTC
-502
      AGGAAGGCGCAGGCAGTAGGGAGTGGAGGTTTAACTGCTTTGCGATCTCACCAAGATCTTCCGAAATGCCAGTCC
-427
      ACTGTACAGCGGGCAATGAATCTGGGTGTCAGGGGCTCGTCTCTCTGGCATTGTCTGAAATGGAGCTGTCTGT
-352
      CTGTCTATCCTAGGCCTGGACGCCCTCTGCCCGGTAAGTGGGAAAATGGGGTGGGGTAGGGGCGGAGGGGA
-277
      CCTGGGGTGGAGTTAGTCGCCCGCTATTTTCATATTCATTAGAACTGGGAGGCTGCCCGAGGAGGCCAGCTGAG
-202          TATA-Box
      TTTCAAGAATAAAGCAACTTCGGGTGCTCCTTTTCCAGCCGGGACATATTAAGGGACCGGAGCGGGCAGTT
-127          NF-?B
      CCCGACGCCGACGCGCTCGCTTCCCTTCCCTCCTCTCTGGCCCTCCCTCCTCCACCCACTGGCTCCCTCCCC
-52
      AGCGCTCTCCAGTTTCTGTGCCCCAGGAGCTACGCGACAGTCTTCCAGGATTATGGAGTTTCTGAGCGAGAAGTT
+1

```

Abbildung 3-14 Putative Promotor-Sequenz von *CART1* (AC127069)

Die Sequenz AC127069 wurde mit Hilfe der TSSW Database auf einen potentiellen Transkriptionsstart analysiert. Mögliche Bindestellen für Transkriptionsfaktoren wie NF-kB wurden von dem Suchalgorithmus identifiziert. Mögliche „TATA“- bzw. „CAAT“-Boxen sind mit Kästchen markiert. Der Transkriptionsstart (grau hinterlegt) liegt 155 bp stromaufwärts des Translationsstarts.

3.1.3.11 Vergleich der Exon- und Introngrößen von *Cart1* zwischen Mensch und Maus

Nachdem seit November 2002 eine genomische Sequenz von Chromosom 10 der Maus zugänglich ist (UCSC Datenbank: chr10:103159245-103179282), die *Cart1* enthält, wurden die Sequenzen von Mensch und Maus verglichen (Tab.3-3). Die Exongrößen weichen nicht voneinander ab, d.h. sowohl die Exon-Intron Strukturierung als auch die genauen Positionen der Introns sind bei Mensch und Maus identisch. Alle Introns sind beim Menschen geringfügig länger als bei der Maus, die Größenordnung bleibt jedoch erhalten. Intron 1 und 2 liegen bei ca. 3 kb, Intron 3 ist mit über 12 kb bei beiden Spezies erheblich größer.

Tabelle 3-3 Größenvergleich der Exons und Introns zwischen Mensch und Maus

Exon Nr	Größe (bp) Mensch	Größe (bp) Maus	Intron Nr	Größe (bp) Mensch	Größe (bp) Maus
1*	226	226	1	3 084	2 941
2	305	305	2	2 975	2 829
3	129	129	3	14 174	> 12 772 [†]
4*	321	321			

* Angegebene Werte beziehen sich auf die codierende Sequenz ohne 5' bzw. 3' UTR.

[†] Die zugrundeliegende genomische Sequenz der Maus ist eine nicht-revidierte Rohsequenz des Mausgenomprojekts, die eine nicht genau definierte Anzahl fehlender Basen enthält

3.1.4 *CART1* Mutationsscreen

Nachdem die genomische Organisation von *CART1* aufgeklärt war, wurden 183 SBA Patienten und 234 gesunde Kontrollpersonen mittels PCR/SSC Analyse auf Sequenzveränderungen in *CART1* untersucht (Abb. 3-15). Die 11 Primerpaare überlappen sich vollständig, so dass die gesamte cDNA Sequenz inklusive aller Spleißstellen durch den Mutationsscreen abgedeckt wurde.

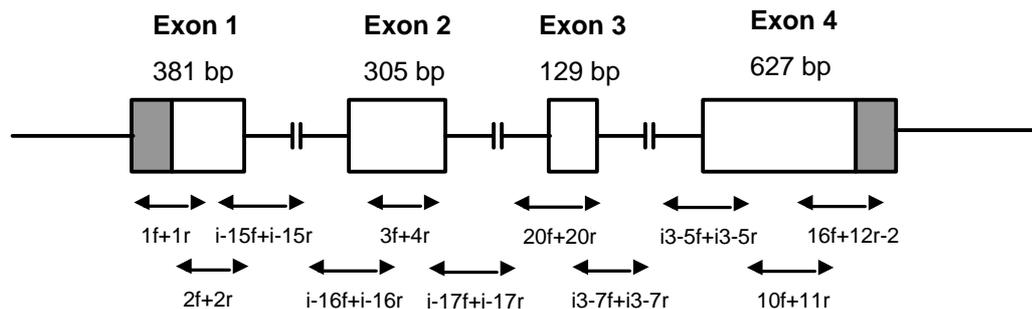


Abbildung 3-15 Lage der Oligonukleotide des Mutationsscreens in *CART1*

Schwarze Pfeile kennzeichnen die Lage der PCR-Produkte, die von den 11 Primerpaaren des Mutationsscreens amplifiziert wurden.

Dabei wurden 6 Polymorphismen und 1 seltenere Sequenzvariante entdeckt (Tab. 3-4). Fünf der Sequenzveränderungen befinden sich im translatierten Bereich des Gens (Aminosäureaustausch bei 4 Sequenzvarianten, Abb. 3-16). Eine Sequenzvariante (R192C), die am Ende der Homeoboxdomäne liegt, wurde ausschließlich bei einer Patientin und ihrer Mutter gefunden, und nicht bei der Kontrollgruppe. Alle Sequenzvarianten wurden von einem nicht-betroffenen Elternteil an das betroffene Kind weitergegeben.

Tabelle 3-4 Sequenzveränderungen in *CART1*

Position	Art	Primer	Nukleotid	AS	Patienten n = 183	Kontrollen n = 234
5'UTR	Transition	1f + 1r	-19G? A		6	7
Exon 1	stille Mutation	1f + 1r	48A? G	K16K	5	4
Exon 1	Missense Mutation	i-15f + i-15r	182A? G	H61R	2	6
Exon 1	Missense Mutation	i-15f + i-15r	190C? T	R64C	0	1
Exon 1	Missense Mutation	i-15f + i-15r	191G? T	R64L	2	7
Exon 3	Missense Mutation	20f + 20r	574C? T	R192C	1	0
Intron 3	Transition	20f + 20r	IVS3 -17T? C		3	3

	1	K16K *	H61R R64 * *
hCART1	MEFLSEKFAKSPPSKNSDFYMGAGGP--LEHVMETLDNESFYKASAGKCVQAFGPLP-----RAEHHVR		
mCart1	MEFLSEKFAKSPPSKNSDFYMGAGGP--LEHVMETLDNESFYKATAGKCVQAFGPLP-----RAEHHVR		
rCart1	MEFLSEKFAKSPPSKNSDFYMGAGGP--LEHVMETLDNESFYKATAGKCVQAFGPLP-----RAEHHVR		
xCart1	MDFLTDFKSLKNQPSKAGDEFFMAGGAGTLEHVMDSMDTESFYKSPAVVAAAAGASKCVQQGFSAIHRAEHHVR		
	76	? Intron 1	?
hCART1	LERTPCQDSSVNYGITKVEGQPLHTELNRAMDNCNLSLRSPVKGMQEKGELDELGDKCDSNVSSSK KRRHRTTF		
mCart1	LDRTSPCQDSSVNYGITKVEGQPLHTELNRAMDNCNLSLRSPVKGMPEKSELDELGDKCDSNVSSSK KRRHRTTF		
rCart1	LDRTSPCQDSSVNYGITKVEGQPLHTELNRAMDNCNLSLRSPVKGMPEKSELDELGDKCDSNVSSSK KRRHRTTF		
xCart1	MERASPCQENNANYGLAKVEGQTVHTELGSRMDTCCSLAVSPGKSMADKVELDELGDKCDSNVSSSK KRRHRTTF		
	151	? Intron 2	* R192C
hCART1	TSLQLEELEKVFQKTHYPDVYVREQLALRTELTEARVQVWFQNRRAKWRKRERYGQIQQAKSHFAATYDISVLP		
mCart1	TSLQLEELEKVFQKTHYPDVYVREQLALRTELTEARVQVWFQNRRAKWRKRERYGQIQQAKSHFAATYDISVLP		
rCart1	TSLQLEELEKVFQKTHYPDVYVREQLALRTELTEARVQVWFQNRRAKWRKRERYGQIQQAKSHFAATYDISVLP		
xCart1	TSLQLEELEKVFQKTHYPDVYVREQLALRTELTEARVQVWFQNRRAKWRKRERYGQIQQAKSHFAATYDISVLP		
	226	? Intron 3	
hCART1	TDSYPQIQNNLWAGNASGGSVVTSCLMPRTSSCMTPYSHSPRTDSSYTGFSNHQNFQSHVPLNNFFTDSSLTGA		
mCart1	TDSYPQIQNNLWAGNASGGSVVTSCLMPRDASSCMTPYSHSPRTDSSYTGFSNHQNFQSHVPLNNFFTDSSLTGA		
rCart1	TDSYPQIQNNLWAGNTSGGSVVTSCLMPRDASSCMTPYSHSPRTDSSYTGFSNHQNFQGHVPLNNFFTDSSLTGT		
xCart1	ADSYPQIQNNLWAGNPSGGSVVTSCLMPREPSSCMTPYSHSRTDSPYTGFTNHQNFQSHMPLNIFFTESLLSGS		
	301		
hCART1	TNGHAFETKPEFERRSSSI AVLRMKAKEHTANISWAM		
mCart1	TNGHAFETKPEFERRSSSI AVLRMKAKEHTANISWAM		
rCart1	TNGHAFETKPEFERRSSSI AVLRMKAKEHTANISWAM		
xCart1	ANGHSFEAKPEFERRSSSI AVLRMKAKEHTANISWAM		

Abbildung 3-16 *CART1* Sequenzvarianten und Intronpositionen

Die Aminosäure an Position 125 des humanen Proteins wurde aufgrund eigener Sequenzierungsergebnisse von Threonin zu Serin korrigiert (?). Sie unterscheidet sich demnach nicht von der AS-Sequenz der Maus und Ratte. Positionen, an denen Sequenzveränderungen bei NRD Patienten gefunden wurden, sind mit * gekennzeichnet (K16K, H61R, R64L, R192C). Die Aminosäuren, zwischen denen in der genomischen Sequenz ein Intron liegt, sind mit ? markiert.

3.1.4.1 Fall-Kontroll-Vergleich bei *CART1* Sequenzvarianten

Um festzustellen, ob die Sequenzvarianten häufiger oder seltener bei NRD-Patienten als bei Kontrollpersonen auftraten, wurden die Häufigkeiten des heterozygoten Genotyps (+/-) mit Hilfe des zweiseitigen Pearson χ^2 -Tests verglichen. Es traten keine signifikanten Unterschiede in der Genotypverteilung bei Patienten und Kontrollen auf (Tab. 3-5). Die Sequenzveränderungen schienen damit keinen Einfluss auf die Entstehung von NRD zu haben.

Tabelle 3-5 Häufigkeiten der *CART1* Sequenzvarianten

Sequenzvariante	Häufigkeit des heterozygoten (+/-) Genotyps bei Patienten	Häufigkeit des heterozygoten (+/-) Genotyps bei Kontrollen	p-Wert
-19G? A	6 / 183 (3.3 %)	7 / 234 (3.0 %)	0.22
48A? G (K16K)	5 / 183 (2.7 %)	4 / 234 (1.7 %)	0.51
182A? G (H61R)	2 / 183 (1.1 %)	6 / 234 (2.6 %)	0.33
190C? T (R64C)	0 / 183	1 / 234 (0.4 %)	0.56
191G? T (R64L)	2 / 183 (1.1 %)	7 / 234 (3.0 %)	0.12
574C? T (R192C)	1 / 183 (0.5 %)	0 / 234	0.44
IVS3 -17T? C	3 / 183 (1.6 %)	3 / 234 (1.3 %)	0.30

3.2 **BMP4 (14q22-q23)**

Felder B, Stegmann K, Schultealbert A, Geller F, Strehl E, Ermert A, Koch MC (2002) Evaluation of BMP4 and its specific inhibitor NOG as candidates in human neural tube defects (NTDs). *Eur J Hum Genet* 10, 753-756

3.2.1 **BMP4 als Kandidatengen für NRD**

BMP4 wurde aufgrund seines Expressionsmusters während der Neurulation als NRD Kandidatengen ausgewählt. Aus Expressionsstudien bei der Maus ist bekannt, dass *Bmp4* eine wichtige Rolle bei der Etablierung epidermal-mesenchymaler Grenzbereiche spielt, die z.B. bei der Verschmelzung der Neuralwülste beim Neuralrohrschluss auftreten [Vainio et al. 1993]. Der Beginn der Migration von Zellen der Neuralleiste wird ebenfalls von *Bmp4* und seinem Antagonisten *Noggin* gesteuert [Sela-Donenfeld und Kalcheim 1999]. In der Maus wird *BMP4* selektiv im dorsalen Bereich des sich entwickelnden Neuralrohrs exprimiert, zusammen mit anderen dorsalen Markern wie *Slug*, *Pax-3* und *Msx-1* [Winnier et al. 1995].

3.2.2 **TGF- β Genfamilie**

BMP4 ist ein sezerniertes Polypeptid, das zur Superfamilie der TGF- β Signalmoleküle gehört. Hierzu zählen verschiedene BMPs (BMP2, BMP7) der Vertebraten ebenso wie *dpp* (*decapentaplegic*) von *Drosophila*. Allen ist eine sehr große strukturelle Ähnlichkeit gemein. Auf Aminosäureebene ist *dpp* zu 75% identisch mit BMP4 des Menschen. Versuche in *Drosophila* haben gezeigt, dass ektopisches humanes BMP4 dazu in der Lage ist, die Defekte bei der dorso-ventralen Musterbildung von *dpp* null-Mutanten zu verhindern. Der hohe Grad an Konservierung spricht dafür, dass ein starker Selektionsdruck gegen eine Veränderung der Aminosäuresequenz wirkt, damit die Funktion des Proteins gewährleistet ist. Abb. 3-17 zeigt ein Alignment der AS-Sequenzen von *Bmp4* bei Mensch, Maus und Zebrafisch.

Mensch	1	MIPGNRMLMVLLCQVLLGGASHASLIPETGKKKVAEIQGHAGGRRSGQSHELLRDFEATLLQMFGLRRRPQPSK
Maus		MIPGNRMLMVLLCQVLLGGASHASLIPETGKKKVAEIQGHAGGRRSGQSHELLRDFEATLLQMFGLRRRPQPSK
Zebrafisch		MIPGNRMLMVILLCQVLLGESYASLIPEEGKKK-ASALH-----LAQSHELLRDFEATLLHMFGLQRRRPSH
Mensch	76	SAVIPDYMRDLYRLQSGEES- Q IHS T GLEYPERPASRANTVRSFHHHEHENIPG- T SEN S AFRFLFNLSSIP
Maus		SAVIPDYMRDLYRLQSGEES E EQ S GTGLEYPERPASRANTVRSFHHHEHENIPG- T SEN S AFRFLFNLSSIP
Zebrafisch		SAV V EQYLLDLYRLQS G EL E EA- G AQ H VSF D Y P ER S T S RANTV R G F HHEH L E L QSD G S Q ET P L R F V F N L S S I P
Mensch	154	ENE A ISSA E LRL F RE Q VD Q GD----- W ER G FHRINIY E VM K PP A EV V PGHLITRLLDTRLVHHN V TRW E TFD V S
Maus		ENE V ISSA E LRL F RE Q VD Q GD----- W EQ G FHRINIY E VM K PP A EM V PGHLITRLLDTRLVHHN V TRW E TFD V S
Zebrafisch		ED E L I ST A ELR V Y R Q I D A FS D PD Q T G DH G L H RINIY E V L K A PR E G Q --- L IT Q LLDTRLV R H N TS K W E S F D V S
Mensch	219	PAVLRWTREKQPNYGLAIEVTHLHQ T R T H Q Q H VR I SR S LP Q GS G N- W AQLRPLL V TF G HD G R G H A L T RRR R AK R
Maus		PAVLRWTREKQPNYGLAIEVTHLHQ T R T H Q Q H VR I SR S LP Q GS G D- W AQLRPLL V TF G HD G R G H T L T RRR - AK R
Zebrafisch		PAVLRWT Q E K RS N H G L A EV V Q M K R NP V Q K GR H VR V SR S V H PL P DE E W D Q L RPLL V TF G HD G K S H L TRR A -----
Mensch	293	SPKHHSQRARK K N K N C RRHS L Y V D F SD V GW N D W I V AP P G Y Q A F Y C H G D C PF P LAD H LN S T N HAI V Q T LV N SV N SS
Maus		SPKHHPQRSR K N K N C RRHS L Y V D F SD V GW N D W I V AP P G Y Q A F Y C H G D C PF P LAD H LN S T N HAI V Q T LV N SV N SS
Zebrafisch		-KRSP Q R G R K R N R N C RR H AL Y V D FSD V GW N D W I V AP P G Y Q A F Y C H G E C PF P LAD H LN S T N HAI V Q T LV N SV N T N
Mensch	368	IPKA CC VP T EL S A I S M L Y L D E Y D K V V L K N Y Q E M V VE G CC CR
Maus		IPKA CC VP T EL S A I S M L Y L D E Y D K V V L K N Y Q E M V VE G CC CR
Zebrafisch		IPKA CC VP T EL S A I S M L Y L D ET D R V V L K N Y Q E M V V E G CC CR

Abbildung 3-17 AS-Sequenzen von BMP4 unterschiedlicher Spezies

Alignment der BMP4 AS-Sequenzen von Mensch (NP_570912), Maus (NP_031580) und Zebrafisch (NP_571417). Die C-terminale TGF- β Domäne (in Fettdruck dargestellt) enthält die für BMPs typische Anzahl von 7 konservierten Cysteinen (schwarz hinterlegt) .

3.2.3 Genstruktur von *BMP4*

Im Gegensatz zu *CART1* waren bei *BMP4* genomische Sequenzen in der Datenbank zugänglich. Aus der cDNA Sequenz (NM_001202, van den Wijngaard et al. 1996) und einer genomischen BAC-Klon Sequenz (AL138479) wurde eine fortlaufende Sequenz des Gens zusammengesetzt, um die Exon-Intron-Übergänge ebenfalls im Mutationsscreen abdecken zu können (Abb. 3-18).

Die transkriptionelle Einheit von *BMP4* des Menschen wird von 5 Exons codiert und umfasst ca. 7 kb auf genomischer Ebene [van den Wijngaard et al. 1996]. Zwei funktionelle Promotorregionen sind bekannt, die zelltyp-spezifisch genutzt werden. Translatiert werden nur die beiden letzten Exons (4 und 5).

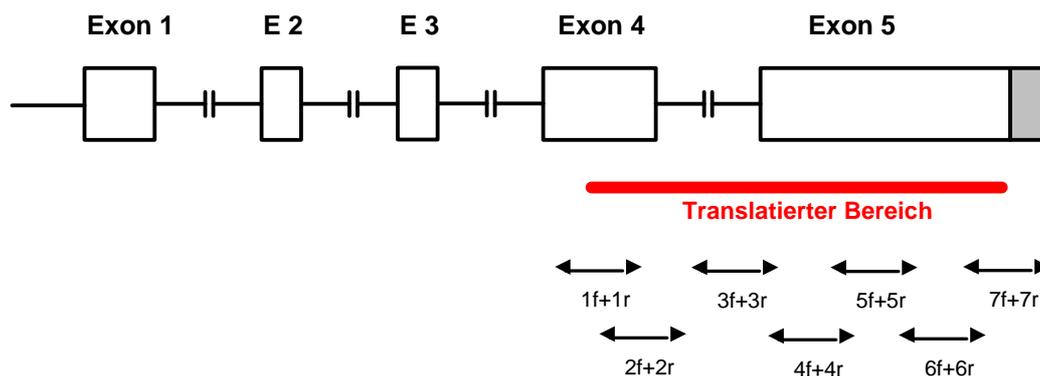


Abbildung 3-18 Genomische Struktur von *BMP4*

Der translatierte Bereich von *BMP4* liegt in den beiden letzten Exons 4 und 5, die inklusive der Spleißstellen durch den Mutationsscreen abgedeckt wurden. Die Lage der im Mutationsscreen verwendeten PCR-Produkte und Primerpaare ist durch schwarze Pfeile angegeben.

3.2.4 SSCA-Mutationscreen

179 NRD-Probanden wurden auf Sequenzvarianten in *BMP4* untersucht. In vier Patienten wurden Missense-Mutationen in den codierenden Exons des Gens gefunden, die in allen Fällen von einem Elternteil vererbt wurden. Zwei der Sequenzveränderungen (S91C, R226W) traten auch bei je einer gesunden Kontrollperson auf (Tab. 3-5, Abb. 3-19).

Tabelle 3-6 Missense-Mutationen in *BMP4* bei NRD-Patienten und Kontrollen

Lage	Art	Primerpaar	nt	AS	SBA-Patienten n = 179	Kontrollen n = 161
Exon 4	Missense	2f + 2r	272C? G	S91C	1 (+/-)	1 (+/-)
Exon 5	Missense	4f + 4r	673A? G	T225A	1 (+/-)	0
Exon 5	Missense	4f + 4r	676C? T	R226W	1 (+/-)	1 (+/-)
Exon 5	Missense	7f + 7r	1100G? C	S367T	1 (+/-)	0

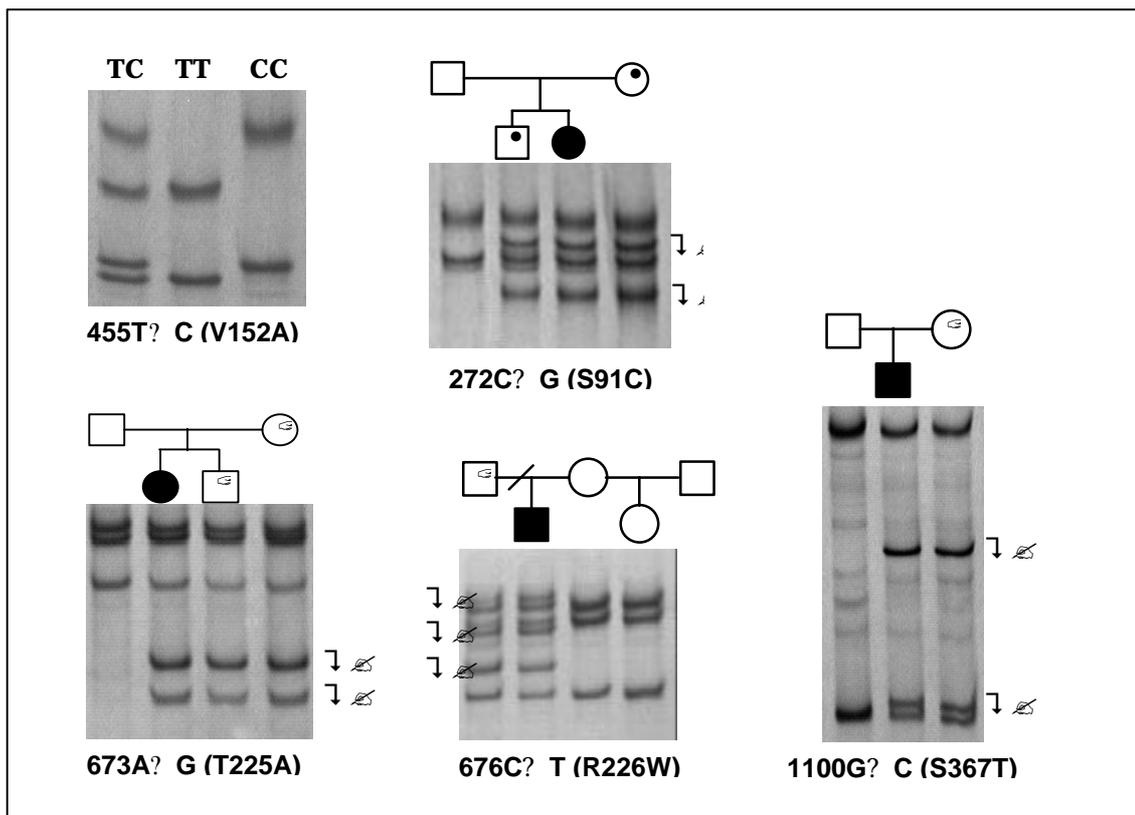


Abbildung 3-19 *BMP4* 455T? C Polymorphismus und 4 Sequenzvarianten

Aberrante SSCA-Laufmuster bei *BMP4* Sequenzveränderungen.

Polymorphismus 455T? C (V152A): Durch Restriktionsspaltung des PCR-Produkts 3f/3r mit *HphI* wurde bei homozygoten Probanden (455TC) bestimmt, welches SSCA-Laufmuster dem homozygoten Genotyp 455TT bzw. 455CC entspricht.

3.2.5 *BMP4* Polymorphismus 455T? C

Bei der Durchführung des Mutationsscreens von Exon 5 wurde in einem PCR-Produkt (Primerpaar 3f/3r) eine Sequenzvariante nachgewiesen, bei der es sich um einen schon beschriebenen Polymorphismus handelte [Mangino et al. 1999]. Der Polymorphismus *BMP4* 455T? C führt zu einem Aminosäureaustausch an Position 152 von Valin zu Alanin (V152A). Da das Allel 455C eine neue Schnittstelle für *HphI* einführt, konnte das Vorhandensein dieses Allels durch einen Restriktionsverdau nachgewiesen werden. So konnte bei den homozygoten Probanden festgestellt werden, welches SSCA-Fragmentmuster dem 455TT bzw. 455CC Genotyp entsprach. Die Genotypisierung der Probanden für *BMP4* 455T? C erfolgt mittels PCR (Primerpaar 3f/3r) und SSCA.

3.2.5.1 Fall-Kontroll-Vergleich

179 SBA Patienten und 161 Kontrollpersonen wurden für *BMP4* 455T? C genotypisiert (Tab. 3-6). Eine Fall-Kontroll Studie zeigte keine signifikanten Unterschiede bei den Allelfrequenzen von Patienten und Kontrollen. Die weitere statistische Analyse (zweiseitiger Pearson's χ^2 -Test) ergab jedoch eine unterschiedliche Genotypverteilung. 455TC Heterozygote waren signifikant häufiger bei Kontrollpersonen zu finden, als bei Patienten (nominales $p = 0,017$). Aufgrund dieses Ergebnisses wurden die Genotyphäufigkeiten beider Gruppen auf ein Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG) überprüft. Es stellte sich heraus, dass bei den Kontrollen ein signifikanter Überhang an 455TC Heterozygoten vorhanden war ($p = 0,01$), der eine Abweichung vom HWG verursachte.

Tabelle 3-7 Genotypverteilung und Allelfrequenzen für *BMP4* 455T? C (V152A)

		Genotypverteilung			Allelfrequenzen	
		455TT	455TC	455CC	T	C
Kontrollen (n = 161)	beobachtet	23 (14.3%)	95 (59.0%)	43 (26.7%)	0.44	0.56
	erwartet	19.4%	49.3%	31.4%		
Patienten (n = 179)	beobachtet	35 (19.6%)	82 (45.8%)	62 (34.6%)	0.42	0.58
	erwartet	17.6%	48.7%	33.6%		

3.2.5.2 Familienbasierte Analyse (Transmission Disequilibrium Test, TDT)

Da die Verwendung einer externen Kontrollgruppe zu Stratifikationseffekten führen kann, wurde zusätzlich eine familienbasierte Analyse (TDT) durchgeführt. Dazu wurden die DNA der Eltern von Patienten für *BMP4* 455T? C genotypisiert. Insgesamt wurden 91 Trios (182 Eltern und 91 SBA-Patienten) auf ein Kopplungsungleichgewicht zwischen *BMP4* 455T? C und dem SBA-Phänotyp untersucht. Von den insgesamt 182 genotypisierten Eltern waren 93 heterozygot und damit informativ für den TDT. Von den 93 Heterozygoten gaben 46 das T-Allel und 47 das C-Allel an ihr betroffenes Kind weiter. Die Transmissionsrate der beiden Allele unterschieden sich also nicht signifikant (McNemar Test $p = 0,91$) und widersprechen damit dem Resultat der Fall-Kontroll-Studie.

Tabelle 3-8 TDT für *BMP4* 455T? C Haplotypen bei 91 Trios

		nicht-transmitierte Allele	
		T	C
transmitierte	T	30	47
Allele	C	46	59

Untersucht wurden 91 Trios mit 182 Eltern. 93 (46+ 47) waren heterozygot (455TC) und damit informativ für die Berechnung des TDT.

3.3 T (6q27)

Richter B, Schultealbert AH, Koch MC (2002) Human T and risk for neural tube defects. *J Med Genet* 39: E14

3.3.1 T als Kandidatengen für NRD

T, das menschliche Homologon zu *Brachyury* der Maus, codiert für einen aktivierenden Transkriptionsfaktor [Kispert und Herrmann 1993]. Seine essentielle Rolle während der Embryonalentwicklung wurde durch den Phänotyp der *Brachyury* Mausmutante demonstriert, bei der das gesamte Gen deletiert ist [Beddington et al. 1992, Herrmann et al. 1990]. Obwohl T nicht im Neuralrohr, sondern in mesodermalen Strukturen wie der Chorda dorsalis exprimiert wird, zeigen heterozygote *Brachyury* Mäuse Fehlentwicklungen des Neuralrohrs, während homozygote Null-Mutanten schon im Mutterleib absterben [Wilkinson et al. 1990]. Die Unterstützung durch das Chordamesenchym scheint demnach essentiell für eine korrekt ablaufende Neurulation zu sein. Außerdem ist vorstellbar, dass bei gestörter Genexpression in der Chorda Fehlbildungen der knöchernen Anteile der Wirbelsäule entstehen, da hier die Bildung der Wirbelkörper durch Anlagerung von Chondrozyten initiiert wird.

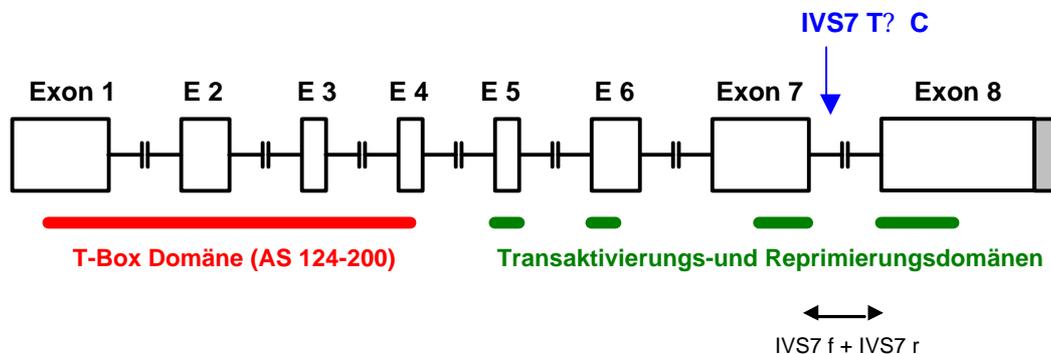


Abbildung 3-20 Genomische Struktur des humanen T-Gens

T besteht aus 8 Exons, die sich über eine Länge von ca. 10 kb erstrecken [Edwards et al. 1996]. Die namensgebende T-Box Domäne erstreckt sich über die ersten vier Exons.

Die Position des intronischen Polymorphismus T IVS7+ 79T? C ist mit blauem Pfeil gekennzeichnet. Für die Genotypisierung wurde ein PCR-Produkt generiert (Primerpaar IVS7 f + IVS7 r), das die polymorphe Stelle enthält.

3.3.2 Untersuchung des intronischen Polymorphismus *T IVS7+ 79T? C*

Ein intronischer SNP, der 79 bp stromabwärts des 5'-Endes von Intron 7 liegt (Abb. 3-20), wird seit einiger Zeit im Zusammenhang mit NRD diskutiert [Morrison et al. 1996, Morrison et al. 1998, Trembath et al. 1999]. Drei Allele wurden beschrieben [Morrison et al. 1996]: IVS7-1 (IVS7+ 79T), IVS7-2 (IVS7+ 79C) und IVS7-3 (Art der Sequenzveränderung in der Originalarbeit nicht charakterisiert). Zwischen dem Vorhandensein von Allel IVS7-2 und dem Auftreten von familiärer Spina bifida wurde eine statistisch signifikante Assoziation beobachtet [Morrison et al. 1996, Morrison et al. 1998].

Um zu überprüfen, ob der Polymorphismus auch in der deutschen Population mit NRD assoziiert ist, wurden 183 NRD-Patienten (168 nicht-familiäre, 15 familiäre Fälle) und 266 Kontrollen für *T IVS7+ 79T? C* mittels PCR (Primerpaar TIVS7 f / TIVS7 r) und SSCA typisiert. Das seltene IVS7-3 Allel (Allelfrequenz 0,3%, [Morrison et al. 1996]) wurde bei den in dieser Arbeit untersuchten Probanden nicht beobachtet. In Tabelle 3-8 sind die Genotyp- und Allelhäufigkeiten bei NRD-Patienten und Kontrollen aufgeführt.

Tabelle 3-9 Genotyp- und Allelfrequenzen für *T* Polymorphismus IVS7+ 79T? C

	Genotyp			Allelfrequenzen	
	1/1	1/2	2/2	1	2
Kontrollen (n = 266)	137	107	22	0.72	0.28
Patienten (n = 183)	88	81	14	0.70	0.30

Patienten: 9 Anencephale, 3 Encephalocele, 171 Spina bifida aperta (davon 15 familiäre Fälle)
 1 = Allel IVS7+ 79T
 2 = Allel IVS7+ 79C

3.3.2.1 Fall-Kontroll-Vergleich

Für die statistische Analyse der Genotypfrequenzen von Patienten und Kontrollen wurde der Cochran-Armitage Trend Test verwendet, da keine Hypothese darüber bestand, welches der beiden Allele (IVS7+ 79T oder IVS7+ 79C) bzw. welcher Genotyp (1/1, 1/2 oder 2/2) möglicherweise einen Risikofaktor für NRD darstellte. Die Genotyphäufigkeiten von Patienten und Kontrollen zeigten keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,70$).

3.3.2.2 Familienbasierte Analyse (TDT)

Um festzustellen, ob Stratifikationseffekte für das negative Assoziationsergebnis des Fall-Kontroll-Vergleichs verantwortlich waren, wurde zusätzlich ein TDT durchgeführt. Dazu wurden die Eltern der Patienten für IVS7+79T? C genotypisiert. Insgesamt wurden 101 Trios (202 Eltern und 101 NRD-Patienten) auf ein Kopplungsungleichgewicht zwischen IVS7+79T? C und dem NRD-Phänotyp untersucht. 94 der 202 genotypisierten Eltern waren heterozygot und damit informativ für den TDT. Davon gaben 45 das C-Allel und 49 das T-Allel an ihr betroffenes Kind weiter. Die Durchführung der Teststatistik (McNemar) ergab keinen signifikanten Unterschied in den Transmissionsraten beider Allele ($p = 0,68$). Das Resultat des Fall-Kontroll-Vergleichs wurde damit bestätigt.

Tabelle 3-10 TDT für IVS7+79T? C Haplotypen bei 101 Trios

		nicht-transmitte Allele	
		T	C
transmitte	T	91	49
Allele	C	45	17

Untersucht wurden 101 Trios mit 202 Eltern. 94 (45+ 49) waren heterozygot (IVS7+79TC) und damit informativ für die Berechnung des TDT. Für die statistische Analyse wurde der McNemarTest eingesetzt ($p=0,68$).

3.4 *PDGFRa*(4q12)

3.4.1 *PDGFRa* als Kandidatengen für NRD

Pdgfra kodiert für einen Tyrosinkinase-Rezeptor, der zusammen mit seinem Liganden Pdgf (platelet-derived growth factor) Zellwachstum und -morphologie reguliert [Kazlauskas 1994]. Mehrere Mausmodelle zeigen, dass die Fehlexpression von *Pdgfra* zu NRD führen kann. Sowohl homozygote *Patch* (*Ph/Ph*) Mausmutanten, bei denen *Pdgfra* und weitere chromosomale Bereiche deletiert sind, als auch homozygote *Pdgfra* Knock-out Mäuse entwickeln schwere Formen von Spina bifida [Payne et al. 1997, Soriano 1997, Stephenson et al. 1991].

Weitere Studien konnten zeigen, dass gain-of-function Mutationen in *Pax1*, einem transkriptionellen Regulator von *Pdgfra*, mit dem Auftreten von SB assoziiert sind [Hol et al. 1996, Joosten et al. 1998]. Möglicherweise begünstigt also eine Über- oder Unterexpression von *Pdgfra* die Entstehung von NRD. Von Joosten et al. 2001 wurde untersucht, ob bestimmte *Pdgfra* Promotor-Haplotypen die transkriptionelle Aktivität des Gens beeinflussen. Die Autoren stellten eine signifikante Assoziation zwischen dem Vorhandensein der Promoter-Haplotyp Kombination H2a/H2b und dem Auftreten von sporadischen NRD fest. Das Allel H1 trat signifikant seltener bei sporadischen SBA Patienten auf. Bei familiären NRD konnte eine Häufung des Genotyps H1/H2a festgestellt werden.

In dieser Arbeit wurde überprüft, ob diese Aussagen auch für NRD-Patienten aus der deutschen Population zutreffen.

3.4.2 Untersuchung der *PDGFRa* Promotor-Haplotypen bei Patienten mit NRD

Der Promoterbereich von *PDGFRa* umfasst einen ca. 2 kb großen Bereich, der sich stromaufwärts der codierenden Region anschließt [Afink et al. 1995]. Fünf unterschiedlich häufige *PDGFRa* Promoter-Haplotypen wurden beschrieben, die durch 8 polymorphe Stellen (7 Basenaustausche + eine Deletion) charakterisiert werden (Abb. 3-21).

193 NRD-Patienten (171 sporadisch, 11 familiär, 11 Feten Anencephale oder Encephalocele) und 162 Kontrollpersonen wurden für die bekannten Haplotypen typisiert. Aufgrund der hohen Probandenzahl erfolgte die Typisierung mittels PCR/SSCA Analyse. Dazu wurden die polymorphen Bereiche mit PCR amplifiziert und durch SSCA ausgewertet.

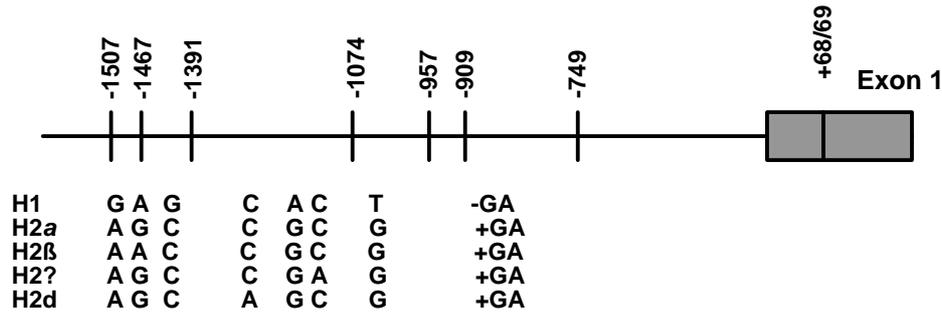


Abbildung 3-21 Promoter-Haplotypen von *PDGFRa*

oben: 8 polymorphe Stellen mit Angabe der Nukleotidposition [Joosten et al. 2001]

unten: Die Haplotypen H2a?d wurden als Unterfamilie zusammengefasst, da sie alle die Insertion + GA an Position nt 68/69 tragen und an weiteren vier Positionen die gleiche Base aufweisen. Da die in der Datenbank vorhandenen Sequenzen Unstimmigkeiten aufweisen, wurde die Nomenklatur von [Joosten et al. 2001] beibehalten.

3.4.2.1 Genotypverteilung der *PDGFR?* Promotor-Haplotypen

Genotypverteilung der Promotor-Haplotypen bei 171 sporadischen NRD Patienten, 11 familiären NRD Patienten und 162 Kontrollpersonen. Drei der insgesamt fünf Haplotypen (H2a, H2?, H2d) machen sowohl bei Patienten als auch bei Kontrollpersonen nur einen geringen Anteil aller typisierten Allele aus (~ 12%). Die beiden Haupt-Allele H1 und H2a machen mit ~ 88% (340 Allele bei Patienten) den größten Anteil aus (Abb. 3-22).

Abbildung 3-22 Genotypverteilung der *PDGFRa* Promotor-Haplotypen bei NRD-Patienten und Kontrollen

Probanden		H1	H2a	H2β	H2?	H2d					
H1	Kontrollen	5	3.1 %								
	sporadische NRD	10	5.8 %								
	familiäre NRD	1	9.1 %								
H2a	Kontrollen	56	34.6 %	57	35.2 %						
	sporadische NRD	47	27.5 %	76	44.4 %						
	familiäre NRD	4	36.4 %	4	45.5 %						
H2β	Kontrollen	3	1.9 %	18	11.1 %	0	0.0 %				
	sporadische NRD	3	1.8 %	17	9.9 %	1	0.6 %				
	familiäre NRD	1	9.1 %	1	9.1 %	0	0.0 %				
H2?	Kontrollen	2	1.2 %	6	3.7 %	5	3.1 %	0	0.0 %		
	sporadische NRD	4	2.3 %	7	4.1 %	0	0.0 %	0	0.0 %		
	familiäre NRD	0	0.0 %	0	0.0 %	0	0.0 %	0	0.0 %		
H2d	Kontrollen	0	0.0 %	9	5.6 %	0	0.0 %	1	0.6 %	0	0.0 %
	sporadische NRD	0	0.0 %	5	2.9 %	1	0.6 %	0	0.0 %	0	0.0 %
	familiäre NRD	0	0.0 %	0	0.0 %	0	0.0 %	0	0.0 %	0	0.0 %

3.4.2.2 Fall-Kontroll-Vergleich

Die statistische Analyse der Genotypverteilung wurde aufgrund der Seltenheit der Allele H2 β , H2 γ , H2 δ nur für die hauptsächlich vorkommenden Genotypen H2a/H2a, H1/H2a und H1/H1 durchgeführt. Es zeigte sich, dass die sich die Genotypverteilung bei Patienten und Kontrollen nicht signifikant unterschied (Cochrane-Armitage Trend Test: $p = 0,56$). Die Allelfrequenzen zwischen Kontrollen und sporadischen Fällen unterscheiden sich ebenfalls nur gering. Damit konnte die Aussage von Joosten et al. 2001 nicht bestätigt werden, dass Allel H1 bei sporadischen SBA Patienten signifikant seltener auftritt. Der Genotyp H1/H1 kam bei ca. 6 % der sporadischen Fälle vor, während H1/H1 von Joosten et al. 2001 in keinem der sporadischen Patienten beobachtet wurde.

Tabelle 3-11 PDGFR α Genotypfrequenzen bei Patienten und Kontrollen

	Anzahl					Allelfrequenzen	
			H1/H1	H1/H2a	H2a /H2a	H1	H2a
Kontrollen	118	beobachtet	5 (4.2 %)	56 (47.5 %)	57 (48.3 %)	0.28	0.72
		erwartet	7.8 %	51.9 %	51.9 %		
sporadische NRD	133	beobachtet	10 (7.5 %)	47 (35.3 %)	76 (57.1 %)	0.25	0.75
		erwartet	6.3 %	37.7%	56.0%		
familiäre NRD	9	beobachtet	1 (11.1 %)	4 (44.4 %)	4 (44.4 %)	0.28	0.72
		erwartet	7.7 %	40.1 %	52.2 %		

Die erwarteten Werte wurden mit Hardy-Weinberg-Gleichgewicht anhand der gegebenen Allelfrequenzen berechnet.

3.5 TWIST (7p21)

Felder B, Schultealbert A, Röper B, Koch MC (2002) Developmental genes as candidates in cases with neural tube defects (NTDs). *Med Genet* 3:604

3.5.1 TWIST als Kandidatengen für NRD

TWIST gehört zur Gruppe der basischen Helix-loop-helix (bHLH) Transkriptionsfaktoren, die eine essentielle Rolle bei der Embryonalentwicklung spielen. Ursprünglich wurde *twist* als rezessiv letale Mutation in *Drosophila* identifiziert, bei der die Mesoderm differenzierung gestört ist, so dass keine Gastrulation stattfindet [Simpson 1983]. Inzwischen sind neben dem humanen *TWIST* weitere Vertebraten-Homologe in Zebrafisch, *Xenopus*, Huhn und Maus isoliert worden. Expressionsstudien in der Maus haben gezeigt, dass *Twist* in Zellen mesodermalen Ursprungs und in den prä-migratorischen Zellen der cranialen Neuralleiste hergestellt wird, die später das Kopfmesenchym und die Kiemenbögen bilden [Gitelman 1997]. Dementsprechend zeigen *Twist* Knock-out Mäuse eine untypische Morphologie des Kopfmesenchyms, was den Neuralrohrschluss im cranialen Bereich verhindert. Alle homozygoten *Twist*-null Mutanten sterben noch *in utero* an schwerer Exencephalie [Chen und Behringer 1995]. Während die homozygoten Knock-out Mäuse NRD zeigen, entwickeln heterozygote *Twist* Mutanten Defekte im Schädelbereich, so dass *TWIST* auch als Kandidatengen für Craniosynostosen galt. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass Missense- und Nonsense-Mutationen in *TWIST* ursächlich für eine syndromale Form der Craniosynostose beim Menschen sind (Saethre-Chotzen Syndrom; [El Ghouzzi et al. 1997, Howard et al. 1997]). Da *TWIST* offenbar essentiell für eine korrekte Entwicklung des Kopfbereichs ist, könnten Sequenzveränderungen in *TWIST* möglicherweise auch zur Entstehung cranialer NRD (wie z.B. Anencephalie) beitragen. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden 188 NRD Patienten (inklusive 11 Anencephale und Encephalocoele) auf Mutationen in *TWIST* untersucht.

3.5.2 Genstruktur von *TWIST*

Die Sequenz des humanen *TWIST* Gens war bekannt (U80998). *TWIST* besteht aus zwei Exons, von denen nur das erste codierend ist (Abb. 3-23). Die Primerpaare für den Mutationscreen wurden so gelegt, dass das gesamte erste Exon durch überlappende PCR-Produkte abgedeckt wurde.

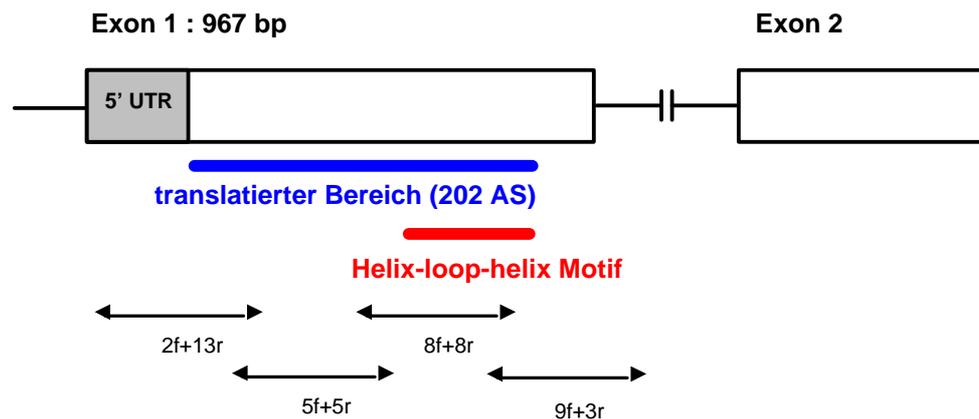


Abbildung 3-23 Genomische Struktur von *TWIST*

TWIST GenBank Acc.No.U80998

Exon 1: insgesamt 967 bp lang; davon 316 bp 5'UTR; der translatierte Bereich ist 609 bp lang
Die Lage der PCR-Produkte des Mutationscreens ist durch schwarze Pfeile angegeben.

3.5.3 Mutationscreen

Die humane Sequenz von *TWIST* ist besonders GC-reich. Für den SSCA Mutationscreen des codierenden ersten Exons wurde ein daher ein PCR-Kitsystem benutzt, das speziell für die Amplifikation GC-reicher Templates geeignet ist (GC-Melt, Clontech). Da ein sehr ähnliches Pseudogen existiert (*Dermo-1*), wurden nur hoch-spezifische PCR-Produkte für die SSC Analyse eingesetzt. 188 NRD-Patienten wurden auf Sequenzveränderungen in *TWIST* untersucht. Bei keinem der untersuchten Patienten konnten Abweichungen von der veröffentlichten Sequenz detektiert werden.

4 Diskussion

4.1 Multifaktorielle Genese von NRD

Das häufige Auftreten angeborener Neuralrohrdefekte (NRD) und das schwere Krankheitsbild, das zu lebenslanger Beeinträchtigung der Betroffenen führt, machen die Suche nach Ursachen der Erkrankung zu einem wichtigen Gegenstand der biomedizinischen Forschung. Erkenntnisse über Ätiologie des Defekts sind dabei Voraussetzung für eine verbesserte Prävention. Gezielte genetische Beratung von Risikopersonen ist ebenfalls nur möglich, wenn genaue Kenntnisse des Erbgangs vorliegen. Obwohl NRD aus diesem Grund seit vielen Jahren erforscht werden, sind die Ursachen der Erkrankung noch weitgehend ungeklärt. Als gesichert gilt jedoch die Annahme, dass erst ein gemeinsames Vorliegen von Umwelteinflüssen (z.B. Ernährung, Medikamente) und genetischen Faktoren zur Entstehung des Defekts führt. Die multifaktorielle Genese erschwert das Auffinden krankheitsauslösender Faktoren, da jeder einzelne nur einen kleinen Beitrag leistet und erst in der Summe aller prädisponierenden Komponenten relevant für die Krankheitsentstehung ist.

4.2 Heterogene Ätiologie von NRD

Unter dem Begriff NRD werden Fehlbildungen unterschiedlicher phänotypischer Ausprägung zusammengefasst, die sowohl Gehirn und Rückenmark als auch die knöchernen Anteile des Schädels und der Wirbelsäule betreffen. Dazu zählen die verschiedenen Formen der Spina bifida aperta (SBA), die vor allem im lumbo-sakralen Bereich auftreten, sowie die cranialen Formen Anencephalie und Encephalocele (Kap.1.1). Die verschiedenen Formen von NRD entstehen wahrscheinlich während der primären Neurulation durch Störungen des Neuralrohrschlusses an den drei postulierten Verschluss-Stellen (Kap.1.). Man stellt sich vor, dass je nach betroffener Verschluss-Stelle Defekte im cranialen (Verschluss-Stellen 2 und 3) und/oder caudalen Bereich (Verschluss-Stelle 1) auftreten. Die primäre Neurulation folgt entlang der rostro-caudalen Achse unterschiedlichen Faltungsarten (Kap.1.2.1., Abb.1-2). Dies ist notwendig, da im Bereich des zukünftigen Gehirns ein sehr viel größeres Lumen gebildet wird als in der Rückenmarksregion. Für den Ablauf einer bestimmten Faltungsart wird daher vermutlich eine ganz spezielle Kombination von Genen aktiviert, die den Modus der Auffaltung in Abhängigkeit von der Position im Organismus festlegen.

Wahrscheinlich werden die unterschiedlichen NRD-Formen durch Defekte mehrerer Gene hervorgerufen, wobei erst die spezielle Kombination dieser Gendefekte die Ausprägung des Phänotyps bestimmt. Dies würde die Anfälligkeit bestimmter Populationen für spezielle Defekte erklären.

4.3 Nachweis von Geneffekten bei komplexen Erkrankungen

Viele krankheitsrelevante Gene konnten durch klassische, modellbasierte (d.h. parametrische) Kopplungsanalysen erfolgreich lokalisiert werden. Dabei werden Betroffene und deren Familienmitglieder für gleichmäßig über das gesamte Genom verteilte Mikrosatelliten-Marker im Abstand von 5 bis 10 cM typisiert. Dies hat jedoch nur Aussicht auf Erfolg, wenn hinreichend große Familien mit vielen Betroffenen über mehrere Generationen vorhanden sind, da sich Kopplung nur durch die Beobachtung von Meiosen feststellen lässt. Außerdem muss für Kopplungsanalysen ein vollständiges genetisches Modell vorhanden sein, d.h. es müssen Kenntnisse über den Vererbungsmodus der Krankheit vorliegen (autosomal, dominant, rezessiv usw.). Dies ist in der Regel nur bei mendelnden Erbgängen der Fall.

Da die meisten NRD-Fälle sporadisch auftreten und es in den meisten Familien nur einen Betroffenen gibt, scheidet die Verwendung klassischer Kopplungsanalysen für die Erforschung von NRD aus. Wegen des schweren Krankheitsbildes haben Betroffene selten eigene Kinder, so dass das Auftreten von NRD über mehrere Generationen eine Ausnahme ist.

Um herauszufinden, welche Gene für NRD prädisponieren, bleibt daher nur das statistische Instrument der Assoziationsstudien. Eine Assoziation liegt vor, wenn das untersuchte genetische Merkmal bei Betroffenen signifikant häufiger oder seltener auftritt als bei Gesunden (Kap.1.3.7.). Assoziationsstudien untersuchen also Unterschiede innerhalb einer Population. Dabei gibt es mehrere Möglichkeiten: Es können polymorphe Marker untersucht werden, die nahe am krankheitsauslösenden Genlocus liegen. Ist ein bestimmter Marker mit dem Krankheitsphänotyp assoziiert, deutet dies darauf hin, dass sich die krankheitsverursachende Genmutation in der Nähe des Markers befindet. Man spricht dann von Kopplungsungleichgewicht zwischen Marker und Mutation.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, Sequenzveränderungen in Kandidatengenomen auf eine Assoziation mit dem Krankheitsphänotyp zu überprüfen. Diese Strategie wurde in der vorliegenden Arbeit angewendet. Dabei werden sowohl Betroffene als auch gesunde Kontrollpersonen für die entsprechenden Sequenzveränderungen typisiert und verglichen.

Tabelle 4-1 Vor- und Nachteile von Kopplungsanalysen und Assoziationsstudien

Kopplung	Assoziation
Untersucht das gleichzeitige Auftreten eines genetischen Markers und eines Krankheitsphänotyps innerhalb einer Familie (d.h. zwischen den Generationen)	Untersucht das gleichzeitige Auftreten eines genetischen Markers und eines Krankheitsphänotyps innerhalb einer Population (innerhalb einer Generation)
Familienstruktur muss mehrere Betroffene enthalten, innerhalb einer Generation (betroffene Geschwister) oder in mehreren Generationen (Großeltern-Eltern-Kinder)	Vergleich der Häufigkeit des Markers bei Betroffenen und Nicht-Betroffenen (Fall-Kontroll-Vergleich); Familien und betroffene Geschwister können ebenfalls untersucht werden
Zufallsverteilte genetische Marker (Mikrosatelliten-Marker) oder Kandidatengen-Polymorphismen können zur Analyse verwendet werden	Es werden hauptsächlich Marker in Kandidatengen verwendet; SNP-Marker Scans sollen in Zukunft eingesetzt werden
Weist vor allem mittlere bis starke Gen-Effekte nach (Relatives Risiko über 2)	Weist auch schwache Gen-Effekte nach (Relatives Risiko unter 2)
Genomweite Screens benötigen zwischen 300 (Intervalle der Marker ca. 5 cM) und 600 Markern (Intervalle der Marker ca. 10 cM)	Eine geringe Anzahl von Kandidatengen wird untersucht; genomweite Assoziationsstudien unter Verwendung von SNPs werden durch ausgedehnte SNP Karten möglich
Begrenzte Möglichkeit, zwischen falsch-positiven und echten positiven Resultaten zu unterscheiden	Stratifikationseffekte durch unpassende Kontrollgruppe möglich; Genomweite SNP Scans enthalten alle Kandidatengene, falsch-positive Ergebnisse sind aber aufgrund der hohen Zahl der untersuchten Marker trotzdem wahrscheinlich und erfordern einen geeigneten statistischen Test
Kosten sind erheblich, aber tragbar	Extrem hohe Kosten; möglicherweise durch neue Technologien (Hochdurchsatz-SNP-Scan) lösbar

Literatur: [Baron 2001]

4.4 Kandidatengenansatz

Als Kandidatengene kommen alle Gene in Frage, deren bekannte Eigenschaften (Expressionsmuster, Folsäuremetabolismus oder NRD im Tiermodell) einen ursächlichen Zusammenhang mit der Erkrankung vermuten lassen.

Für das komplexe Krankheitsbild der NRD bedeutet dies, dass es eine fast unüberschaubar große Anzahl möglicher Kandidatengene gibt. Die vielversprechendsten Kandidatengene können in zwei Gruppen eingeteilt werden: 1) Gene des Folsäurestoffwechsels, was auf der Beobachtung beruht, dass perikonzeptionelle Folsäuregaben einen präventiven Effekt auf die Erkrankung haben; 2) Entwicklungsgene, deren Beteiligung an der Neurulation durch Studien an Tiermodellen belegt ist.

Gene, die am Folsäurestoffwechsel beteiligt sind (z.B. Methylentetrahydrofolatreduktase, Cystathionin- β -Synthase), werden seit vielen Jahren auf ihre Beteiligung an NRD untersucht, bisher ohne durchschlagenden Erfolg. Trotzdem gelten Mausmutanten mit folsäurepräventierbaren NRD (z.B. *Cart1*-Knock-out Maus) als besonders gute Modelle für NRD beim Menschen.

Aus den unzähligen Genen, die die Embryonalentwicklung steuern, gelten diejenigen als NRD Kandidatengene, die maßgeblich an der Steuerung der Neurulation teilhaben. Um zu beurteilen, ob ein Gen möglicherweise Auswirkungen auf das Neurulationsgeschehen hat, werden mehrere Kriterien eingesetzt. Als ein Hauptkriterium gilt das räumlich-zeitliche Expressionsmuster eines Gens. Neurulationsgene können entweder direkt im Neuralrohr oder in anderen Geweben exprimiert werden, die relevant für die Neurulation sind (epidermales Ektoderm, Neuroektoderm, Kopfmesenchym usw.). Ein weiteres Selektionskriterium ist die Beobachtung, dass der Funktionsverlust bestimmter Gene in der Maus zu NRD führt. Inzwischen gibt es lange Listen potentieller Kandidatengene (NRD-Gene), die aufgrund von Erkenntnissen aus NRD-Mausmodellen zusammengetragen wurden [Juriloff und Harris 2000]. Inzwischen sind mehr als 60 Mausmutanten mit NRD beschrieben. Angesichts der unüberschaubar hohen Anzahl der an der Neurulation beteiligten Gene ist es kaum möglich, einige wenige, besonders geeignete Kandidaten für die Untersuchung beim Menschen auszusuchen. Da NRD jedoch zu 90% sporadisch auftretende Fälle sind, gibt es zum Kandidatengenansatz zur Zeit keine Alternative.

4.5 Die Rolle der Folsäure

In den meisten bisher untersuchten Populationen kann Folsäuresupplementierung während der frühen Schwangerschaft die Häufigkeit von NRD verringern [Czeizel und Dudás 1992, MRC Vitamin Study Research Group 1991]. Etwa die Hälfte bis zwei Drittel aller NRD kann verhindert werden. Frauen mit Kinderwunsch wird Folsäure daher in vielen Ländern zur perikonzeptionellen Einnahme empfohlen (0,4 mg/d oral). Der Wirkungsmechanismus von Folsäure ist jedoch noch nicht verstanden. Eine Hypothese ist, dass durch die Supplementierung ein genetischer Defekt im Folsäurestoffwechsel der Mutter ausgeglichen wird, der ansonsten zu einem Folat-Mangelzustand führt. Dafür spricht, dass erhöhte Homocystein- und damit einhergehend erniedrigte Folatspiegel im Blut der Mutter mit einem erhöhten NRD-Risiko des Kindes assoziiert sind [Kirke et al. 1996, Mills et al. 1995]. Die Tatsache, dass Folsäuremangel allein bei Mäusen nicht zu NRD führt, zeigt allerdings, dass noch weitere Faktoren eine Rolle spielen [Heid et al. 1992].

In einigen wenigen Ländern zeigen epidemiologische Studien keine präventive Wirkung von Folsäure. So haben Untersuchungen in Finnland keinen Zusammenhang zwischen einer Folsäuresupplementierung und der Vermeidung von Neuralrohrdefekten ergeben [Mills et al. 1992]. Finnland gehört allerdings zu den Ländern mit einer sehr niedrigen Prävalenz von 0,5 auf 1000 Geburten. Offenbar ist nur ein gewisser Prozentsatz aller auftretenden NRD durch Folsäure präventierbar. Auch bei Anreicherung von Nahrungsmitteln (Mehl, Cornflakes) mit Folsäure, was z.B. in den USA praktiziert wird [Oakley 2002], können nicht alle NRD verhindert werden. Für Deutschland liegen darüber keine Daten vor, da bisher noch keine Studien zur Wirkung von Folsäure durchgeführt wurden.

Es ist bekannt, dass Folsäure nicht nur das Auftreten von NRD, sondern auch von anderen angeborenen Fehlbildungen wie Herz-, Nieren- oder Harntraktanomalien verringern kann [Czeizel et al. 1996, Hall J. und Solehdin 1998a]. Dies mag damit zusammenhängen, dass Folsäure für die Synthese und Methylierung von DNA und RNA benötigt wird, die bei Zellwachstum- und Differenzierung in der Embryonalentwicklung von besonderer Wichtigkeit ist. Es bedeutet jedoch auch, dass sich Folsäure offenbar auch auf die Störungsanfälligkeit von Regulationsprozessen auswirkt, die außerhalb des Folsäuremetabolismus liegen. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass bei den zwei Mausmutanten, bei denen ein präventiver Effekt von Folsäure nachgewiesen wurde, keine Gene des Folsäurestoffwechsels mutiert sind, sondern Entwicklungsgene: *Cart1* und *Pax3* (Kap. 1.3.5).

4.6 Entwicklungsgene

Entwicklungsgene sind oft Gegenstand von Untersuchungen im Tiermodell, da sie wichtige Erkenntnisse über grundlegende Prozesse der Embryonalentwicklung liefern können. Es erscheint sinnvoll anzunehmen, dass Neuralrohrdefekte durch Fehlregulationen der an der Neurulation beteiligten Gene entstehen. Am komplexen Prozess der Neuralrohrfaltung sind dabei nicht nur solche Gene beteiligt, die im Neuralrohr selbst exprimiert werden, sondern auch Gene des umgebenden Mesenchyms. Das exakte räumlich-zeitliche Expressionsmuster aller beteiligten Gene sorgt für die Aufrechterhaltung der epidermal-mesenchymalen Zellgrenze, die für die korrekte Ausprägung des Neuralrohrs von höchster Bedeutung ist. Folglich kommen alle Gene, die an der Neurulation beteiligt sind (Neurulationsgene), als NRD Kandidatengene in Frage. Besonders interessant sind dabei diejenigen Entwicklungsgene, deren genmanipulative Veränderung im Tiermodell nachweislich zu Neuralrohrdefekten führt (NRD-Gene).

4.6.1 Tiermodelle

Die Hypothese, dass alle Vertebraten im Verlauf ihrer Embryogenese ein phylogenetisch hoch konserviertes Stadium durchlaufen, wurde 1874 von Haeckel aufgestellt. Damit einher geht die Annahme, dass universelle Mechanismen der Embryonalentwicklung bestehen, die sich bei den einzelnen Spezies nur unwesentlich unterscheiden. Die äußerliche Ähnlichkeit der Embryonen im „Schwanzknospen-Stadium“ (tailbud stage) wurde zurückgeführt auf eine Konservierung des Expressionsmusters von Entwicklungsgenen. Umfassende morphologische Untersuchungen an Embryonen verschiedener Vertebratengattungen stellen diese Vorstellung allerdings in Frage [Richardson et al. 1997]. Es zeigte sich, dass sich der zeitliche Ablauf der Organogenese zwischen den verschiedenen Spezies sehr stark unterscheidet. Ein „einheitliches“ Stadium, das durch die Anwesenheit bestimmter morphologischer Landmarken gekennzeichnet ist, konnte nicht festgestellt werden. Damit ist es auch wahrscheinlich, dass alle Regulationsmechanismen, die über grundlegende Musterbildungsprozesse hinaus gehen, bei jeder Spezies einzigartig sind. Die Nützlichkeit von Tiermodellen für die Erforschung menschlicher Krankheiten muss in diesem Lichte zwar nicht verworfen, bei allem Optimismus aber dennoch kritisch betrachtet werden.

4.6.2 Die Maus als Modell

Die Begeisterung, mit der das Heranziehen der Maus als Modell für menschliche Krankheiten oft propagiert wird, hat durch die Fertigstellung der Sequenzierung des murinen Genoms noch an Auftrieb gewonnen [Waterston et al. 2002]. Die Tatsache, dass die Genome beider Spezies sich auf bemerkenswerte Weise gleichen, lässt vergessen, dass die Unterschiede auf anatomischer, physiologischer und pathologischer Ebene erheblich sind. Trotzdem hat das Mausmodell bei der Aufklärung der genetischen Ursachen von Krankheiten wertvolle Informationen geliefert. Ein Beispiel ist die ADR-Mausmutante, die aufgrund eines genetischen Defekts fehlerhafte Chloridkanäle in Skelettmuskelzellen ausbildet und an Myotonie leidet. Beim Menschen erwiesen sich Mutationen im Gen des Chloridkanals (*CLCN1*) inzwischen als Ursache für Myotonie [Koch et al. 1992]. Bei Krankheiten wie Asthma, Cystischer Fibrose oder Krebserkrankungen waren Erkenntnisse aus der Maus allerdings weniger hilfreich oder sogar irreführend.

Dies kommt vor allem dann vor, wenn die Symptomatik der Maus nicht mit der des Menschen übereinstimmt, auch wenn die gleichen Genprodukte betroffen sind. Das unterschiedliche Krankheitsbild kommt dabei durch Abweichungen in den biochemischen Stoffwechselwegen der beiden Spezies zustande. Zum Beispiel führt der Funktionsverlust von Hexoaminidase A (HEXA), einem Enzym des Gangliosidstoffwechsels, beim Menschen zur Tay-Sachs Erkrankung, die durch schwere neurodegenerative Störungen gekennzeichnet ist. Die Inaktivierung von *Hexa* bei Mäusen dagegen führt zur Akkumulation von Gangliosiden in den Neuronen, ohne motorische oder Lern-Defizite hervorzurufen.

Auch die kurze Lebensspanne der Maus kann zu einem verzerrten Bild von Krankheiten führen, die sich beim Menschen erst in höherem Lebensalter manifestieren. Ein großer Nachteil genetisch manipulierter Mäuse ist, dass es sich meistens um Funktionsverluste des gesamten Gens handelt. Diese Situation im Tiermodell simuliert, möglicherweise erfolgreich, den „loss-of-function“ Effekt von Nonsense-Mutationen beim Menschen. Andere Mechanismen der Krankheitsentstehung, die zum Teil noch nicht aufgeklärt sind (z.B. Auswirkung von Trinukleotid-Expansionen, Positionseffekte usw.) können damit nicht nachgestellt werden. Außerdem ist es möglich, dass die Funktion des Genprodukts weiterhin gewährleistet ist, wenn das verantwortliche Gen zwar auf einem Allel ganz ausgeschaltet ist, das andere Allel aber ein korrektes Protein codiert. Punktmutationen können dagegen zu fehlerhaften Genprodukten führen, die die Funktion des vom anderen Allel translatierten Proteins verhindern. Dies ist beispielsweise bei Proteinen der Fall, deren Funktionalität erst durch die Bildung von Dimeren zustande kommt.

Unterschiede in der Entwicklung von Maus und Mensch sind besonders im Bereich der Gehirnentwicklung zu erwarten, da die Komplexität des Gehirns beim Menschen erheblich größer ist und damit vermutlich von Prozessen gesteuert wird, die keine Entsprechung im Tierreich finden. Im Fall der Neuralrohrdefekte zeigte sich, dass die Maus besonders für craniale Defekte anfällig ist, da der Modus des Neuralrohrschlusses von dem des Menschen abweicht. Die cranialen Neuralwülste des zukünftigen Gehirns sind beim Maus-Embryo stark verdickt und durch die Krümmung des Organismus so weit auseinandergewölbt, so dass der Neuralrohrschluss aus rein mechanistischen Gründen erschwert ist und offenbar leicht gestört werden kann. Die meisten Mäuse mit NRD entwickeln daher eine komplette Exencephalie, was dem Phänotyp der Anencephalie des Menschen entspricht, der aber beim Menschen seltener beobachtet wird. Die beim Menschen häufige Spina bifida aperta dagegen ist bei Mäusen selten.

Tabelle 4-2 Gründe für die Unterschiede zwischen Mensch und Maus

Unterschiede	Erklärung /Beispiel
biochemische Stoffwechselkette	<i>Hexa</i> -Knock-out Mäuse zeigen keinen Tay-Sachs Phänotyp, weil sie einen anderen Gangliosid-Abbau haben
Embryonalentwicklung	andere Expressionsmuster Vorgänge, die keine Entsprechung bei der Maus haben (Gehirnentwicklung des Menschen)
Kürzere Lebensspanne der Maus	Alterungsprozesse sind oft abhängig von der absoluten Zeit
unterschiedliche Gendefekte werden untersucht	gezielte, durch Genmanipulation entstandene Mutationen (Knock-out) oder künstlich erzeugte Mutationen (ENU-Screen) bei der Maus entsprechen nicht dem Mechanismus der Krankheitsentstehung beim Menschen (z.B. Trinukleotid-Expansionen, Positionseffekte)

4.7 Die Rolle von Transkriptionsfaktoren bei der Entstehung von Krankheiten

4.7.1 Funktion von Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren beeinflussen die Expression von Genen durch eine sequenzspezifische Bindung an regulatorische Genelemente (Promotoren, Enhancer, Silencer), die durch die DNA-bindende Domäne des Transkriptionsfaktors vermittelt wird. Während der Embryonalentwicklung bietet diese Funktionsweise von Transkriptionsfaktoren die Möglichkeit, das Expressionsmuster zellspezifisch in einem räumlich und zeitlich genau koordinierten Muster zu regulieren. Transkriptionsfaktoren enthalten meist mehrere Domänen: eine DNA-bindende Domäne, die direkt in Kontakt mit der Ziel-DNA tritt, eine Domäne für Homo- oder Heterodimerisierung, und eventuell Transaktivierungsdomänen. Transaktivierungsdomänen ermöglichen eine Interaktion mit anderen Proteinen, die an der Bindung von RNA Polymerasen an den Promoterbereich beteiligt sind. Dadurch wird eine Steigerung der Effizienz erreicht, mit der der Transkriptions-Komplex aufgebaut und die RNA Polymerase II gebunden werden kann.

Transkriptionsfaktoren werden meist nach der Art der vorhandenen DNA-bindenden Domäne klassifiziert. Ein häufiges, hochkonserviertes Strukturmotiv ist die sogenannte Homeodomäne von Homeobox-Transkriptionsfaktoren. Die Homeodomäne besteht aus einer konservierten Struktur von 60 Aminosäuren, die drei komplex ineinandergefaltete Helices bildet. Helix 1 ist durch eine lockere, schleifenartige Struktur mit Helix 2 verbunden (Helix-Loop-Helix Motiv). Diese wiederum ist mit Helix 3 durch ein kurzes Verbindungsstück verknüpft (Helix-Turn-Helix Motiv). Helix 3, die sogenannte Erkennungshelix, dient dabei zur Vermittlung der DNA-Bindung. Die Sequenzspezifität des Transkriptionsfaktors wird daher hauptsächlich von mehreren Aminosäuren in der Erkennungshelix und dem N-terminalen Arm des Proteins beeinflusst [D'Elia et al. 2001].

4.7.2 Mutationen in Transkriptionsfaktoren als Krankheitsursache

In den letzten Jahren nahm die Erkenntnis zu, dass viele angeborene Erkrankungen auf Mutationen in Homeobox-Transkriptionsfaktoren zurückzuführen sind [Semenza 1998]. Die verschiedenen Mutationsarten (Nonsense, Missense, Frameshift) zeigen dabei eine unterschiedliche Verteilung auf dem Gen. Missense-Mutationen werden häufiger innerhalb der Homeodomäne gefunden, Nonsense- und Frameshift-Mutationen liegen vermehrt außerhalb.

Dies kann damit erklärt werden, dass innerhalb der Homeodomäne selbst kleinste Abweichungen (Missense-Mutation) von der Wildtypsequenz zu einem Protein führen können, das sich auf funktioneller Ebene völlig anders verhält. Die korrekte räumliche Struktur wird möglicherweise nicht erreicht, oder die DNA-Bindungs-Aktivität verändert sich. Die Veränderung kann somit ausreichend sein, um einen Krankheitsphänotyp auszulösen.

Dagegen haben Mutationen in funktionell weniger wichtigen Bereichen möglicherweise nur dann Auswirkungen, wenn sie zu einem verkürzten oder völlig veränderten Protein führen (Nonsense- und Frameshift-Mutationen).

Die meisten Krankheiten, die durch Mutationen in Homeobox-Transkriptionsfaktoren verursacht werden, zeigen ein dominantes Vererbungsmuster (Tab. 4-3). Wenn beobachtet wird, dass Missense-Mutationen einen Phänotyp ergeben, die dem der kompletten Deletion entspricht, ist der dominante Effekt meist auf Haploinsuffizienz zurückzuführen. In einigen Fällen konnte dies durch funktionelle Studien an verkürzten Proteinen nachgewiesen werden (z.B. bei TWIST). Offenbar ist bei Homeobox-Transkriptionsfaktoren die Gendosis für die korrekte Funktion besonders entscheidend.

Tabelle 4-3 Mutationen in Transkriptionsfaktoren als Krankheitsursachen

DNA-bindende Domäne	Gen	Erkrankung	Erbgang	Literatur
Homeobox	<i>PAX3</i>	Waardenburg-Syndrom Typ 1	Autosomal Dominant	[Tassabehji et al. 1992]
	<i>MSX1</i>	familiäre Zahn-Agenesie	Autosomal Dominant	[Vastardis et al. 1996]
	<i>SHOX</i>	Kleinwuchs (Leri-Weill-Syndrom)	Pseudoautosomal Dominant	[Belin et al. 1998]
	<i>MSX2</i>	Craniosynostose	Autosomal Dominant	[Jabs 1998]
T-Box	<i>TBX3</i>	Ulnar-Mammary-Syndrom	Autosomal Dominant	[Bamshad et al. 1997]
	<i>TBX5</i>	Holt-Oram-Syndrom	Autosomal Dominant	[Li et al. 1997]

Eine weitere Familie von Transkriptionsfaktoren besitzt als DNA-bindendes Motiv die sogenannte T-Box Domäne, die zuerst in *Brachyury* (bzw. *T*) beschrieben wurde [Herrmann et al. 1990, Kispert und Hermann 1993]. Die T-Box Domäne umfasst einen Bereich von 180-190 Aminosäuren, deren Lokalisation im Polypeptid variabel ist. Zu den Mitgliedern dieser Genfamilie gehört außer *T* auch die *Tbx*-Unterfamilie sowie *optomotorblind* (*omb*) bei *Drosophila*. Obwohl manche T-Box Gene auch in adulten Geweben exprimiert werden, liegt ihre vorrangige Rolle offensichtlich in der Regulation embryonaler Entwicklungsprozesse [Papaioannou und Silver 1998].

Besonders intensiv untersucht wurde *T*, das mittlerweile bei vielen Spezies bekannt ist (bei Mensch, Maus, Huhn, Zebrafisch, *Xenopus* u.a.). Studien in *Xenopus* haben gezeigt, dass die durch *Xbra* vermittelte gewebstypische Spezifikation und Differenzierung des Mesoderms dosisabhängig reguliert wird [O'Reilly et al. 1995]. Dies ist vermutlich auch bei anderen Transkriptionsfaktoren der T-Box Familie der Fall. Dafür spricht, dass eine durch „loss-of-function“ Mutationen hervorgerufene Abnahme der verfügbaren Proteinmenge zu einem Krankheitsphänotyp führt. Beispiele für angeborene Erkrankungen, die auf Haploinsuffizienz von T-Box Proteinen zurückzuführen sind, sind das Holt-Oram-Syndrom (Mutationen in *TBX5*) und das Ulnar-Mammary-Syndrom (Mutationen in *TBX3*) (Tab. 4-3).

4.8 Methodisches: PCR / SSCA

Um die ausgewählten Kandidatengene auf Sequenzveränderungen bei NRD-Patienten zu untersuchen, wurde die Einzelstrangkonnformationsanalyse (SSCA) angewandt. Diese Methode bietet eine hohe Sensitivität von bis zu 95% bei einem relativ geringen Etablierungs- und Arbeitsaufwand [Sheffield et al. 1993]. Dabei werden durch PCR amplifizierte doppelsträngige DNA-Fragmente denaturiert und auf ein nicht-denaturierendes PAA-Gel aufgetragen. Die Einzelstränge nehmen im Gel eine von der Nukleotidsequenz abhängige räumliche Konformation ein, die das Laufverhalten des DNA-Fragments im Gel beeinflusst. Unterschiede in der Nukleotidsequenz zweier Allele werden im Gel nur unter bestimmten Bedingungen sichtbar, die für jedes PCR-Produkt etabliert werden müssen.

Bei gleichbleibender Gelkonzentration (12%) wurden alle PCR-Produkte bei zwei Gellauf-Temperaturen (10°C und 20°C) untersucht. Ebenso wurde die Größe der PCR-Produkte für eine optimale Sensitivität ausgerichtet (100-300 bp). Trotzdem kann nicht davon ausgegangen werden, dass alle vorhandenen Sequenzveränderungen detektiert werden konnten. Bei besonders GC-reichen Genen (z.B. *TWIST*) ist die Amplifikation durch PCR aufgrund der hohen Schmelztemperatur der DNA-Fragmente erschwert. Der PCR-Reaktion wurden daher Stoffe zugesetzt (DMSO, Betain, Formamid), die eine Herabsetzung der Schmelztemperatur und eine höhere Sequenzspezifität der Primer gewährleisten sollten.

Durch die starken Bindungskräfte bei GC-reichen Sequenzen bewirkt die Mutation einer einzelnen Base möglicherweise keine Konformationsänderung des DNA-Einzelstrangs im Gel und kann somit im SSCA-Gel nicht nachgewiesen werden. Die Problematik bei GC-reichen Sequenzen lässt sich aber auch durch die Anwendung anderer Methoden nicht völlig vermeiden. Bei allen PCR-basierten Methoden ist dabei die Fehlerrate der verwendeten *Taq*-Polymerase zu beachten (1 Fehler pro 10 000 Nukleotide). Um auszuschließen, dass es sich bei den detektierten Sequenzabweichungen um Artefakte handelte, wurde bei allen aberranten DNA-Fragmenten eine weitere PCR-Reaktion durchgeführt und auf SSCA analysiert. Die Wahrscheinlichkeit, dass bei einer weiteren Reaktion ein Fehler an der selben Stelle auftritt, ist verschwindend gering.

Die Methode der SSC Analyse ist vor allem bei einem hohem Probendurchsatz sinnvoll, der mit der Untersuchung zahlreicher PCR-Produkte einhergeht. Die sehr ähnlichen Methoden der denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE) und die Heteroduplexanalyse (HA) basieren wie die SSCA auf PCR und anschließender Analyse des Laufverhaltens in der Elektrophorese. Die DGGE bietet eine hohe Sensitivität, ist aber aufgrund der zeitaufwendigen Optimierung der Bedingungen nur geeignet, wenn nur wenige

unterschiedliche PCR-Produkte untersucht werden sollen. Die HA dagegen erfordert weniger Etablierungsaufwand, erreicht aber nur eine relativ geringe Sensitivität von 80% [White et al. 1992].

Für das Auffinden krankheitsrelevanter SNPs wird in Zukunft vermehrt die DNA-Chip-Technologie eingesetzt werden, da sie den Nachweis mehrerer Tausend SNPs gleichzeitig ermöglicht. Die Erfassung solcher Datenmengen (10 000 SNPs und mehr) erfordert jedoch auch adäquate Möglichkeiten der (statistischen) Auswertung, ohne die eine sinnvolle Interpretation der Ergebnisse unmöglich ist.

4.9 *CART1*

CART1 codiert für einen Transkriptionsfaktor, der zur Klasse der *paired* Homeoproteine gehört (Tab.4-5). Durch Expressionsstudien an Mäuseembryonen konnte gezeigt werden, dass *Cart1* in den Abkömmlingen der Neuralleiste, vor allem im Kopfmesenchym, exprimiert wird [Zhao et al. 1996]. Besonders das Kopfmesenchym unterstützt entscheidend den Ablauf der Neurulation im cranialen Bereich [Chen und Behringer 1995]. Bei homozygoten *Cart1*-Knock-out Mäusen, deren Kopfmesenchym nicht korrekt ausgebildet wird, findet im Bereich des zukünftigen Gehirns kein Neuralrohrschluss statt. Die Mäuse entwickeln eine Exencephalie, bei der sowohl das Gehirn als auch die knöchernen Anteile des Schädels fehlgebildet sind (Abb. 4-1). Besondere Aufmerksamkeit wurde der Beobachtung zuteil, dass der extreme Exencephalie Phänotyp durch Folsäuregaben an das trüchtige Muttertier bei 76% der Nachkommen verhindert werden kann (Folsäure **rescue**) [Zhao et al. 1996]. Außerdem zeigen die Mutanten keine weiteren Fehlbildungen. Damit sprechen alle Kriterien (Expressionsmuster, fehlender Neuralrohrschluss im Tiermodell, Folsäure rescue) für eine wichtige Rolle von *Cart1* bei der Entstehung von NRD.

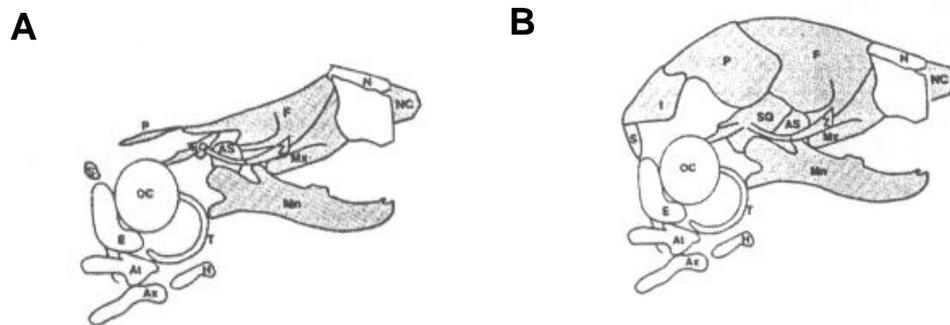


Abbildung 4-1 Schädelvergleich von Wildtyp- und *Cart1*-KO Mäusen

Abbildung 4-1 zeigt, dass bei *Cart1*-KO Mäusen große Anteile des knöchernen Schädels fehlgebildet sind (Frontale, Parietale, Interparietale, Squamosum)

A: *Cart1*-KO-Maus (homozygot)

B : Wildtyp

Obwohl *CART1* eines der vielversprechendsten Kandidatengene für NRD ist, wurde es beim Menschen bisher noch nicht auf seine Beteiligung an NRD untersucht. Dies liegt vermutlich daran, dass die genomische Struktur des Gens bisher nicht bekannt war und erst seit August 2002 in der Datenbank veröffentlicht ist.

Zu Beginn dieser Arbeit waren nur die cDNA Sequenz des Menschen (NM_006982) und der Ratte (NM_012921), sowie die chromosomale Lokalisation beim Menschen auf 12q21 bekannt [Gordon et al. 1996, Zhao et al. 1993]. Informationen über die genomische Struktur waren weder für *CART1* des Menschen noch für das murine Homologon *Cart1* vorhanden. Überraschenderweise war in der Veröffentlichung von Zhao et al. 1996 weder cDNA noch genomische Sequenzen von *Cart1* der Maus zu finden, obwohl eine *Cart1*-KO Maus generiert worden war. Eine persönliche Nachfrage erbrachte auch keine weiteren Informationen (Crombrugge, pers. Mitteilung). Eine Kenntnis der genomischen Organisation von *Cart1* der Maus wäre für diese Arbeit als Anhaltspunkt für die Lage der Introns von Nutzen gewesen, da sich beim Vergleich der vorhandenen cDNA Sequenzen (Mensch und Ratte) die hohe evolutionäre Konservierung des Homeoboxgens zeigte. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die Positionen von Introns bei vielen *paired* Homeoboxgenen konserviert sind, vor allem die Position zwischen Nukleotid 137 und 138 der HD [Bürglin 1994]. Für die Position des potentiellen zweiten Introns in der Homeodomäne von *CART1* lagen damit erste Hinweise vor.

Tabelle 4-4 Klassifizierung von *paired* Homeoproteinen

Klasse	Subklasse	weitere Domänen	Beispiele
<i>paired</i> -class Homeodomäne (HD)	<i>paired</i> -type (auch <i>pax</i> -type) enthalten <i>paired</i> Domäne (PD)		<i>Pax</i> -Genfamilie <i>paired</i>
	<i>paired</i> -like (keine <i>paired</i> Domäne)	OAR Domäne	<i>aristaless</i> <i>Cart1</i>
		keine OAR Domäne	

OAR = *otp*, *aristaless*, *Rx*, auch als *aristaless*-Domäne oder C-peptide Domäne bezeichnet

Aus der Veröffentlichung der *Cart1*-KO Maus war bekannt, dass murines *Cart1* mindestens 3 Exons enthält. Zu Beginn dieser Arbeit wurde daher davon ausgegangen, dass auch humanes *CART1* mehrere Exons besitzt. Um die Exon-Intron-Grenzen zu bestimmen, wurde zunächst der Ansatz der intron-überspannenden PCR gewählt. Intron 1 und 2 konnten auf diese Weise erfolgreich kloniert und sequenziert werden (Kap.3.1). Es zeigte sich, dass Intron 2 in der Homeodomäne an der vorausgesagten Position zwischen Nukleotid 137 und 138 der HD liegt.

Ein weiteres DNA-Fragment aus einer intron-überspannenden PCR (Primerpaar i-8f/i-11r), das das potentielle Intron 3 enthielt, wurde ebenfalls kloniert und sequenziert. Es zeigte sich aber, dass es sich um ein unspezifisches Produkt handelte, das keine Intronsequenzen von *CART1* enthielt. Auch der Versuch, ein weiteres PCR-Produkt (Primerpaar i-9f/i-10r) zu etablieren, das spezifisch Intron 3 amplifizierte, schlug fehl. Die Lage des Vorwärtsprimers war dabei stark eingeschränkt, da Exon 3, wie sich später herausstellte, nur 129 bp groß ist. Da die vorderen 42 bp außerdem in der Homeodomäne liegen, die innerhalb der *paired* Homeoboxgene stark konserviert ist, wurden in diesem Bereich keine Primer gelegt, da die Wahrscheinlichkeit unspezifischer Amplifikationen sehr hoch ist. Der Ansatz der intron-überspannenden PCR führte also im Fall von Intron 3 nicht zum Erfolg.

Aufgrund der unspezifischen PCR-Produkte wurde vermutet, dass noch weitere Mitglieder der Genfamilie amplifiziert werden. Von *ALX3* und *ALX4* ist bekannt, dass sie auf Chromosom 1 bzw. 11 lokalisieren. Zwei *CART1* Primerpaare (1f/1r und 16f/12r-2) wurden daher anhand eines Chromosomenpanels auf ihre Spezifität getestet. Die ausgewählten Primerpaare lagen im vorderen (5'UTR+ Exon 1) bzw. hinteren Bereich (Exon 4+ 3'-UTR) des Gens, und sollten daher spezifisch *CART1* amplifizieren. Es stellte sich heraus, dass selbst Primerpaare, die in weniger konservierten Bereichen liegen, möglicherweise unspezifische Fragmente amplifizieren. Die DNA-Fragmente, die mit PCR-Produkt 16f/12r-2 bei Chromosom 1 auftraten, wurden demnach wahrscheinlich aus *ALX3* amplifiziert.

PCR-basierte Untersuchungsmethoden stellen bei Genen mit stark konservierten Domänen grundsätzlich ein Problem dar, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass weitere Mitglieder der Genfamilie unspezifisch amplifiziert werden. Dies gilt besonders für Klonierungsstrategien, bei denen zufallsbedingt auch ein in geringen Mengen vorhandenes unspezifisches Fragment mit dem Vektor ligieren kann. Ob das klonierte Fragment aus dem erwünschten Gen amplifiziert wurde oder nicht, kann bei noch unbekanntem DNA-Sequenzen schwer beurteilt werden.

Da die Methode der intron-überspannenden PCR nicht weiterführte, wurden weitere Datenbankrecherchen durchgeführt, um neu eingestellte Sequenzdaten auf ihre Ähnlichkeit zu *CART1* zu überprüfen. Es stellte sich heraus, dass ein genomisches Contig einer BAC-Klon Sequenzierung vorhanden war, das den 3'-Bereich von *CART1* enthielt (Exon 4 und möglicherweise den 3'-Bereich von Intron 3). Allerdings konnte in dem 7,7 kb umfassenden Teil des potentiellen Introns kein Übergang in die cDNA Sequenz von Exon 3 festgestellt

werden. Damit stand fest, dass Intron 3 größer als 7,7 kb war und daher nur schwer durch PCR amplifiziert werden konnte. Um den noch fehlenden Übergang von Exon 3 zu Intron 3 zu erhalten, und den Übergang von Intron 3 zu Exon 4 zu verifizieren, sollte der entsprechende Bereich durch Southern Blot Analyse nachgewiesen und kloniert werden.

Als Sonde wurde zunächst eine full-length cDNA von *Cart1* der Ratte (1,7 kb) benutzt, um die optimalen Southern Blot Bedingungen für den Nachweis von *Cart1* in genomischer DNA der Ratte zu etablieren. Da diese heterologe Sonde in humaner DNA allerdings multiple Fragmente detektierte, sollte eine spezifischere Sonde hergestellt werden. Dazu wurde anhand der Sequenz von AC053514 ein PCR-Produkt hergestellt, das Teile der 3'-UTR und weiter stromabwärts gelegene Sequenzen umfasst.

Das Autoradiogramm des Blots zeigte pro Restriktionsspaltung nur je ein Fragment, so dass von einer hohen Spezifität der Sonde ausgegangen werden konnte. Die detektierten Fragmente waren jedoch unerwartet groß (6 – 16 kb), da die durchschnittliche Fragmentgröße bei den verwendeten Restriktionsendonukleasen zwischen 4 und 5 kb liegt (<http://www.neb.com>).

Der Versuch, die nachgewiesenen Fragmente mit pBKS+ zu ligieren, führte nicht zum Erfolg. Dies lag vermutlich daran, dass die Ligation sehr großer (> 6 kb) DNA-Fragmente mit einem Standardvektor problematisch ist. Das Vorhaben, die DNA-Fragmente mit weiteren Restriktionsenzymen zu behandeln, um kleinere Fragmente zu erhalten, wurde verworfen, da die Größe der entstehenden Bruchstücke nicht einzuschätzen war. Es wurde für sinnvoll erachtet, einen Klon zu erhalten, der das gesamte Intron 3 enthielt, um die Übergänge in beide angrenzenden Exons sequenzieren zu können.

Um einen genomischen Klon mit *CART1* Sequenzen zu erhalten, wurde daher das Screening einer humanen genomischen PAC Bank beim Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD) in Auftrag gegeben. Als Sonde für das Screening wurde die selbst hergestellte PCR-Sonde (3'-UTR 2f/2r) verwendet, die sich im Southern Blot als hochspezifisch erwiesen hatte. Die Hybridisierung der Bank mit dieser Sonde ergab positive Signale bei 9 Klonen, die bei der RZPD bestellt und anschließend analysiert wurden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass einer der erhaltenen Klone (H031123) das gesamte humane *CART1*-Gen inklusive aller Introns enthält. Durch die direkte Sequenzierung des Klons konnten die noch fehlenden Übergangsbereiche von Intron 3 zu den angrenzenden Exons sequenziert werden. Damit war es möglich, Primer für den Mutationscreen zu legen, die auch die Spleißstellen der Introns abdecken.

Seit April 2003 ist in GenBank eine genomische Sequenz von *CART1* enthalten, die alle Exons und Introns enthält (NT_019546). Ein Sequenzvergleich mit Sequencher 4.1.1 Software zeigte, dass alle in dieser Arbeit sequenzierten Exon-Intron Übergänge (intron-überspannende PCR-Produkte und PAC Klon H031123) mit NT_019546 übereinstimmen. Daher kann davon ausgegangen werden, dass der genomische Aufbau des Gens korrekt ermittelt wurde.

4.9.1 Sequenzvarianten in *CART1* bei NRD-Patienten

Insgesamt wurden 189 NRD-Probanden und 234 Kontrollpersonen auf Mutationen in *CART1* untersucht. Es wurden insgesamt 7 unterschiedliche Sequenzvarianten (1 in 5'-UTR, 5 exonisch, 1 intronisch) in NRD-Betroffenen bzw. Kontrollpersonen nachgewiesen. Bei sechs dieser Sequenzveränderungen handelt es sich offenbar um Polymorphismen, da sie in mehr als 1% der untersuchten Personen auftraten. Die Genotypverteilungen der sechs Polymorphismen wiesen bei Betroffenen und Kontrollen keinen statistisch signifikanten Unterschied auf (alle p-Werte > 0,12).

Bei einer SBA-Patientin und ihrer Mutter konnte eine Missense-Mutation (574C> T, R192C) entdeckt werden, die weder beim gesunden Halbbruder der Patientin noch bei 234 gesunden Kontrollpersonen auftrat. Der Basenaustausch verändert die erste Aminosäure nach der Homeodomäne (Position 192) von Arginin zu Cystein. Der AS-Vergleich zeigt, dass diese Aminosäure sowohl innerhalb homologer *Cart1* Proteine mehrerer Spezies als auch unter anderen Mitgliedern der *CART1* Genfamilie (ALX3 und ALX4) einen hohen Konservierungsgrad aufweist. Möglicherweise wird die Funktionalität des Proteins (z.B. DNA-Bindungsvermögen) durch die veränderte Aminosäure beeinflusst. Cystein ist außerdem aufgrund seiner Fähigkeit, Schwefelbrücken ausbilden zu können, eine Aminosäure, die besonders großen Einfluss auf die Stabilität des Proteins nehmen kann. Da die Sequenzvariante allerdings auch bei der gesunden Mutter der Patientin auftrat, ist sie sicher nicht allein ursächlich für die Erkrankung der untersuchten Patientin.

Insgesamt zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass *CART1* trotz überzeugender Argumente aus dem Tiermodell offenbar keine Schlüsselrolle bei der Entstehung von NRD spielt. Die Erwartung, Mutationen zu entdecken, die ausschließlich bei Patienten auftreten und deren Ausprägung und Lage eine entscheidend veränderte Proteinfunktion vermuten lässt, hat sich damit nicht erfüllt.

Vor diesem Hintergrund muss die Eignung der *Cart1*-KO Maus als Modell für NRD beim Menschen kritisch hinterfragt werden.

4.9.2 *Cart1*-KO Maus als Modell für NRD beim Menschen

Die bei der *Cart1*-KO Maus beschriebene Defekt ist die bei der Maus häufig vorkommende NRD-Form Exencephalie, bei der der gesamte Schädel (Gehirnsubstanz und Knochen) fehlgebildet ist. Die entsprechende Form beim Menschen wird als Anencephalus bezeichnet. Die meisten der in dieser Arbeit untersuchten NRD-Betroffenen (~ 95%) zeigen jedoch eine SBA. Falls der Funktionsverlust von *CART1* speziell craniale Defekte hervorruft, sind SBA-Patienten für die Untersuchung von *CART1* als Risikofaktor keine besonders geeignete Gruppe. Allerdings konnte in keinem der 9 anencephalen Feten, die zur Untersuchungsgruppe gehörten, eine Sequenzveränderung in *CART1* nachgewiesen werden.

Bei der Untersuchung der *Cart1*-KO Mäuse stellte sich heraus, dass der genetische Hintergrund, d.h. der verwendete Mausstamm entscheidend dafür war, wie viele der Jungtiere einen NRD entwickelten (Tab. 4-5). Dies kann durch das Vorhandensein von modifizierenden Genen erklärt werden, die eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Krankheiten spielen. Sie beeinflussen Penetranz, Expressivität und dominante Modifikation eines Genlocus. Selbst bei Mäusen, deren genetischer Hintergrund durch Inzucht sehr einheitlich ist, manifestiert sich der Phänotyp einer Mutation oft nicht bei 100% der Tiere. Die vielfältigen Möglichkeiten der Einflussnahme von modifizierenden Genen sind auch beim Menschen bekannt [Nadeau 2001](Tab. 4-6).

Tabelle 4-5 Einfluss des genetischen Hintergrunds von homozygoten *Cart1*-KO-Mäusen auf den NRD-Phänotyp

genetischer Hintergrund (Mausstamm)	Anzahl der homozygoten mit NRD	Anzahl der homozygoten ohne NRD	Gesamtzahl
C57BL/6 x 129/SvEv	22 (69 %)	10 (31 %)	32
129/SvEv	13 (100 %)	0	13

Tabelle 4-6 Beispiele für modifizierende Gene und ihre phänotypischen Auswirkungen

mutiertes Gen	modifizierendes Gen	Effekt	Wirkung
Beispiele bei Mausmutanten			
<i>Pax3 (splotch)</i>	<i>Fign (fidget)</i>	Suppressor	unterdrückt Spina bifida
<i>Pach (Ph)</i>	<i>Pax1^{un} (undulated)</i>	neuer Phänotyp	SBO in <i>Ph/+ un/un</i> Mäusen
<i>Pax3 (splotch)</i>	<i>Curly tail (ct)</i>	neuer Phänotyp	extremere Form der SB bei <i>Sp/+ ct/ct</i> Mäusen
<i>Pax1 (undulated)</i>	genetischer Hintergrund	Penetranz	Auswirkung auf Vorhandensein von Foramina transversaria
Beispiele beim Menschen			
<i>PRP1</i>	<i>ROM1</i>	Modifikation der Dominanz	Retinitis pigmentosa bei <i>PRP1/+</i> Heterozygoten
<i>CFTR</i>	<i>CFM1</i>	Suppressor	unterdrückt Darmverschluss
<i>DFNB26</i> (nicht-syndromale Gehörlosigkeit)	mindestens ein Gen auf Chromosom 7	Penetranz	unterdrückt Gehörlosigkeit

Möglich ist auch, dass der präventiven Wirkung von Folsäure bei der *Cart1*-KO Maus zuviel Bedeutung zugemessen wird. *Cart1* ^{-/-} Jungtiere mit Folsäuresupplementierung sterben trotz äußerlich normal ausgebildeter Schädel innerhalb weniger Tage ebenso wie die unbehandelt gebliebenen Jungtiere [Zhao et al. 1996]. Die Autoren führen dies auf eine fehlerhafte Gehirnentwicklung zurück, die trotz der normalen Ausbildung der Schädelknochen entsteht. Bisher wurde nicht untersucht, ob zusätzliche Folsäuregaben zwar die Manifestation eines NRD verhindern (und damit evtl. das Absterben des Embryos), aber möglicherweise andere Schädigungen des ZNS zurücklassen. Es ist durchaus vorstellbar, dass Folsäure über einen Mechanismus wirkt, der den Organismus auch bei ungünstigen genetischen Voraussetzungen über die kritische (Überlebens-) Schwelle bringt, der weitere, weniger augenscheinige Defekte aber nicht verhindern kann. Angesichts dieses Wissensdefizits erscheint es fragwürdig, nicht nur Frauen mit Kinderwunsch, sondern auch der Gesamtbevölkerung tägliche Folsäuredosen zu empfehlen, die einem Vielfachen der Menge entsprechen, die mit normaler Ernährung aufgenommen wird. In den USA wird die Anreicherung von Grundnahrungsmitteln mit Folsäure seit einigen Jahren praktiziert, Langzeitstudien über die Auswirkungen dieser Supplementierung stehen aber noch aus.

4.10 *BMP4*

Das sezernierte Polypeptid BMP4 der TGF- β Genfamilie spielt zusammen mit seinem Antagonisten Noggin eine wichtige Rolle bei der Musterbildung des dorsalen Neuralrohrs [Bronner-Fraser und Fraser 1997, Nakayama et al. 2000]. Bei Huhn und Maus wird *Bmp4* zunächst im epidermalen Ektoderm exprimiert, das direkt an die Neuralplatte angrenzt [Liem et al. 1997, Winnier et al. 1995]. Später wird *Bmp4*, zusammen mit weiteren dorsalen Markergenen wie *Msx1*, *Pax3* und *Slug*, im dorsalen Bereich des sich entwickelnden Neuralrohrs exprimiert, wodurch der ventralisierende Effekt von *Shh* neutralisiert wird. Der Beginn der Migration von Neuralleistenzellen wird ebenfalls von *Bmp4* und *Noggin* koordiniert [Sela-Donenfeld und Kalcheim 1999]. Die Autoren postulieren, dass *Bmp4* die Delamination der Neuralleistenzellen von den äußeren Enden der Neuralfalten auslöst. Ein Anstieg von *Bmp4* wird dabei durch gezielte Herunterregulation seines Inhibitors *Noggin* entlang der rostro-caudalen Achse des Neuralrohrs erreicht.

Von BMP4 wird zunächst ein Vorläuferprotein hergestellt, das aus einer Pro-Region und dem eigentlichen funktionellen Teil des Proteins besteht. Im Rahmen eines Reifungsprozesses erfolgt eine Dimerisation des Vorläuferproteins über Disulfid-Brücken in der C-terminalen Region. Danach erfolgt eine proteolytische Spaltung des Proteins, das erst in dem dadurch erreichten reifen Zustand aus der Zelle ausgeschleust werden kann [Constam und Robertson 1999]. Falsch gefaltete Proteine können nicht aus der Zelle transportiert werden und verbleiben im Endoplasmatischen Retikulum [Hammond und Helenius 1995].

Da die wichtige Rolle von *Bmp4* während der Neurulation durch Expressionsstudien im Tiermodell demonstriert werden konnte, wurde das humane Homologon *BMP4* in einem Mutationsscreen bei 179 SBA-Patienten untersucht. Bei vier Patienten konnten Missense-Mutationen (S91C, T225A, R226W, S367T) im codierenden Bereich des Gens (Exon 4 und 5) nachgewiesen werden, die in allen Fällen von einem Elternteil vererbt wurden. Zwei dieser Sequenzvarianten (S91C, R226W) traten auch bei gesunden Kontrollen auf.

Drei Missense-Mutationen (S91C, T225A, R226W) traten in der Pro-Region des Proteins auf. Obwohl diese Region vom Rest des Proteins abgespalten wird, ist sie für die Funktion essentiell, da Sequenzveränderungen in dieser Region die Stabilität des reifen Proteins beeinflussen [Constam und Robertson 1999].

Eine der Missense-Mutationen (S367T) lag innerhalb der funktionell wichtigen C-terminalen TGF- β Domäne (Abb.3-16), die die für BMPs charakteristischen sieben hoch konservierten Cysteine enthält [Ducy und Karsenty 2000]. Inwiefern die nachgewiesenen Sequenzveränderungen relevant für die Entstehung des NRD-Phänotyps der Patienten war, kann nicht abschließend beurteilt werden. Da alle Varianten auch bei gesunden Kontrollen gefunden wurden, sind sie allein offenbar nicht ursächlich für den NRD. Allerdings ist es möglich, dass geringfügige Veränderungen in Stabilität und/oder Aktivität des Proteins zur Entstehung des Defekts bei einzelnen Patienten beigetragen haben.

179 SBA Patienten und 161 Kontrollpersonen wurden für den Polymorphismus *BMP4* 455T? C (V152A) typisiert. Die Allelfrequenzen der beiden Allele (455T und 455C) waren bei Patienten und Kontrollen annähernd gleich. Umso erstaunlicher war, dass die weitere statistische Analyse unterschiedliche Genotypverteilungen ergab. 455TC Heterozygote waren signifikant häufiger bei Kontrollpersonen zu finden, als bei Patienten ($p=0,017$). Der Überschuss an Heterozygoten bei gesunden Personen führte zu einer signifikanten, Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ($p=0,01$). Weichen die (aufgrund der gegebenen Allelfrequenzen) erwarteten Genotypfrequenzen bei Kontrollpersonen vom HWG ab, kann zunächst ein Stratifikationseffekt vermutet werden. Dies lässt sich auch in diesem Fall nicht ausschließen, obwohl die Kontrollgruppe mit Sorgfalt ausgewählt wurde (Kap.4.14.2). In der bisher einzigen anderen Studie, in der die Genotypverteilung von 455T? C bei Kaukasiern untersucht wurde, wurden nur sehr geringe Fallzahlen ($n=30$) typisiert. Die Genotypfrequenzen in dieser Studie entsprachen den erwarteten Werten [Mangino et al. 1999]. Um festzustellen, ob 455TC Heterozygote tatsächlich einen Selektionsvorteil besitzen, müsste eine größere Anzahl gesunder Personen (auch anderer Populationen) untersucht werden. Die Frage, worin dieser Selektionsvorteil bestehen könnte, kann zu diesem Zeitpunkt nicht beantwortet werden, da über die möglichen funktionellen Auswirkungen des SNP keine Erkenntnisse vorliegen.

Trotz des eindeutigen Unterschieds in der Genotypverteilung der 455TC Heterozygoten ($\sim 60\%$ bei Kontrollen versus $\sim 45\%$ bei NRD-Patienten) kann der Polymorphismus aber nicht als Risikofaktor für NRD interpretiert werden, zumal kein biologisches Modell für den potentiellen Wirkmechanismus existiert.

4.11 *T*

Der Transkriptionsfaktor *T* gilt aufgrund des Phänotyps der *Brachyury* Mausmutante (short tail) als NRD-Kandidateng. Die spontan entstandene Deletion des gesamten Gens verursacht bei homozygoten *Brachyury* null-Mutanten Defekte in allen mesodermalen Strukturen, was zu einem Absterben der Embryonen noch im Mutterleib führt. Heterozygote Mutanten sind dagegen überlebensfähig, zeigen jedoch verschiedene Fehlentwicklungen. Das augenfälligste Merkmal ist der verkümmerte, kurze Schwanz, der vermutlich durch eine fehlerhafte Ausbildung der Chorda dorsalis hervorgerufen wird. Im caudalen Bereich ist außerdem die Entwicklung des Neuralrohrs gestört, das hier mit dem Darm fusioniert [Wilson et al. 1993]. Die *Brachyury* Mausmutante ist daher eines der wenigen NRD-Mausmodelle, die keine cranialen Fehlbildungen zeigt, sondern Defekte im lumbo-sakralen Bereich. Man stellt sich vor, dass im Übergangsbereich zwischen primärer und sekundärer Neurulation möglicherweise Fehlentwicklungen auftreten können, die zur Ausbildung sakraler Defekte führen.

Das humane *T* Gen wurde als erstes von [Morrison et al. 1996] auf seine Beteiligung an der Entstehung von NRD untersucht. Es stellte sich heraus, dass das Allel IVS7+79C (Allel 2) des intronischen SNP IVS7+79TC mit dem Auftreten von familiärer Spina bifida assoziiert ist ($p = 0,02$). In einer Folgestudie konnte diese Assoziation bestätigt werden [Morrison et al. 1998]. Bei sporadischen SBA-Fällen trat diese Assoziation jedoch nicht auf.

In der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, ob auch in der deutschen Population eine Assoziation zwischen NRD und IVS7+79C (Allel 2) vorhanden ist [Richter et al. 2002]. Dazu wurden 183 NRD-Patienten und 266 Kontrollpersonen für IVS7+79TC typisiert. Es konnte keine Assoziation von Allel 2 mit dem Auftreten von NRD festgestellt werden ($p = 0,70$). Allerdings beinhaltet das verwendete Patientengut hauptsächlich sporadische Fälle ($n = 168$). Die wenigen familiären Fälle ($n = 11$) wurden im statistischen Test zusammen mit den sporadischen berechnet. Falls der SNP tatsächlich nur bei familiären SBA einen Risikofaktor darstellt, wurde durch die geringe Anzahl der familiären Fälle die Power der Teststatistik stark herabgesetzt, so dass eine möglicherweise vorhandene Assoziation nicht nachgewiesen werden konnte. Dagegen spricht jedoch, dass beide Allele (IVS7+79T und IVS7+79C) auch bei den familiären Fällen gleich häufig vorkommen. Studien in anderen Populationen, bei denen sporadische NRD auf die Allelfrequenzen von IVS7+79TC überprüft wurden, kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass die Transmissionsrate beider Allele nahezu gleich war [Trembath et al. 1999].

Der SNP IVS7+79TC liegt weder innerhalb der Konsensussequenz der Spleißdonorstelle noch innerhalb anderer, für den Mechanismus des Spleißens wichtiger, konservierter Sequenzen (z.B. einer bekannten *branch site*). Über die funktionelle Auswirkung des SNPs kann daher keine Aussage gemacht werden. Es ist möglich, dass die in anderen Studien aufgetretene positive Assoziation von Allel 2 mit familiären SBA auf eine Cosegregation des SNPs mit einer weiteren, funktionell relevanten Mutation zurückzuführen ist, die noch nicht untersucht wurde.

Der SNP IVS7+79TC in Intron 7 des humanen *T* Gens stellt nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit in der deutschen Population keinen Risikofaktor für SBA dar. Da alle bisherigen Studien nur bei familiären SBA positive Assoziationen mit Allel 2 des SNP zeigten, kann davon ausgegangen werden, dass IVS7+79TC bei den sehr viel häufigeren sporadischen Fällen nicht zur Entstehung des Defekts beigetragen hat.

4.12 *PDGFRa*?

PDGFRa (Platelet-derived growth factor receptor alpha) codiert für einen Tyrosinkinase-Rezeptor, dessen Funktionsverlust in mehreren Mausmodellen zu NRD führt. Sowohl die homozygote *Patch* Mausmutante als auch homozygote *Pdgfra* Knock-out Mäuse entwickeln schwere Formen von Spina bifida [Payne et al. 1997, Soriano 1997, Stephenson et al. 1991]. Mutationen in Genen, die die Transkription von *Pdgfra* regulieren (z.B. *Pax1*) sind ebenfalls mit SBA assoziiert [Hol et al. 1996, Joosten et al. 1998]. Dies spricht dafür, dass eine fehlerhafte Expression von *Pdgfra* mit einer Prädisposition für SB einhergeht.

Nachdem der Promoter von *PDGFRa* funktionell charakterisiert wurde [Afink et al. 1995], konnte festgestellt werden, dass in diesem Bereich mehrere SNPs liegen [Joosten et al. 2001]. Es treten bestimmte *PDGFRa* Promotor-Haplotypen auf, die einen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität des Gens haben. Die Studie von [Joosten et al. 2001] zeigt, dass eine bestimmte Promoter-Haplotyp Kombination (H2a/H2b?? mit dem Auftreten von sporadischen NRD assoziiert ist.

Diese Hypothese wurde in dieser Arbeit durch die Untersuchung von 193 NRD-Patienten auf ihre Promotor-Haplotyp Kombination in *PDGFRa* überprüft. Es konnte bestätigt werden, dass die beiden Hauptallele (H1 und H2a??den größten Anteil (~ 88%) aller insgesamt fünf Haplotypen ausmachen. Es konnte jedoch keine Assoziation zwischen der Genotypverteilung der beiden Hauptallele und dem Vorhandensein eines NRD festgestellt werden ($p = 0,56$).

Die Typisierung der Probanden für die fünf SNPs wurde mittels PCR und SSCA durchgeführt. Es wurde nicht überprüft, welche der charakterisierten SNPs auf einem Allel liegen. Dazu hätten multiple allelspezifische PCR-Reaktionen oder eine Sequenzierung des gesamten Bereichs durchgeführt werden müssen. Aufgrund der hohen Gesamtzahl aller typisierter Probanden (193 NRD-Patienten und 162 Kontrollpersonen) und der Tatsache, dass die SNPs z.T. weit auseinanderliegen, wurde davon abgesehen. Es wurde jedoch davon ausgegangen, dass das Auftreten weiterer, noch nicht beschriebener Haplotypen vernachlässigbar selten ist. Fälle, bei denen die Typisierungsergebnisse den Erwartungen nicht entsprachen (d.h. vermutlich einen neuen Haplotyp darstellten), wurden nicht in die Auswertung miteinbezogen. Bei der Berechnung der Statistik wurden ebenfalls nur die häufigen Hauptgenotypen berücksichtigt, da alle anderen Allele zu selten auftreten. Damit ist der Fehler, der möglicherweise durch seltene, unentdeckte Haplotypen aufgetreten sein mag, sehr klein.

In der Studie von Joosten et al. 2001 ist das H1 Allel bei allen untersuchten SBA Patienten (sporadisch und familiär) unterrepräsentiert ($p < 0,01$); bei sporadischen Fällen tritt der Genotyp H1/H1 überhaupt nicht auf. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Der H1/H1 Genotyp tritt bei den hier untersuchten NRD-Patienten häufiger auf als bei Kontrollpersonen. Dies steht im direkten Gegensatz zur Arbeit von [Joosten et al. 2001], bei der die Autoren ihre Ergebnisse dahingehend interpretieren, dass die Haplotypkombination H1/H1 gegen die Entstehung von SBA selektiert. Die Feststellung, dass die *in vitro* Promotoraktivitäten der Haplotypen H1 und H2a signifikant verschieden sind, spricht dabei für mögliche funktionelle Auswirkungen der *PDGFRa* Promotor-Haplotypen *in vivo*.

Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass in der Studie von [Joosten et al. 2001] eine geringe Anzahl an Probanden untersucht wurde (31 familiäre SBA, 28 sporadische SBA, 47 Kontrollpersonen). Die von den Autoren angewandte Methode der Sequenzierung zur Bestimmung des Haplotyps erlaubt kaum höhere Probandenzahlen. Die geringe Gruppengröße muss bei der Interpretation der statistischen Ergebnisse aber unbedingt berücksichtigt werden. Solange nicht geklärt ist, ob und wenn ja, welche *PDGFRa* Promotor-Haplotypen wirklich häufiger bei NRD-Patienten vorkommen, ist auch die Interpretation funktioneller Studien unmöglich. Die Verteilung von *PDGFRa* Promotor-Haplotypen sollte daher zunächst in weiteren Studien mit ausreichend hohen Probandenzahlen untersucht werden, um eine Argumentationsgrundlage für eventuelle Unterschiede in den resultierenden Promotoraktivitäten zu bekommen.

4.13 TWIST

TWIST gehört zur Gruppe der basischen Helix-Loop-Helix (bHLH) Transkriptionsfaktoren. Ursprünglich wurde *twist* als Letalmutation in *Drosophila* identifiziert, bei der aufgrund einer gestörten Mesoderm-Differenzierung keine Gastrulation stattfinden kann [Simpson 1983]. Expressionsstudien bei *Xenopus* und der Maus haben jedoch gezeigt, dass *Twist* in Vertebraten erst nach Beginn der Gastrulation exprimiert wird. In der frühen Embryonalentwicklung der Maus wird *Twist* in Zellen mesodermalen Ursprungs sowie in der Neuralleiste und ihren Abkömmlingen (Kopfmesenchym) exprimiert [Füchtbauer 1995, Gitelman 1997].

Die Unterstützung durch das Kopfmesoderm hat sich im Mausmodell schon bei anderen Genen (z.B. *Cart1*) als essentiell für den korrekten Ablauf der Neurulation im cranialen Bereich erwiesen. Man vermutet, dass die Wölbung und exakte Gegenüberstellung der Neuralfalten vom Mesenchym koordiniert wird. Für diese Hypothese spricht auch der Phänotyp von homozygoten *Twist*-KO Mäusen, die eine schwere Exencephalie entwickeln und noch *in utero* sterben [Chen und Behringer 1995].

TWIST wurde daher in der vorliegenden Arbeit als Kandidatengen für humane NRD ausgewählt. Es wurden 188 NRD-Betroffene mittels PCR/SSC Analyse auf Sequenzvarianten in *TWIST* untersucht. Überraschenderweise wurden bei keiner der betroffenen Personen Sequenzveränderungen nachgewiesen. Möglicherweise ist die Methode der SSCA für Gene mit hohem GC-Gehalt nicht besonders günstig, da durch den starken Zusammenhalt der GC-Bindung die Sensitivität der SSCA herabgesetzt wird. Allerdings hätten trotz niedrigerer Sensitivität vorhandene Polymorphismen entdeckt werden können.

Offenbar ist *TWIST* extrem stark konserviert, um die Funktionalität des Proteins zu gewährleisten. Bei Mäusen manifestiert sich der schwere NRD-Phänotyp zwar nur bei homozygoten *Twist*-null Mutanten, die homozygoten Tiere entwickeln jedoch ebenfalls Defekte im Schädelbereich, weswegen *Twist* auch als Kandidatengen für Craniosynostosen gilt. Dementsprechend wurden bei Patienten mit Saethre-Chatzen-Syndrom, einer syndromalen Form der Craniosynostose, Mutationen in funktionellen Bereichen von *TWIST* gefunden [Gripp et al. 2000]. Das Spektrum erstreckt sich dabei von Missense- und Nonsense-Mutationen bis zu intragenischen Insertionen und Deletionen [El Ghouzzi et al. 1997].

Funktionelle Studien konnten zeigen, dass die Mutationen entweder eine erniedrigte Stabilität des Proteins bewirken, zum Verlust der Dimerisierungsfähigkeit führen oder eine falsche zelluläre Lokalisation verursachen [El Ghouzzi et al. 2000]. Es konnte so bestätigt werden, dass Haploinsuffizienz der pathogene Mechanismus ist, wofür auch das dominante Vererbungsmuster spricht. Da Mutationen in *TWIST* beim Menschen zu Craniosynostosen führen, sofern sie in heterozygotem Zustand vorliegen, sind homozygote Mutationen (die bei der Maus NRD hervorrufen) möglicherweise auch beim Menschen frühembryonal letal.

4.14 Statistische Methoden

4.14.1 Phänotypische und ätiologische Heterogenität von NRD

Die Heterogenität der phänotypischen Ausprägung von NRD macht es wahrscheinlich, dass den verschiedenen Formen der Fehlbildung unterschiedliche Gendefekte zugrunde liegen. Um genetische Ursachen von NRD auszumachen, ist es daher sinnvoll, die in Assoziationsstudien untersuchten NRD-Betroffenen in möglichst homogene Untergruppen einzuteilen („Schichtenbildung“). Ein Gen-Effekt kann nur nachgewiesen werden, wenn er bei den meisten Betroffenen ursächlich für die Erkrankung ist. Die übliche anatomische Klassifizierung der Fehlbildung (die auch in dieser Arbeit verwendet wurde) entspricht nicht unbedingt den verschiedenen Verschluss-Störungen des Neuralrohrs. Es wäre daher wünschenswert, eine genauere Einordnung der einzelnen Fehlbildungsformen vorzunehmen. Dies ist auch von Bedeutung, weil zusätzlich zu der äußerlich sichtbaren Fehlbildung oft noch weitere Defekte der Wirbelsäule und des Rückenmarks auftreten (z.B. Tethered Cord), die nur durch besondere Untersuchungsmethoden (Magnet-Resonanz-Tomographie) festgestellt werden können. Solche kostenaufwändigen Untersuchungen werden aber ohne medizinische Notwendigkeit nicht durchgeführt. Bei den meisten NRD-Patienten liegen daher keine Informationen über derartige Schädigungen vor, die zwar nicht zu Symptomen führen, aber dennoch eine universelle Störung des Neurulationsprozesses widerspiegeln.

4.14.2 Wahl der Kontrollgruppe

Die Aussagekraft einer Fall-Kontroll-Studie hängt entscheidend von den gewählten Kontrollpersonen ab. Sowohl Betroffene als auch Kontrollen sollten aus einer Population stammen und sich nur in Bezug auf ihren Status als „NRD-Betroffener“ bzw. „ohne NRD“ unterscheiden („Matching“). Durch inadäquate Wahl der Kontrollen kann es zu irreführenden Resultaten durch sogenannte „Störvariablen“ kommen. Das Auftreten bestimmter Allele unterscheidet sich innerhalb verschiedener Populationen und muss demnach nicht ursächlich für die Entstehung der Erkrankung sein.

Ein besonderes Problem stellt dies in Bevölkerungen dar, die durch einen traditionell hohen Anteil von Immigranten genetisch sehr inhomogen sind, wie z.B. die US-amerikanische Bevölkerung. Die NRD-Prävalenz ist hier bei Weißen etwa doppelt so hoch wie bei Schwarzen [Schiltenswolf und Carstens 1990]. Nichtbeachtung dieser erheblichen Populationstratifikation kann zu falsch-positiven Assoziationsergebnissen führen.

Auch das Alter von Betroffenen und Kontrollpersonen sollte vergleichbar sein, da bestimmte Risikoallele bei älteren Personen möglicherweise seltener sind, verursacht durch eine niedrigere Lebenserwartung (Herz-Kreislauf-Erkrankungen). Da bekannt ist, dass auch Umweltfaktoren bei der Entstehung von NRD eine Rolle spielen, müssten sich Betroffene und Kontrollgruppe idealerweise auch in Geschlechterverteilung, Ernährungsgewohnheiten und anderen Faktoren des Lebensstils (Raucher/Nichtraucher, Medikamenteneinnahme) entsprechen. Dies ist jedoch in der Regel nicht realisierbar.

Um Stratifikationseffekte zu vermeiden, wurde die in dieser Arbeit untersuchte Kontrollgruppe sowie die NRD-Betroffenen aus der deutschstämmigen Population ausgewählt. Personen, die offenbar einer anderen Ethnie angehörten, wurden nicht in die Untersuchungsgruppe aufgenommen. Die Betroffenen wurden über eine NRD-Ambulanz rekrutiert und repräsentieren daher ein breites sozioökonomisches Spektrum. Die Kontrollpersonen wurden hauptsächlich aus Studenten und Angestellten der Philipps-Universität Marburg rekrutiert. Es wurde sichergestellt, dass weder bei Kontrollpersonen noch Angehörigen ersten Grades NRD bekannt waren. In Alter und Geschlechtsverteilung entsprachen die Kontrollpersonen etwa den Betroffenen. Tabelle 4-7 zeigt die Berücksichtigung verschiedener Faktoren bei der Auswahl der Kontrollgruppe in der vorliegenden Arbeit.

Tabelle 4-7 Parameter bei Fall-Kontroll-Studien zur Vermeidung von Stratifikationseffekten

	Parameter	in der vorliegenden Arbeit berücksichtigt
NRD-Probanden	anatomische Einteilung (SBA, A+C, E)	+
	embryologische Einteilung (Verschluss-Stellen 1-3)	-
Kontrollpersonen	kein NRD	+
	keine SBO	-
	NRD bei Verwandten 1.Grades	+
Matching	Ethnie	+
	Alter	+
	Geschlecht	+
	sozioökonomische Gruppe	-
	Lebensstil	-

4.14.3 Wahl des statistischen Testverfahrens

Ebenfalls entscheidend für das Resultat einer Assoziationsstudie ist die angewendete Teststatistik. Selbst bei der Verwendung derselben Studiendaten können die einzelnen Testverfahren zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen. Dies liegt daran, dass bei jedem statistischen Test Annahmen über den biologischen Mechanismus des überprüften Parameters gemacht werden, auf denen die Berechnung basiert. Wenn beispielsweise bekannt ist, dass die Auswirkung eines Genprodukts dosisabhängig ist, kann ein Allel auch im heterozygoten Zustand krankheitsauslösend wirken (Haploinsuffizienz). Bei SNPs, die keine unmittelbaren Auswirkungen auf die AS-Sequenz eines Genprodukts haben, besteht dagegen vorerst keine Hypothese darüber, welches Allel prädisponierend für die Erkrankung sein könnte.

Der Cochran-Armitage Trend Test wird angewendet, um Dosis-Wirkungsbeziehungen zwischen Populationen zu testen, bei denen ein ansteigender (oder absteigender) Trend bezüglich des getesteten Merkmals vorliegt. In dieser Arbeit wurde der Cochran-Armitage Trend Test immer dann angewandt, wenn alle drei Genotypen gleichrangig auf ihre Assoziation mit der Erkrankung getestet werden sollten. Der Test setzt allerdings einen monoton steigenden Zusammenhang zwischen Genotyp und Risiko voraus (z.B. TT gesund, TC 50% krank, CC 100% krank). Ob dieses Modell für den Erkrankungsmodus bei NRD angemessen ist, kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht entschieden werden. Durch die Anwendung des Cochran-Armitage Trend Test lässt sich aber vermeiden, dass (möglicherweise willkürliche) Gruppen aus den Genotypen gebildet werden müssen, da andere Testverfahren (z.B. Chi-Quadrat-Tests) auf einer Vierfeldertafel beruhen.

Tabelle 4-8 Statistische Tests für binomial verteilte Merkmale

Art der Stichprobe	verwendeter Test
zwei unverbundene Stichproben (z.B. Betroffene und Kontrollen)	Chi-Quadrat-Tests, für Vierfeldertafeln anwendbar; z.B. Fisher's Exact Test (bei kleiner Gruppengröße); Pearson's Chi-Quadrat-Test Cochran-Armitage Trend Test (kann für beliebige Kontingenztafeln angewendet werden)
zwei verbundene Stichproben (z.B. Betroffene und ihre Eltern)	McNemar-Test (nur auf Vierfeldertafeln anwendbar)

Binomial verteilte (oder dichotome) Merkmale sind Merkmale, die nur in zwei Ausprägungen vorliegen (z.B. 2 Allele einer Sequenzvariante)

4.15 Ausblick

Die in den vergangenen Jahrzehnten erreichten Fortschritte der biomedizinischen Forschung bei der molekulargenetischen Aufklärung von Erbkrankheiten betrafen vor allem Erkrankungen mit einfachen mendelnden Erbgängen. Die genetischen Ursachen komplexer Erkrankungen sind dagegen weitaus schwieriger festzumachen, da angenommen wird, dass erst das Zusammenspiel mehrerer prädisponierender Gene und Umweltfaktoren letztendlich zur Manifestation des Krankheitsbildes führt. Das häufige Auftreten komplexer Erkrankungen in der Bevölkerung ist von erheblicher gesundheitsökonomischer Relevanz. Eine große zukünftige Herausforderung der Molekulargenetik liegt daher in der Entschlüsselung genetischer Faktoren, die zur Entstehung komplexer Krankheiten beitragen.

Man nimmt an, dass Neuralrohrdefekte zu diesen komplexen Erkrankungen gehören. In der vorliegenden Arbeit wurden daher mehrere Entwicklungsgene analysiert, die im Tiermodell zu NRD führen und/oder eine wichtige Rolle bei der Neurulation spielen. Bei drei Genen (*CART1*, *BMP4*, *TWIST*) wurde der gesamte offene Leserahmen auf Mutationen untersucht. In einzelnen NRD-Patienten wurden Sequenzveränderungen gefunden, die möglicherweise Auswirkungen auf die Funktion des Proteins haben. Obwohl alle Sequenzvarianten auch bei gesunden Personen (zumindest bei einem gesunden Elternteil) auftraten, können sie als NRD-Risikofaktoren nicht völlig ausgeschlossen werden.

Desweiteren wurden in dieser Arbeit Fall-Kontroll-Studien zur Genotypverteilung von SNPs (*BMP4*, *T*) bzw. Promotor-Haplotypen (*PDGFRa*) durchgeführt, die in anderen Studien eine signifikante Assoziation mit NRD gezeigt hatte. Keine dieser Assoziationen konnte in dem hier verwendeten Patientengut bestätigt werden. Dies demonstriert eindrücklich, dass die aus Assoziationsstudien gewonnenen Erkenntnisse mit Vorsicht interpretiert werden müssen, bevor Rückschlüsse auf den Mechanismus der Krankheitsentstehung gezogen werden können. Da durch die Familienstruktur im Falle von NRD Rahmenbedingungen vorgegeben sind, die besonders vielversprechende Analysen wie Geschwisterpaarstudien nicht ermöglichen, werden weiterhin Fall-Kontroll Assoziationsstudien eingesetzt werden. Eine grundlegende Schwierigkeit bei der Durchführung von Assoziationsstudien besteht darin, das „richtige“ Kandidatengen auszuwählen. Ohne Kenntnis des zugrundeliegenden biologischen Mechanismus ist die Eingrenzung auf wenige, vielversprechende Kandidaten unmöglich. Die Auswahl der Gene erfolgt daher zwangsläufig auf der Basis aktuell favorisierter Hypothesen und scheint daher mehr oder weniger willkürlich zu sein. Um falsch-positive Ergebnisse auszuschließen, müsste bei der Vielzahl der in Frage kommenden Gene ein sehr viel stringenterer p-Wert gelten als üblich. Damit stiege aber die Wahrscheinlichkeit, eine tatsächlich vorhandene Assoziation zu übersehen.

Durch die in den letzten Jahren fortgeschrittene Kartierung von single-nucleotide-polymorphisms (SNPs) besteht mittlerweile die (theoretische) Möglichkeit, SNPs als Marker in genomweiten Kopplungsanalysen einzusetzen. Dazu ist die Typisierung zahlreicher Personen für zehntausende bekannter SNPs nötig, was mit Hilfe der DNA-Chip Technologie ermöglicht wird. Es wird angenommen, dass durch diese Herangehensweise eine größere statistische „Power“ erreicht wird als mit den bisher durchgeführten Assoziationsstudien, die auf der Untersuchung einzelner Kandidatengene beruhen. Erfolgversprechend ist damit auch der Nachweis einer Assoziation bei Parametern, die in der Größenordnung von komplexen Erkrankungen liegen, z.B. ein geringes Relatives Risiko (RR) von 1,5 oder eine hohe Allelfrequenz (des mit der Krankheit assoziierten Allels) von 70%. Allerdings besteht noch Unklarheit darüber, wie viele und welche SNPs in die Analyse einfließen sollen. Es wurde vorgeschlagen, nicht nur SNPs im translatierten Bereich und im Promotor zu benutzen, sondern auch nicht-codierende und gleichmäßig über das Genom verteilte SNPs. Damit würde die extrem hohe Zahl von 500 000 SNPs benötigt. Zur Interpretation solcher Analysen ist eine sorgfältige Abwägung der erforderlichen p-Werte nötig, um die Anzahl der auftretenden falsch-positiv Resultate einzugrenzen.

Je geringer der Effekt des einzelnen Gens ist, umso mehr Probanden müssen getestet werden. Für den Nachweis eines mittleren Gen-Effekts müssen dabei mehrere Tausend Betroffene rekrutiert werden. In der Praxis sind solche Studien daher kaum durchführbar. Ob sich die Hoffnung erfüllt, dass bei genomweiten SNP-Scans weniger Probanden untersucht werden müssen, um einen Gen-Effekt nachzuweisen, kann derzeit noch nicht beurteilt werden.

Die vielleicht vielversprechendste Strategie ist die Suche nach gleichzeitig auftretender Kopplung *und* Assoziation. Im Fall von NRD ist dies aufgrund der Familienstruktur (meist nur 1 Betroffener) nur mit modellfreien, familienbasierten Assoziationsstudien möglich (TDT). Dabei wird die Information über Segregation bestimmter Allele der Eltern benutzt. Allerdings sind nur Eltern informativ, die in Bezug auf das untersuchte Merkmal heterozygot sind. Je nach Häufigkeit des Auftretens des potentiellen krankheitsauslösenden Allels stehen möglicherweise für die Analyse nur wenige heterozygote Eltern zur Verfügung, was die Power des Tests stark herabsetzt.

In Zukunft werden Hochdurchsatz-SNP-Scans, DNA-Chip-Technologien und angepasste biometrisch-statistische Methoden markerintensive Studien ermöglichen, die ein verbessertes Kosten-Nutzen Verhältnis aufweisen.

5 Zusammenfassung

Neuralrohrdefekte (NRD) sind häufig auftretende angeborene Fehlbildungen des Zentralen Nervensystems, über deren Ursachen bis heute nur wenig bekannt ist. Gesichert erscheint jedoch die Annahme, dass die Entstehung von NRD multifaktoriell bedingt ist. Man geht davon aus, dass die Entwicklungsstörung frühembryonal durch einen fehlerhaften Neuralrohrschluss verursacht wird. Aus Tiermodellen sind zahlreiche Gene bekannt, die während der Neurulation in Neuralrohr oder umliegenden Geweben exprimiert werden und daher möglicherweise an der Steuerung des Neuralrohrschlusses beteiligt sind. Der Funktionsverlust einiger Gene führt außerdem in Mausmutanten zur Manifestation eines NRD. In der vorliegenden Arbeit wurden fünf Entwicklungsgene (*CART1*, *BMP4*, *T*, *PDGFR α* und *TWIST*) untersucht, die aufgrund mehrerer Kriterien als NRD-Kandidatengene gelten: Zum einen zeigen sie während der Neurulation ein spezifisches Expressionsmuster in den relevanten Strukturen (Neuroektoderm, Neuralrohr, Kopfmesenchym); zum anderen verursachen sie bei Funktionsverlust im Tiermodell NRD.

Drei Gene (*CART1*, *BMP4* und *TWIST*) wurden im Rahmen eines Mutationsscreens auf Sequenzveränderungen bei NRD-Betroffenen getestet, wobei die gesamte cDNA Sequenz inklusive Spleißstellen untersucht wurde. Da die genomische Sequenz von *CART1* nicht bekannt war, wurde sie experimentell ermittelt. Ein PAC-Klon konnte identifiziert werden, der die gesamte genomische Sequenz von *CART1* enthält.

In *CART1* und *BMP4*, jedoch nicht in *TWIST*, konnten Sequenzvarianten in der DNA von NRD-Patienten nachgewiesen werden. Neben einer Reihe von Polymorphismen konnten drei Missense-Mutationen nachgewiesen werden (*CART1* R192C; *BMP4* T225A und S367T), die nur bei Betroffenen auftraten. Zwei dieser Missense-Mutationen liegen in stark konservierten Bereichen: Der Austausch R192C in *CART1* ändert die erste AS nach der Homeoboxdomäne, während S367T in der TGF- β Domäne von *BMP4* liegt. Es ist daher möglich, dass die Mutationen als einer von mehreren Faktoren zur NRD-Entstehung dieser Patienten beigetragen haben. Inwiefern sie Einfluss auf die Funktionalität des Proteins haben, läßt sich nur durch weitere Untersuchungen klären.

Bei drei Genen (*BMP4*, *T*, *PDGFR α*) wurde untersucht, ob die im Zusammenhang mit NRD diskutierten Polymorphismen (*BMP4* V152A, *T* IVS7+ 79T? C) bzw. Promotor-Haplotypen (*PDGFR α*) auch in der deutschen Bevölkerung mit NRD assoziiert sind. Eine Assoziation der Risikoallele mit NRD konnte im NRD-Probandengut der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A. dest.	Aqua destillata
Acc.No.	Identifikationsnummer der GenBank
Amp	Ampicillin
ApoB	Apolipoprotein B
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BAC	Bacterial artificial chromosome
BMP	Bone morphogenetic protein
bp	Basenpaar(e)
Cart1	Cartilage homeoprotein 1
CBS	Cystathionin-b-Synthase
cM	centi Morgan
d	Tag (day)
dpf	days post fertilization
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENU	Ethylnitrosuharnstoff
EST	expressed sequence tag
EtOH	Ethanol
EtBr	Ethidiumbromid
f	forward
FR	Folatrezeptor
HWG	Hardy-Weinberg-Gesetz
Huhn	<i>Gallus gallus</i>
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
KO	knock-out
LB	Luria Bertani

M	Molar
Maus	<i>Mus musculus</i>
n	Stichprobenumfang
NaOH	Natriumhydroxid
nt	Nukleotid(e)
NRD	Neuralrohrdefekt(e)
OAR	<i>otp, aristaless, Rx</i>
OD	Optische Dichte
OR	Odds Ratio
Oligo(s)	Oligonukleotid(e)
OMIM	Online Inheritance in Man (Online-Katalog)
PAA	Polyacrylamid
PAC	P1 artificial chromosome
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
Pax	Paired-box Gen
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGFR α	Platelet-derived growth factor receptor alpha
r	reverse
Ratte	<i>Rattus norvegicus</i>
RCLB	Red Cell Lysis Buffer
RNase	Ribonuklease
RR	Relatives Risiko
RT	Raumtemperatur
SB	Spina bifida
SBA	Spina bifida aperta
SBO	Spina bifida occulta
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
Shh	Sonic hedgehog
SNP	Single nucleotide polymorphism
SSCA	Single-stranded conformational analysis
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	Polymerase isoliert aus <i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TDT	Transmission Disequilibrium Test
TE	Tris-EDTA

TF	Transkriptionsfaktor
TPE	Tris-Phosphorsäure-EDTA
U	Units
UTR	untranslated region
% v/v	Volumenprozent
% w/v	Gewichtsprozent
wt	Wildtyp
<i>Xenopus</i>	<i>Xenopus laevis</i>
Zebrafisch	<i>Danio rerio</i>

7 Literatur

- Adorini L, Gregori S and Harrison LC (2002) Understanding autoimmune diabetes: insights from mouse models. *Trends Mol Med* 8: 31-8.
- Afink GB, Nister M, Stassen BHGJ, Joosten PHLJ, Rademakers PJH, Bongcam-Rudloff E, Van Zoelen EJJ and Mosselmann S (1995) Molecular cloning and functional characterization of the human platelet-derived growth factor?? receptor gene promoter. *Oncogene* 10: 1667-1672.
- Agresti A (1991) *Categorical Data Analysis*. New York: Wiley
- Balciuniene J, Dahl N, Borg E, Samuelsson E, Koisti MJ, Pettersson U and Jazin EE (1998) Evidence for digenic inheritance of nonsyndromic hereditary hearing loss in a Swedish family. *Am J Hum Genet* 63: 786-793.
- Balling R (1994) The undulated mouse and the development of the vertebral column. Is there a human PAX-1 homologue? *Clin Dysmorphol* 3: 185-91.
- Bamshad M, Lin RC, Law DJ, Watkins WC, Krakowiak PA, Moore ME, Franceschini P, Lala R, Holmes LB, Gebuhr TC et al. (1997) Mutations in human TBX3 alter limb, apocrine and genital development in ulnar-mammary syndrome. *Nat Genet* 16: 311-5.
- Barbera JP, Rodriguez TA, Greene ND, Weninger WJ, Simeone A, Copp AJ, Beddington RS and Dunwoodie S (2002) Folic acid prevents exencephaly in Cited2 deficient mice. *Hum Mol Genet* 11: 283-93.
- Baron M (2001) The search for complex disease genes: fault by linkage or fault by association? *Mol Psych* 6: 143-149.
- Beddington RS, Rashbass P and Wilson V (1992) Brachyury - a gene affecting mouse gastrulation and early organogenesis. *Development (Suppl)*: 157-165.
- Belin V, Cusin V, Viot G, Girlich D, Toutain A, Moncla A, Vekemans M, Le Merrer M, Munnich A and Cormier-Daire V (1998) SHOX mutations in dyschondrosteosis (Leri-Weill syndrome). *Nat Genet* 19: 67-9.
- Berry RJ, Li Z, Erickson JD, Li S, Moore CA, Wang H, Mulinare J, Zhao P, Wong L-YC, Gindler J et al. (1999) Prevention of neural-tube defects with folic acid in China. *N Engl J Med* 341: 1485-1490.
- Botto LD, Moore CA, Khoury MJ and Erickson JD (1999) Neural Tube Defects. *N Engl J Med* 341: 1509-1519.
- Brand T, Arnold H-H and Andrée B (1999) Entwicklungsgenetische Störungen in der Kardiologie: Zusammenwirken von Grundlagenforschung und Klinik. *Med Genet* 11: 250-256.
- Bronner-Fraser M and Fraser SE (1997) Differentiation of the vertebrate neural tube. *Curr Opin Cell Biol* 9: 885-891.

- Capra V, De Marco P, Moroni A, Leonardini M, Faiella A, de Franchis R, Andria G, Boncinelli E and Cama A (1997) Mutations of folic acid receptor alpha in neural tube defects. *Am J Hum Genet* 61 (Suppl): A149.
- Carter M, Ulrich S, Oofuji Y, Williams DA and Ross ME (1999) Crooked tail (Cd) models human folate-responsive neural tube defects. *Hum Mol Genet* 8: 2199-204.
- Chen Z-F and Behringer RR (1995) Twist is required in head mesenchyme for cranial neural tube morphogenesis. *Genes Dev* 9: 686-699.
- Constam DB and Robertson EJ (1999) Regulation of bone morphogenetic protein activity by pro domains and proprotein convertases. *J Cell Biol* 144: 139-149.
- Copp AJ (1998) Prevention of neural tube defects: vitamins, enzymes and genes. *Curr Opin Neurol* 11: 97-102.
- Copp AJ, Brook FA, Estibeiro JP, Shum ASW and Cockroft DL (1990) The embryonic development of mammalian neural tube defects. *Progr Neurobiol* 35: 363-403.
- Copp AJ, Checui I and Henson JN (1994) Developmental basis of severe neural tube defects in the loop-tail (Lp) mutant mouse: use of microsatellite DNA markers to identify embryonic genotype. *Dev Biol* 165: 20-29.
- Czeizel AE and Dudás I (1992) Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 327: 1832-1835.
- Czeizel AE, Toth M and Rockenbauer M (1996) Population-based case control study of folic acid supplementation during pregnancy. *TERATOLOGY* 53: 345-351.
- D'Elia AV, Tell G, Paron I, Pellizzari L, Lonigro R and Damante G (2001) Missense mutations of human homeoboxes: A review. *Hum Mutat* 18: 361-74.
- Doolin MT, Barbaux S, McDonnell M, Hoess K, Whitehead AS and Mitchell LE (2002) Maternal Genetic Effects, Exerted by Genes Involved in Homocysteine Remethylation, Influence the Risk of Spina Bifida. *Am J Hum Genet* 71: 1222-1226.
- Drwinga HL, Toji LH, Kim CH, Greene AE and Mulivor RA (1993) NIGMS human/rodent somatic cell hybrid mapping panels 1 and 2. *Genomics* 16: 311-4.
- Ducy P and Karsenty G (2000) The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney International* 57: 2207-2214.
- Edwards YH, Putt W, Lekoape KM, Stott D, Fox M, Hopkinson DA and Sowden J (1996) The human homolog T of the mouse T (Brachyury) gene; gene structure, cDNA sequence, and assignment to chromosome 6q27. *Genome Res* 6: 226-233.
- El Ghouzzi V, Le Merrer M, Perrin-Schmitt F, Lajeunie E, Benit P, Renier D, Bourgeois P, Bolcato-Bellemin A-L, Munnich A and 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 and Bonventure J (2000) Saethre-Chotzen mutations cause TWIST protein degradation or impaired nuclear location. *Hum Mol Genet* 9: 813-819.
- Elwood JM, Little J and Elwood JH (1992) *Epidemiology and control of neural tube defects*. Oxford: Oxford University Press
- Essien FB, Haviland MB and Naidoff AE (1990) Expression of a new mutation (Axd) causing axial defects in mice correlates with maternal phenotype and age. *Teratology* 42: 183-94.
- Flatz G and Sukthomya C (1970) Fronto-ethmoidal encephalomeningoceles in the population of Northern Thailand. *Humangenetik* 11: 1-8.
- Fleming A and Copp AJ (1998) Embryonic folate metabolism and mouse neural tube defects. *Science* 280: 2107-2109.
- Fleming A, Gerrelli D, Greene NDE and Copp AJ (1997) Mechanisms of normal and abnormal neurulation: evidence from embryo culture studies. *Int J Dev Biol* 41: 199-212.
- Füchtbauer E-M (1995) Expression of M-Twist during postimplantation development of the mouse. *Dev Dyn* 20: 316-322.
- Fuhrmann W and Weitzel HK (1985) Maternal serum alpha-fetoprotein screening for neural tube defects. *Hum Genet* 69: 47-61.
- Gambaro G, Anglani F and D'Angelo A (2000) Association studies of genetic polymorphisms and complex disease. *Lancet* 355: 308-311.
- Gefrides LA, Bennett GD and Finnell RH (2002) Effects of folate supplementation on the risk of spontaneous and induced neural tube defects in Splotch mice. *Teratology* 65: 63-9.
- Gitelman I (1997) Twist protein in mouse embryogenesis. *Dev Biol* 189: 205-214.
- Golden JA and Chernoff GF (1993) Intermittent pattern of neural tube closure in two strains of mice. *Teratology* 47: 73-80.
- Gordon DF, Wagner J, Atkinson BL, Chiono M, Berry R, Sikela J and 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.
- Greene NDE and Copp AJ (1997) Inositol prevents folate-resistant neural tube defects in the mouse. *Nature Med* 3: 60-66.
- Gripp KW, Zackai EH and Stolle CA (2000) Mutations in the human *TWIST* gene. *Hum Mut* 15: 150-155.
- Hall J and Solehdin F (1998a) Folic acid for the prevention of congenital anomalies. *Eur J Pediatr* 157: 445-450.

- Hall JG, Friedman JM, Kenna BA, Popkin J, Jawanda M and Arnold W (1988) Clinical, genetic, and epidemiological factors in neural tube defects. *Am J Hum Genet* 43: 827-837.
- Hall JG and Solehdin F (1998b) Genetics of neural tube defects. *Mental Retard Dev Disabil Res Rev* 4: 269-281.
- Hammond C and Helenius A (1995) Quality control in the secretory pathway. *Curr Opin Cell Biol* 7: 523-9.
- Harris MJ and Juriloff DM (1999) Toward understanding mechanisms of genetic neural tube defects in mice. *Teratology* 60: 292-305.
- Heid MK, Bills ND, Hinrichs SH and Clifford AJ (1992) Folate deficiency alone does not produce neural tube defects in mice. *J Nutr* 122: 888-894.
- Helwig U, Imai K, Schmahl W, Thomas BE, Varnum DS, Nadeau JH and 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.
- Herrmann BG, Labeit S, Poustka A, King TR and Lehrach H (1990) Cloning of the T gene required in mesoderm formation in the mouse. *Nature* 343: 617-22.
- Hol FA, Geurds MPA, Chatkupt S, Shugart YY, Balling R, Schrandt-Stumpel CTRM, Johnson WG, Hamel BCJ and 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.
- Howard TD, Paznekas WA, Green ED, Chiang LC, Ma N, Ortiz de Luna RI, Garcia Delgado C, Gonzalez-Ramos M, Kline AD and Jabs EW (1997) Mutations in *TWIST*, a basic helix-loop-helix transcription factor, in Saethre-Chotzen syndrome. *Nature Genet* 15: 36-41.
- Hui CC and Joyner AL (1993) A mouse model of greig cephalopolysyndactyly syndrome: the extra-toesJ mutation contains an intragenic deletion of the *Gli3* gene. *Nat Genet* 3: 241-6.
- Jabs EW (1998) Toward understanding the pathogenesis of craniosynostosis through clinical and molecular correlates. *Clin Genet* 53: 79-86.
- Joosten PHLJ, Hol FA, van Beersum SEC, Peters H, Hamel BCJ, Afink GA, van Zoelen EJJ and Mariman ECM (1998) Altered regulation of platelet-derived growth factor receptor- α gene-transcription in vitro by spina bifida-associated mutant Pax1 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14459-14463.
- Joosten PHLJ, Toepoel M, Mariman ECM and Van Zoelen EJJ (2001) Promoter haplotype combinations of the platelet-derived growth factor α -receptor gene predispose to human neural tube defects. *Nature Genet* 27: 215-217.
- Juriloff DM and Harris MJ (2000) Mouse models for neural tube closure defects. *Hum Mol Genet* 9: 993-1000.

- Kalter H (2000) Folic acid and human malformations: a summary and evaluation. *Reprod Toxicol* 14: 463-476.
- Kazlauskas A (1994) Receptor tyrosine kinases and their targets. *Curr Opin Genet Dev* 4: 5-14.
- Kibar Z, Vogan KJ, Groulx N, Justice MJ, Underhill DA and Gros P (2001) *Ltap*, a mammalian homolog of *Drosophila strabismus/van gogh*, is altered in the mouse neural tube mutant Loop-tail. *Nature Genet* 28: 251-255.
- Kirke PN, Daly LE, Molloy A, Weir DG and Scott JM (1996) Maternal folate status and risk of neural tube defects. *Lancet* 348: 67-68.
- Kispert A and Hermann BG (1993) The Brachyury gene encodes a novel DNA binding protein. *EMBO J* 12: 4898-9.
- Knapp M (1999) The transmission/disequilibrium test and parental-genotype reconstruction: the reconstruction-combined transmission/disequilibrium test. *Am J Hum Genet* 64: 861-870.
- Koch MC and Fuhrmann W (1984) Epidemiology of neural tube defects in Germany. *Hum Genet* 68: 97-103.
- Koch MC and 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, Stegmann K, Ziegler A, Schröter B and 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.
- Koch MC, Steinmeyer K, Lorenz C, Ricker K, Wolf F, Otto M, Zoll B, Lehmann-Horn F, Grzeschik K-H and Jentsch TJ (1992) The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. *Science* 257: 797-800.
- Larsen WJ (1997) Human embryology. New York: Churchill Livingstone Inc.
- Li QY, Newbury-Ecob RA, Terrett JA, Wilson DI, Curtis AR, Yi CH, Gebuhr T, Bullen PJ, Robson SC, Strachan T et al. (1997) Holt-Oram syndrome is caused by mutations in *TBX5*, a member of the Brachyury (T) gene family. *Nat Genet* 15: 21-9.
- Liem KF, Tremml G and 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 and Schmidt D (1986) In utero exposure to valproate and neural tube defects. *Lancet* 1: 1392-1393.
- Mangino M, Torrente I, De Luca A, Sanchez O, Dallapiccola B and Novelli G (1999) A single-nucleotide polymorphism in the human bone morphogenetic protein-4 (*BMP 4*) gene. *J Hum Gen* 44: 76-77.
- Martínez-Frías M-L, Urioste M, Bermejo E, Sanchís A and Rodríguez-Pinilla E (1996) Epidemiological analysis of multi-site closure failure of neural tube in humans. *Am J Med Genet* 66: 64-68.

- Mills JL, McPartlin JM, Kirke PN, Lee YJ, Conley MR, Weir DG and Scott JM (1995) Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural-tube defects. *Lancet* 345: 149-151.
- Mills JL, Tuomilehto J, Yu KF, Colman N, Blaner WS, Koskela P, Rundle WE, Forman M, Toivanen L and Rhoads GG (1992) Maternal vitamin levels during pregnancies producing infants with neural tube defects. *J Pediatr* 120: 863-871.
- Moore KL and Persaud TVN (1996) *Embryologie*. Stuttgart: Schattauer
- Morrison K, Papapetrou C, Attwood J, Hol F, Lynch SA, Sampath A, Hamel B, Burn J, Sowden J, Stott D et al. (1996) Genetic mapping of the human homologue (T) of mouse T(Brachyury) and a search for allele association between human T and spina bifida. *Hum Mol Genet* 5: 669-674.
- Morrison K, Papapetrou C, Hol FA, Mariman ECM, Lynch SA, Burn J and Edwards YH (1998) Susceptibility to spina bifida; an association study of five candidate genes. *Ann Hum Genet* 62: 379-396.
- MRC Vitamin Study Research Group (1991) Prevention of neural tube defects: Results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* 338: 131-137.
- Murdoch JN, Doudley K, Paternotte C, Copp AJ and Stanier P (2001a) Severe neural tube defects in the *loop-tail* mouse result from mutation of *Lpp1*, a novel gene involved in floor plate specification. *Hum Mol Genet* 10: 2593-2601.
- Murdoch JN, Henderson DJ, Doudney K, Gaston-Massuet C, Phillips HM, Paternotte C, Arkell R, Stanier P and Copp AJ (2003) Disruption of scribble (*Scrb1*) causes severe neural tube defects in the circletail mouse. *Hum Mol Genet* 12: 87-98.
- Murdoch JN, Rachel RA, Shah S, Beermann F, Stanier P, Mason CA and Copp AJ (2001b) Circletail, a new mouse mutant with severe neural tube defects: chromosomal localization and interaction with the loop-tail mutation. *Genomics* 78: 55-63.
- Nadeau JH (2001) Modifier genes in mice and humans. *Nature Reviews* 2: 165-174.
- Nakatsu T, Uwabe C and Shiota K (2000) Neural tube closure in humans initiates at multiple sites: evidence from human embryos and implications for the pathogenesis of neural tube defects. *Anat Embryol* 201: 455-466.
- Nakayama T, Cui Y and Christian JL (2000) Regulation of BMP/Dpp signaling during embryonic development. *Cell Mol Life Sci* 57: 943-956.
- Neumann PE, Frankel WN, Letts VA, Coffin JM, Copp AJ and 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.
- Oakley GP, Jr. (2002) Inertia on folic acid fortification: public health malpractice. *Teratology* 66: 44-54.

- Oostra R-J, Baljet B and Hennekam RCM (1998) Congenital anomalies in the teratological collection of museum Vrolijk in Amsterdam, The Netherlands. IV: Closure defects of the neural tube. *Am J Med Genet* 80: 60-73.
- O'Rahilly R and Muller F (1987) *Developmental stages in human embryos*. Washington, D.C.: Carnegie Institution of Washington
- O'Rahilly R and Muller F (2000) Prenatal ages and stages-measures and errors. *Teratology* 61: 382-4.
- O'Reilly MA, Smith JC and Cunliffe V (1995) Patterning of the mesoderm in *Xenopus*: dose-dependent and synergistic effects of Brachyury and Pintallavis. *Development* 121: 1351-9.
- Papaioannou VE and Silver LM (1998) The T-box gene family. *BioEssays* 20: 9-19.
- Payne J, Shibasaki F and Mercola M (1997) Spina bifida occulta in homozygous Patch mouse embryos. *Dev Dyn* 209: 105-16.
- Piedrahita JA, Oetama B, Bennett GD, van Waes J, Kamen BA, Richardson J, Lacey SW, Anderson RGW and Finnell RH (1999) Mice lacking the folic acid-binding protein *Folbp1* are defective in early embryonic development. *Nature Genet* 23: 228-232.
- Probst FJ and Camper SA (1999) The role of mouse mutants in the identification of human hereditary hearing loss genes. *Hearing Res* 130: 1-6.
- Queißer-Luft A, Wolf HG, Schlaefer K and von Kries R (1996) Häufigkeiten von Neuralrohrdefekten in Deutschland. *Monatsschr Kinderheilkd* 144: 136-140.
- Richardson MK, Hanken J, Gooneratne ML, Pieau C, Raynaud A, Selwood L and Wright GM (1997) There is no highly conserved embryonic stage in the vertebrates: implications for current theories of evolution and development. *Anatomical Embryology* 196: 91-106.
- Richter B, Schultealbert AH and Koch MC (2002) Human T and risk for neural tube defects. *J Med Genet* 39: E14.
- Richter B, Stegmann K, Röper B, Böddeker I, Ngo ETKM and Koch MC (2001) Interaction of folate and homocysteine pathway genotypes evaluated in susceptibility to neural tube defects (NTD) in a German population. *J Hum Gen* 46: 105-109.
- Risch N and Merikangas K (1996) The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 273: 1516-1517.
- Roberts HE, Moore CA, Cragan JD, Fernhoff PM and Khoury MJ (1995) Impact of prenatal diagnosis on the birth prevalence of neural tube defects, Atlanta, 1990-1991. *Pediatrics* 96: 880-883.
- Schatteman GC, Morrison-Graham K, van Koppen A, Weston JA and Bowen-Pope DF (1992) Regulation and role of PDGF receptor alpha-subunit expression during embryogenesis. *Development* 115: 123-31.
- Schiltenswolf M and Carstens C (1990) Zur Prävalenz der Spina bifida. *Pädiatrie* 3: 303-309.

- Sela-Donenfeld D and 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.
- Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW and Stone EM (1993) The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* 16: 325-332.
- Shields DC, Kirke PN, Mills JL, Ramsbottom D, Molloy AM, Burke H, Weir DG, Scott JM and 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.
- Shum ASW and Copp AJ (1996) Regional differences in morphogenesis of the neuroepithelium suggest multiple mechanisms of spinal neurulation in the mouse. *Anatomical Embryology* 194: 65-73.
- Simpson P (1983) Maternal-zygotic gene interactions during formation of the dorsoventral pattern in *Drosophila* embryos. *Genetics* 105: 615-632.
- Soo K, O'Rourke MP, Khoo PL, Steiner KA, Wong N, Behringer R and Tam PPL (2002) *Twist* function is required for the morphogenesis of the cephalic neural tube and the differentiation of the cranial neural crest cells in the mouse embryo. *Dev Biol* 247: 251-270.
- Soriano P (1997) The PDGF β receptor is required for neural crest cell development and for normal patterning of the somites. *Development* 124: 2691-2700.
- Spielman RS, McGinnis RE and 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.
- Stegmann K, Boecker J, Richter B, Capra V, Finnell RH, Ngo ETKN, Strehl E, Ermert A and Koch MC (2001) A screen for mutations in human homologues of mice exencephaly genes *Tfap2* and *Msx2* in patients with neural tube defects. *Teratology* 63: 167-175.
- Stegmann K, Schröter B, Ermert A, Ziegler A and Koch MC (1998) No association between folate pathway mutation MTHFR C677T and spina bifida aperta in the German population. *Med Genet* 10: 124.
- Stephenson DA, Mercola M, Anderson E, Wang CY, Stiles CD, Bowen-Pope DF and Chapman VM (1991) Platelet-derived growth factor receptor alpha-subunit gene (*Pdgfra*) is deleted in the mouse patch (Ph) mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 6-10.
- Stoll C and EUROCAT Working group (1995) Distribution of single organ malformations in European populations. *Ann Génét* 38: 32-43.

- Takahashi Y (1996) Organization of the spina bifida neural tube in Splotch (Pax-3 defective) mouse embryos. *Develop Growth Differ* 38: 23-31.
- Tassabehji M, Read AP, Newton VE, Harris R, Balling R, Gruss P and Trachan T (1992) Waardenburg's syndrome patients have mutations in the human homologue of the Pax-3 paired box gene. *Nature* 355: 635-636.
- Trembath D, Sherbondy AL, Vandyke DC, Shaw GM, Todoroff K, Lammer EJ, Finnell RH, Marker S, Lerner G and Murray JC (1999) Analysis of select folate pathway genes, *PAX3*, and human *T* in a midwestern neural tube defect population. *Teratology* 59: 331-341.
- Vainio S, Karavanova I, Jowett A and Thesleff I (1993) Identification of BMP-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development. *Cell* 75: 45-58.
- Van Allen MI, Kalousek DK, Chernoff GF, Juriloff D, Harris M, McGillivray BC, Yong SL, Langlois S, MacLeod PM, Chitayat D et al. (1993) Evidence for multi-site closure of the neural tube in humans. *Am J Med Genet* 47: 723-743.
- van den Wijngaard A, van Kraay M, van Zoelen EJJ, Olijve W and Boersma CJC (1996) Genomic organization of the human bone morphogenetic protein- 4 gene: molecular basis for multiple transcripts. *Biochem Biophys Res Comm* 219: 789-794.
- van der Put NMJ, Steegers-Theunissen RPM, Frosst P, Trijbels FJM, Eskes TKAB, van den Heuvel LP, Mariman ECM, den Heyer M, Rozen R and Blom HJ (1995) Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet* 346: 1070-1071.
- van Straaten HWM and Copp AJ (2001) Curly tail: a 50-year history of the mouse spina bifida model. *Anat Embryol* 203: 225-237.
- van Waes JG and Finnell RH (2001) Importance of model organisms in understanding the biology and genetic basis of human nonsyndromic neural tube defects. *Teratology* 64: 177-80.
- Vastardis H, Karimbux N, Guthua SW, Seidman JG and Seidman CE (1996) A human *MSX1* homeodomain missense mutation causes evidence tooth agenesis. *Nature Genet* 13: 417-421.
- Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, Agarwala R, Ainscough R, Alexandersson M, An P et al. (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420: 520-62.
- White MB, Carvalho M, Derse D, O'Brien S and Dean M (1992) Detecting single base substitutions as heteroduplex polymorphisms. *Genomics* 12: 301-306.
- Wilkinson DG, Bhatt S and Herrmann BG (1990) Expression pattern of the mouse *T* gene and its role in mesoderm formation. *Nature* 343: 657-659.
- Wilson V, Manson L, Skarnes WC and Beddington RSP (1995) The *T* gene is necessary for normal mesodermal morphogenetic cell movements during gastrulation. *Development* 121: 877-886.

- Wilson V, Rashbass P and Beddington RSP (1993) Chimeric analysis of T (Brachyury) gene function. *Development* 117: 1321-1331.
- Winnier G, Blessing M, Labosky PA and Hogan BLM (1995) Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev* 9: 2105-2116.
- Yoshida K and Kikutani H (2000) Genetic and immunological basis of autoimmune diabetes in the NOD mouse. *Rev Immunogenet* 2: 140-6.
- Zhang J, Hagopian-Donaldson S, Serbedzija G, Elsemore J, Plehn-Dujowich D, McMahon AP, Flavell RA and Williams T (1996) Neural tube, skeletal and body wall defects in mice lacking transcription factor AP-2. *Nature* 381: 238-241.
- Zhao GQ, Behringer RR and 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.
- Zhao GQ, Zhou X, Eberspaecher H, Solursh M and de Crombrughe B (1993) Cartilage homeoprotein 1, a homeoprotein selectively expressed in chondrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 8633-8637.

8 Publikationen

8.1 Originalarbeiten

Richter B, Stegmann K, Röper B, Böddeker I, Ngo E, Koch MC (2001) Interaction of folate and homocysteine pathway genotypes evaluated in susceptibility to neural tube defects (NTD) in a German population. *J Hum Genet* 46: 105-109

Stegmann K, Boecker J, Richter B, Capra V, Finnell R, Ngo E, Strehl E, Ermert A, Koch M (2001). A screen for mutations in human homologues of mice exencephaly genes *Tfap2* and *Msx2* in patients with neural tube defects. *Teratology* 63: 167-175

Richter B, Schultealbert AH, Koch MC (2002) Human T and risk for neural tube defects. *J Med Genet* 39: E14

Felder B, Stegmann K, Schultealbert AH, Geller F, Strehl E, Ermert A, Koch MC (2002) Evaluation of BMP4 and its specific inhibitor NOG as candidates in human neural tube defects (NTDs). *Eur J Hum Genet* 10: 753-756

Felder B, Stegmann K, Koch MC (2003) SNPs in homeobox transcription factor *CART1* in cases with neural tube defects (NTD). (eingereicht)

8.2 Poster

Koch MC, Richter B, Stegmann K (2001). Analyses of the developmental genes *Tfap2a*, *Msx2* and *Slug* potentially involved in human neural tube defects (NTDs). *Eur J Hum Genet* 9: Supplement 1, 376-377

Felder B, Schultealbert AH, Röper B, Koch MC (2002). Developmental genes as candidates in cases with neural tube defects (NTD). *Med Genet* 14: 317

8.3 Vortrag

Felder B, Schultealbert A, Röper B, Koch MC (2002). Analyses of the developmental genes *Twist*, *Noggin* and human T in cases with neural tube defects (NTD). 2nd International Neural Tube Defects Conference, Seabrook Island, SC, USA