

**Assoziationsstudie
zu MSX 1 bei
nicht-syndromassoziierten
LKGS-Spalten
am Jenaer Krankengut**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades**

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich Schiller-Universität Jena

von Michelle Schmidt
geboren am 20.02.1977 in Bergheim (Erft)

Gutachter

1. Prof. Dr. Dr. S. Schultze-Mosgau (Jena)
2. Prof. Dr. U. Settmacher (Jena)
3. Prof. Dr. Dr. H. Schliephake (Göttingen)

Tag der öffentlichen Verteidigung:

03.04.2007

I. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
ABL1	Abelson murine leukaemia oncogene 1
AgNO ₃	Silbernitrat
APOC2	aplipoprotein C-II gene
BSA	bovine serum albumin
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CH ₃ COOH	Essigsäure
COL	collagen gene
CRTL	cartilage link protein gene
CRTM	cartilage matrix protein gene
DLX	dixtal less homeobox gene
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDN	endothelin gene
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
et al.	et aliter
G	Guanosin
GABRB	gamma-aminobutyric acid gene
GAD	glutamate decarboxylase gene
G-Spalte	isolierte Gaumenspalte
HOX	homeobox gene
HRAS	harvey rat sarcom viral oncogene homolog
HXB	human hexabrachion gene
IGF	insulin-like growth factor
LK(+/-G)-Spalte	Lippen-Kiefer-Spalte mit/ohne Gaumenspalte
LKGS-Spalte	Lippen-Kiefer-Gaumen-Segelspalte
MSX	muscle segment homeobox gene
MTHFR	Methylentetrahydrofolat- Reduktase

Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
p	kurzer Arm eines Chromosoms
PCR	Polymerase chain reaction
PVRL	poliovirus receptor related gene
q	langer Arm eines Chromosoms
RARA	retinoic acid recetor gene alpha
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymidin
Taq	Thermus aquaticus
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF	transforming growth factor

II. Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis	III
II.	Inhaltsverzeichnis	V
III.	Zusammenfassung	VII
1.	Einleitung	1
1. 1	Häufigkeit der LKGS-Spalte	2
1. 1. 1.	Unterschiede in der Häufigkeit nach Populationen	3
1. 1. 2	Ursachen für Häufigkeitszunahme	3
1. 2	Nomenklatur der LKGS-Spalten	4
1. 3	Formale Genese der LKGS-Spalten	6
1. 3. 1	Entwicklung des Gesichts	6
1. 3. 2	Entwicklung des Gaumens	7
1. 3. 3	Lippen-, Kiefer- und Gaumenspalten	8
1. 3. 4	Seltene Gesichtsspalten	10
1. 4	Kausale Genese der LKGS-Spalten	11
1. 4. 1	Kandidatengene	11
1. 4. 2	Kopplungsanalyse	12
1. 4. 3	Assoziationsanalyse	12
1. 5	Das Kandidatengen MSX 1	13
1. 5. 1.	Die Homeobox-Gene	13
1. 5. 2	Die MSX-Familie der Homeobox-Gene	14
1. 5. 3	Das Homeobox-Gen MSX 1	15
1. 5. 3. 1	Identifizierung und Charakterisierung von MSX 1	15
1. 5. 3. 2	Mausversuche zu MSX 1	16
1. 5. 3. 3	Humanstudien zu MSX 1	17
2.	Ziel der Arbeit	20
3.	Material und Methoden	21
3. 1	Patientengut und Untersuchungsmaterial	21
3. 2	Molekulargenetische Methoden	21
3. 2. 1	DNA-Extraktion	22
3. 2. 2	PCR-Amplifikation	23

3. 2. 3	Gel-Elektrophorese	25
3. 2. 4	Fragmentlängenanalyse	25
3. 2. 5	Sequenzanalyse	26
3. 3	Statistische Tests	27
4.	Ergebnisse	30
5.	Diskussion	37
5. 1	Assoziationsstudien	37
5. 1. 1	Fall-Kontroll-Studie vs. familienbasierte Assoziationsstudie	37
5. 2	MSX 1 als Kandidatengen	38
5. 3	Anzahl und Basenpaarlänge der ermittelten Allele	39
5. 4	Häufigkeitsverteilung der ermittelten Allele	42
5. 4. 1	Mögliche Ursachen für die unterschiedlichen Ergebnisse Verschiedener Kopplungs- und Assoziationsstudien	44
5. 5	Schlussfolgerung und Ausblick	46
6.	Literaturverzeichnis	48
7.	Anhang	61
7. 1	Studien über Kandidatengene zwischen 1989 und 2004	61
7. 2	Glossar	65
	Lebenslauf	70
	Ehrenwörtliche Erklärung	71
	Danksagung	72

III. Zusammenfassung

Die Lippen-, Kiefer-, Gaumen-, Segelspalten (LKGS-Spalten) stellen die häufigste angeborene operationspflichtige Fehlbildung des Menschen dar. Trotzdem ist ihre kausale Genese – insbesondere die der nichtsyndrom-assoziierten LKGS-Spalten – nach wie vor nicht geklärt. Zur Zeit geht man von einem multifaktoriellen System mit additiver Polygenie mit Schwellenwerteffekt aus, wobei genetischen Faktoren in der Ätiologie der größte Stellenwert zukommt. Weltweit konzentrieren sich daher verschiedene Arbeitsgruppen auf die Erforschung von Genen, die für die Entstehung der isolierten LKGS-Spalten ursächlich sind.

Bei einem dieser Kandidatengene handelt es sich um MSX 1. Dieses Homeobox-Gen wird während der Embryonalentwicklung an diversen Stellen exprimiert, an denen Epithel-Mesenchym-Interaktionen stattfinden und ist damit an den Signalprozessen zwischen verschiedenen Gewebeschichten, u. a. auch während der embryonalen Entwicklung des Gesichtsschädels, beteiligt. Verschiedene Studien an transgenen Mäusen sowie zahlreiche Kopplungs- und Assoziationsstudien an humanen Stichproben weisen auf eine Mitbeteiligung dieses Gens an der Entstehung von LKGS-Spalten hin. MSX 1 ist auf dem Chromosom 4 lokalisiert und weist einen CA-Dinucleotid-Repeat mit 4 Allelen auf: 169, 171, 173 und 175 bp (Padanilam et al. 1998).

In einigen Studien wurde die Häufigkeitsverteilung dieser vier Markerallele bestimmt und auf signifikante Unterschiede Spaltträgern und Kontrollen untersucht. Findet sich ein bestimmtes Allel gehäuft in der Gruppe der Merkmalsträger, kann dies auf einen pathogenetischen Zusammenhang zwischen dem Allel des betreffenden Gens und der Erkrankung hinweisen. Während aus einem Teil dieser Studien signifikante Ergebnisse resultierten, konnte in den übrigen Untersuchungen keine derartige Abweichung nachgewiesen werden.

Basierend auf diese Studien wurde in der vorliegenden Arbeit eine solche Analyse für eine deutsche Population durchgeführt. Unsere Stichprobe umfasste 63 (36 männliche und 27 weibliche) nichtverwandte Träger einer nichtsyndrom-assoziierten LKGS-Spalte und 75 (38 männliche und 37 weibliche) gesunde Kontrollpersonen ohne Spaltanamnese in der Familie. Zur Ermittlung der Anzahl der verschiedenen Allele des CA-Dinucleotid-Repeats des MSX1-Gens für unser Untersuchungsgut

wurde mittels molekulargenetischen Methoden eine Allelbestimmung durchgeführt. Die entsprechenden DNA-Proben wurden aus peripheren Blutzellen gewonnen. Durch Anwendung des χ^2 -Tests nach Pearson bzw. des Exakten Tests nach Fischer wurde überprüft, ob zwischen Spaltträgern und Kontrollen signifikante Unterschiede in der Allelhäufigkeitsverteilung bestehen und damit für unser Krankengut eine Assoziation von MSX 1 zu LKGS-Spalten vorliegt.

Entsprechend der o. g. Studie (*Padanilam et al. 1998*) konnten auch in der vorliegenden Analyse 4 verschiedene Allele ermittelt werden. Anstatt der beschriebenen Basenpaarlängen von 169, 171, 173 und 175 bp, ergab die Analyse jedoch Basenpaarlängen von 171, 173, 175 und 177 bp. Bei der Ergründung der möglichen Ursachen für diese unterschiedlichen Allelgrößen wurden sowohl systematische Fehler als auch tatsächlich vorliegende Unterschiede der Basenpaarlängen diskutiert.

Bei der Untersuchung der Allelhäufigkeitsverteilung lässt sich für unsere Stichprobe kein signifikanter Unterschied zwischen der gesamten Spaltträgergruppe und der gesamten Kontrollgruppe feststellen ($p = 0,47; 0,34; 0,58$ bzw. $0,48$). Auch zwischen den weiblichen und männlichen Spaltträgern liegt bei p -Werten zwischen $0,72$ und $1,0$ keine signifikante Abweichung vor. Betrachtet man die Untergruppen lässt sich ebenfalls weder bei den Einteilungen nach totalen und partiellen Spalten noch bei den Einteilungen nach LK(+/-G)- und G-Spalten ein signifikanter Unterschied der Allelhäufigkeitsverteilungen zwischen Spaltträgern und den jeweiligen Kontrollen beobachten. Allein bei den totalen Spalten mit simplexer Familienanamnese (Sx) kann zwischen den männlichen und weiblichen Spaltträgern in der Häufigkeitsverteilung des Allels 175 bp ein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p = 0,02$). Da alle Vergleiche der Spaltträgergruppen und Kontrollen jedoch keine signifikanten Abweichungen liefern, ist dieses Ergebnis im Rahmen dieser Arbeit nur von geringer Bedeutung.

1. Einleitung

Lippen-, Kiefer-, Gaumen-, Segelspalten (LKGS-Spalten) werden den kraniofazialen Fehlbildungen zugeordnet und stellen die häufigste angeborene, operationspflichtige Anomalie des Menschen dar. Sie imponieren als ein- oder beidseitige, isolierte oder kombinierte Spaltbildung von Oberlippe, Oberkiefer, hartem und weichem Gaumen sowie Segel unterschiedlichen Ausmaßes. Hieraus resultieren neben einer gestörten Ästhetik Ernährungsprobleme, Behinderungen der Nasenatmung infolge der Mitbeteiligung von Struktur und Funktion der Nase, Mittelohrkomplikationen, Hörbahnreifeverzögerungen, Kieferwachstumsstörungen, Zahnfehlstellungen, komplexe Sprechstörungen und psychische Probleme. Daher erfordert die Therapie der Betroffenen eine interdisziplinäre Zusammenarbeit von Mund-Kiefer-Gesichtschirurgen, Pädiatern, HNO-Ärzten, Kieferorthopäden, Zahnärzten, Logopäden und Psychologen nach wissenschaftlich begründeten und allgemein anerkannten Richtlinien. Das Ziel hierbei ist die Schaffung günstiger morphologischer, funktioneller sowie ästhetischer Voraussetzungen, um dem Spaltträger eine möglichst ungestörte physische und psychische Entwicklung zu ermöglichen.

Bisher stand neben der Erprobung verschiedener prophylaktischer Maßnahmen vor allem die Verbesserung der chirurgischen und nichtchirurgischen Behandlungsmethoden der LKGS-Spalten im Vordergrund der therapeutischen Bemühungen. Die Anstrengungen eine suffiziente Prophylaxe zu entwickeln blieben bislang jedoch erfolglos. Der Grund hierfür liegt hauptsächlich in der ungeklärten kausalen Genese des Großteils der Spalten, so dass ein gesicherter Angriffspunkt für eine Prophylaxe fehlt. Somit bleibt gegenwärtig allein die aufwändige und langwierige, aber hochwirksame Therapie durch die o. g. Disziplinen, deren Basis die chirurgische Beseitigung der morphologischen Störungen und Schaffung möglichst optimaler anatomisch-morphologischer Voraussetzungen für die Erlangung normaler Funktionen ist.

Neben der ständigen Verbesserung der Therapie, muss gleichzeitig weiterhin Ursachenforschung betrieben werden. Dies ist nur über die Genetik möglich und mit

den Fortschritten in diesem Gebiet und in der experimentellen Teratologie gewinnt die Frage nach den Ursachen der Spaltbildung immer mehr an Bedeutung.

Die nach wie vor nicht eindeutig geklärte kausale Genese der Spalten gilt insbesondere für die isolierten LKGS-Spalten. Auf Grund des wechselhaften Erscheinungsbildes der Stammbäume und der großen Merkmalsvariabilität geht man zurzeit von einem multifaktoriellen System mit additiver Polygenie und Schwellenwerteffekt aus. Hiermit ist eine Beteiligung mehrerer Gene in Verbindung mit Umwelteinflüssen gemeint, wobei die genetischen Faktoren als die ätiologischen Kriterien mit dem größten Stellenwert anzusehen sind. Weltweit konzentrieren sich daher verschiedene Arbeitsgruppen auf die Ergründung von Genen, die für die Entstehung nichtsyndrom-assoziiierter Spalten ursächlich oder zumindest mitverantwortlich sind. Kandidatengene, denen ein besonderes Augenmerk gilt, sind unter anderem TGF A, TGF B 2, TGF B3, BCL 3 und RARA.

Im Schrifttum ist die Auseinandersetzung mit dem Homeobox-Gen MSX 1, das auch Gegenstand unserer Untersuchungen ist, ebenfalls besonders häufig. Verschiedene Kopplungs- und Assoziationsanalysen sowie Studien an transgenen Mäusen weisen auf eine Mitbeteiligung dieses Gens an der Entstehung von LKGS-Spalten hin.

MSX 1 ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 4 lokalisiert und weist einen CA-Dinucleotid-Repeat mit vier Allelen auf, die sich jeweils um zwei Basenpaare (bp) unterscheiden: 169, 171, 173 und 175 bp (*Padanilam et al. 1992*).

In der vorliegenden Arbeit beschäftigten wir uns mit der Fragestellung, ob sich bezüglich der Häufigkeitsverteilung dieser vier Allele zwischen Spaltträgern und Kontrollpersonen Unterschiede nachweisen lassen. Findet sich ein bestimmtes Allel statistisch signifikant gehäuft in der Gruppe der Merkmalsträger, kann dies auf einen pathogenetischen Zusammenhang zwischen dem Allel des betreffenden Gens und der Erkrankung hinweisen.

1. 1 Häufigkeit der LKGS-Spalten

Mit einer gegenwärtigen Inzidenz von etwa 2 : 1000 in den mitteleuropäischen und skandinavischen Ländern (*Andrä 1996, Bull 2003*) stellen die LKGS-Spalten insgesamt die zweithäufigste angeborene Fehlbildung des Menschen dar. Bei 70 - 75

% der LKGS-Spalten handelt es sich um isolierte Spaltbildungen, d. h. neben der Spalte liegen keine weiteren begleitenden Fehlbildungen oder Erkrankungen vor. Etwa zwei Drittel aller Träger einer isolierten LKGS-Spalte sind männlich, wohingegen bei der isolierten Gaumenspalte mit einer Inzidenz von circa 0,4 : 1000 (*Arslan-Kirchner 2001*) das weibliche Geschlecht häufiger betroffen ist.

1. 1. 1 Unterschiede in der Häufigkeit nach Populationen

Bezüglich des Auftretens der LKGS-Spalten auf den verschiedenen Kontinenten und bei den verschiedenen Rassen werden in der Häufigkeitsverteilung interessanterweise erhebliche Unterschiede beobachtet. Die Mongoloiden weisen im Gegensatz zu den Europiden eine viel größere Spaltfrequenz auf, während bei der negriden Großrasse eine um ein Vielfaches kleinere Rate existiert.

Vieira und Karras (2002) geben für Populationen mit europäischer Abstammung eine Häufigkeit von 1 : 1000 an, wohingegen diese für Japaner und Chinesen 2,1 bzw. 1,7 : 1000 beträgt. Damit weisen diese beiden Gruppen als Vertreter der asiatischen Großrasse im Vergleich zur weißen Rasse eine fast doppelt so große Spaltfrequenz auf. Die größten Spalthäufigkeiten werden jedoch mit einer Frequenz von 3,6 : 1000 bei der von der mongoloiden Großrasse abstammenden indianischen Nebenrasse beobachtet. Die kleinsten Werte dagegen wurden mit Angaben von 0,3 : 1000 für Bevölkerungsgruppen afrikanischer Abstammung ermittelt.

1. 1. 2 Ursachen für die Häufigkeitszunahme

In den letzten 100 Jahren ist eine kontinuierliche Zunahme des Anteils der LKGS-Spalten an den kongenitalen Fehlbildungen um das Dreifache zu verzeichnen (*Andrä 1996*). Für diese Häufigkeitszunahme werden verschiedene Ursachen diskutiert.

Zunächst ist hier die verbesserte Diagnostik zu nennen, die die Erfassung vieler Mikroformen erlaubt und damit zu einer scheinbaren Zunahme der Spalten führt. Daneben gibt es aber auch Faktoren, die zu einer realen Steigerung der Spaltanzahl geführt haben. Hierzu gehören die Abnahme der Säuglings- und Operationssterblichkeit. Einen weiteren wichtigen Punkt stellen die enormen

Fortschritte bezüglich der rehabilitativen Maßnahmen bei Spaltträgern dar. Ein interdisziplinäres Betreuungskonzept von Mund-Kiefer-Gesichtschirurgen, Pädiatern, HNO-Ärzten, Kieferorthopäden, Zahnärzten, Logopäden und Psychologen hat bessere ästhetische und funktionelle Behandlungsergebnisse zur Folge (*Shaw et al. 2000*). Während die Betroffenen zu Zeiten mit weniger guten Therapiemöglichkeiten als Außenseiter in der Gesellschaft galten, wird ihnen durch die heutigen hochwirksamen Behandlungsmethoden die Partnerfindung erleichtert. Hierdurch kommt es auch vermehrt zur Zeugung von Nachkommen, die ebenfalls Spaltträger sind.

1. 2 Nomenklatur der LKGS-Spalten

Die LKGS-Spalten treten mit einer großen Variationsbreite auf, wobei nach *Andrä (1996)* mindestens 30 verschiedene Erscheinungsformen zu unterscheiden sind. Die Ausprägungsgrade reichen hierbei von Mikrosymptomen über partielle Spalten bis hin zu totalen doppelseitigen LKGS-Spalten unterschiedlichen Schweregrades.

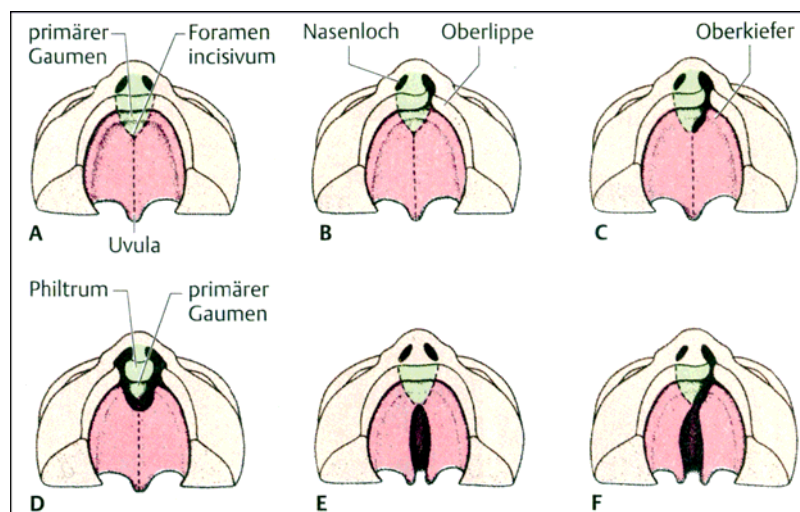


Abb. 1. 1: Schematische Darstellung einiger Spaltausprägungen

- A: keine Spalte**
- B: Lippenspalte linksseitig**
- C: Lippen-Kieferspalte linksseitig**
- D: Lippen-Kieferspalte beidseitig**
- E: Gaumenspalte**
- F: Lippen-Kiefer-Gaumenspalte linksseitig**

(Aus: Sadler TW. 1998. Medizinische Embryologie. Die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen. Stuttgart-New York: Thieme-Verlag, S.347)

Dieser Formenreichtum erfordert eine Nomenklatur, die eine einfache, vollständige, flexible und exakte Dokumentation ermöglicht, so dass auch noch nach mehreren Operationschritten eine korrekte Reproduktion der präoperativen Ausgangsdiagnose als Grundlage für Forschung und weitere Therapie gewährleistet ist. Zur Erstellung einer solchen Klassifikation sind bis in die jüngste Vergangenheit hinein unterschiedliche Vorschläge unterbreitet worden.

Eine der ersten Einteilungen der LKGS-Spalten erfolgte unter Berücksichtigung des anatomischen Verlaufs und der Seitenlokalisation (*Davis und Ritchie 1922*). *Veau* nahm 1931 ebenfalls in Bezug auf die (Seiten-)Lokalisation eine Vier-Gruppeneinteilung vor. In Anlehnung an die embryonale Entwicklung folgten weitere Klassifikationen (*Veau 1937, Fogh-Anderson 1942, Kernahan und Stark 1958*). Die Unterscheidung zwischen Spalten des primären und/oder des sekundären Gaumens ist der Kernpunkt aller genannten Einteilungen nach embryonalen Gesichtspunkten.

Im Rahmen der Entwicklung der „Thallwitzer Nomenklatur“ wurden die vier topographischen Abschnitte unterteilt und Kurzbezeichnungen für Lippe (L), Kiefer (K), Gaumen (G) und Segel (S) eingeführt (*Koch 1963*). Arabische und römische Ziffern kennzeichneten die Ausdehnung der jeweiligen Spalte bzw. submuköse und subkutane Verlaufsformen.

1968 wurde die angloamerikanische Terminologie mit ihren Symbolen Lip (L), Alveolus (A), Hard (H) and Soft (S) Palate als LAHS-Kode international eingeführt. Hieraus entstand die LAHSHAL-Kodierung, die neben der Spaltlokalisation über Klein- und Großbuchstaben sowie weitere Zusatzzeichen alle möglichen Spaltkombinationen und Mikroformen erfasst (*Kriens 1987*).

Dieser Kode wurde in abgewandelter Form in Mainz vom Deutschen Interdisziplinären Arbeitskreis Lippen-Kiefer-Gaumenspalten/Kraniofaziale Anomalien als Grundlage für die Minimaldokumentation von Lippen-, Kiefer-, Gaumen- und Segelspalten bestimmt (*Koch 2003*). Hiernach wird die transversale Ausdehnung mit dem LAHSHAL-Kode kenntlich gemacht. Zudem wird empfohlen, vertikal über dem Oberkiefer befindliche fehlgebildete Strukturen der äußeren Nase (N = Nose) und der inneren Nase (V = Vomer) einzuschließen. Ihre spezifische Ausprägung und ihr Verlauf können oberhalb der entsprechenden Regionskodizes L und H kodiert werden (Abb. 1. 2). In Schrift und Sprache könnte die Angabe der Nasen- und Vomerfehlbildung als Kürzel hinter der Formel erfolgen: LAHSNV. Der

Ausprägungsgrad und die Verlaufsform als die beiden Unterformen des Schweregrades werden jeweils in 3 Graden angegeben, die mittels einer 1. bzw. 2. Ziffer hinter dem jeweiligen Regionssymbol kodiert werden.

N	V	V	N			
L	A	H	S	H	A	L

Abb. 1. 2: LAHSHAL-Kode zur Minimaldokumentation der LKGS-Spalten

N = Nose, V = Vomer, L = Lip, A = Alveolus, H = Hard Palate, S = Soft Palate

1. 3 Formale Genese der LKGS-Spalten

Bei den LKGS-Spalten handelt es sich um Entwicklungsanomalien während der Embryonalperiode im Bereich der Kopfanlage und der ersten beiden Viszeralbögen (*Moore 1990, Moore 1996*).

1. 3. 1 Entwicklung des Gesichts

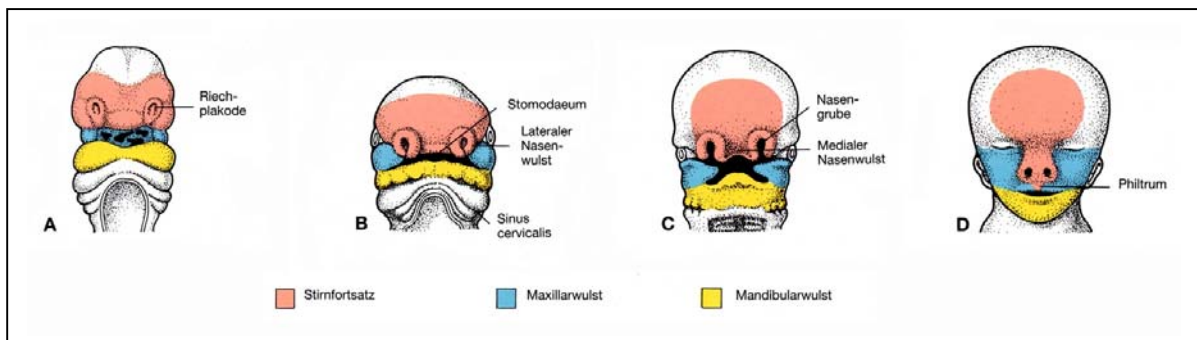


Abb. 1. 3: Entwicklung des Gesichtes

(Aus: Moore KL.1996. Grundlagen der medizinischen Embryologie. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag, S. 83.)

Die embryonale Entwicklung des Gesichts erfolgt im Wesentlichen zwischen der 4. und 8. Woche aus dem unpaaren Stirn(nasen)fortsatz, den paarigen Ober- bzw. Unterkieferfortsätzen und den paarigen medialen bzw. lateralen Nasenfortsätzen, die die Begrenzung des primitiven Mundes bilden.

In der 4. Woche wachsen die Unterkieferfortsätze nach medial und verschmelzen miteinander. Auf diese Weise entstehen die Unterlippe, das Kinn und die Mandibula. Zwischen der 5. und 8. Woche fusionieren infolge verschiedener Wachstumsprozesse die medialen Nasenfortsätze miteinander und mit den lateralen Nasenfortsätzen. Aus der Verschmelzung der medialen Nasenfortsätze mit den Oberkieferfortsätzen entsteht das Zwischenkiefersegment, aus dem sich das Philtrum, der mittlere Oberkieferanteil und der primäre Gaumen entwickeln. Die lateralen Teile der Oberlippe, der Oberkiefer und der sekundäre Gaumen bilden sich aus den Oberkieferfortsätzen. Die lateralen Nasenfortsätze verschmelzen im Bereich des Sulcus nasolacimalis ebenfalls mit den Oberkieferfortsätzen, nehmen jedoch nicht an der Entstehung von Oberlippe und Oberkiefer teil. Sie bleiben im Wachstum zurück und bilden später die Nasenflügel.

1. 3. 2 Entwicklung des Gaumens

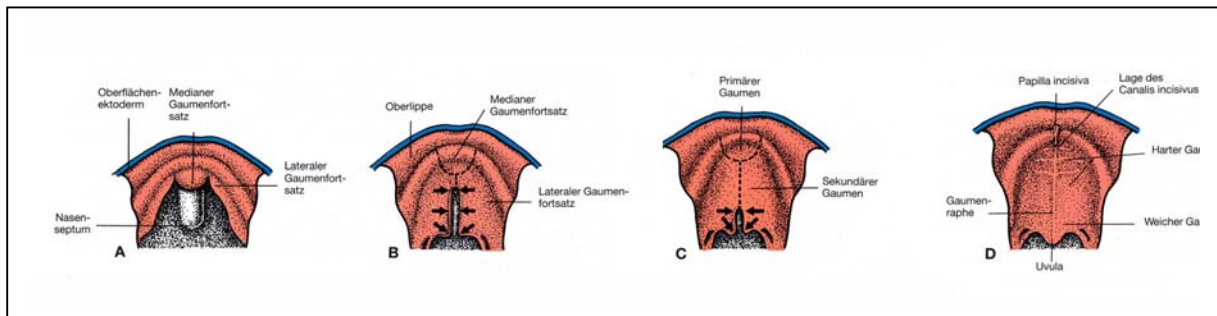


Abb. 1. 4: Entwicklung des Gaumens

(Aus: Moore KL.1996. Grundlagen der medizinischen Embryologie. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag, S. 85.)

Die Verschmelzung des Gaumens findet zwischen der 5. und 12. Woche statt, wobei eine Unterscheidung zwischen primärem und sekundärem Gaumen erfolgt.

Der primäre Gaumen entwickelt sich Ende der 5. Woche aus dem Zwischenkiefersegment und wird zum prämaxillären Teil des Oberkiefers, dem Os incisivum, in welchem die Schneidezähne verankert sind. Der sekundäre Gaumen entsteht während der 7. Woche aus zwei plattenartigen Auswüchsen der Oberkieferfortsätze, den Gaumenfortsätzen. Diese wachsen nach medial, richten sich mit zunehmender Verlagerung der Zunge nach unten auf und fusionieren

schließlich in Richtung von vorne nach hinten miteinander. In umgekehrter Richtung verwachsen sie mit dem primären Gaumen. Der Canalis incisivus bzw. das Foramen incisivum als dessen Rudiment beim Erwachsenen markiert die Grenze zwischen primärem und sekundärem Gaumen. Die hinteren Abschnitte der Gaumenfortsätze verknöchern nicht, sondern bilden den weichen Gaumen und die Uvula. Während dieser Fusionsprozesse wächst das Nasenseptum nach kaudal und vereinigt sich mit dem neu gebildeten Gaumendach.

1. 3. 3 Lippen-, Kiefer- und Gaumenspalten



A



B



C



D

Abb. 1. 5:

Lippen-Kieferspalte mit Gaumenspalte. Abb. A und B zeigen die präoperative Abb. C und D die postoperative Situation

(Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie/Plastische Chirurgie der FSU Jena)

Bei den oben beschriebenen Verschmelzungsprozessen ist zu beachten, dass die Oberfläche der Fortsätze aus Epithel besteht, das im Bereich der Vereinigungsstellen miteinander verwächst und eine Epithelmauer bildet. Für eine normale Entwicklung des Gesichts und des Gaumens ist der rechtzeitige Ersatz dieser Epithelmauer durch Mesenchym notwendig. Laufen diese Vorgänge unvollständig oder fehlerhaft ab, hat dies Spaltbildungen zur Folge.

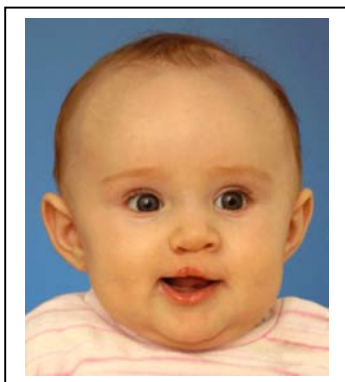
Prinzipiell kann zwischen primären und sekundären Spalten differenziert werden (Pfeiffer 1982), weil ihnen ein unterschiedlicher Entstehungsmechanismus zugrunde liegt. Erstere entstehen, wenn die Bildung einer Epithelmauer unterbleibt und somit kein rechtzeitiger Ersatz durch Mesenchym stattfinden kann. Bei letzteren dagegen wird zwar eine Epithelmauer gebildet, jedoch nicht durch Mesenchym ersetzt. Hierdurch kommt es beim weiteren Wachstum zum partiellen oder totalen Aufreißen der Epithelmauer.



A



B



C



D

Abb. 1. 6:

Lippen-Kieferspalte ohne Gaumenspalte. Abb. A und B zeigen die präoperative Abb. C und D die postoperative Situation

(Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie/Plastische Chirurgie der FSU Jena)

Im Hinblick auf die unterschiedliche embryologische Entstehung lassen sich die LKGS-Spalten in zwei große Gruppen unterteilen. So werden Lippen-, Kieferspalten mit oder ohne Spalte des Gaumens (LK(+/-G)-Spalten) von isolierten Gaumenspalten (G-Spalten) abgegrenzt (Abb. 1. 5, 1. 6 und 1. 7). Lippen-, Kieferspalten entstehen infolge einer Fehlentwicklung des primären Gaumens, Gaumenspalten dagegen durch eine Entwicklungsstörung des sekundären Gaumens. Lippen-, Kieferspalten sind durch eine fehlende Verschmelzung des Oberkieferfortsatzes der betroffenen Seite mit dem von den medialen Nasenfortsätzen gebildeten Zwischenkiefersegment bedingt. Die embryologische Grundlage der Gaumenspalten besteht in der fehlerhaften Fusion der Gaumenfortsätze miteinander, mit dem Nasenseptum und/oder dem primären Gaumen. Die genannten Spalten können sowohl uni- als auch bilateral auftreten.



Abb. 1. 7: Isolierte Gaumenspalte

(Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie/
Plastische Chirurgie der FSU Jena)

1. 3. 4 Seltene Gesichtsspalten

Zu den seltenen Formen kongenitaler Gesichtsfehlbildungen zählen die mediane Spalte der Ober- bzw. der Unterlippe, die bei Ausbleiben der Verschmelzung der Ober- bzw. Unterkieferfortsätze auftritt. Schräge Gesichtsspalten reichen von der Oberlippe bis zum medianen Orbitalrand. Der Ductus nasolacrimalis imponiert dabei als offene Rinne, da sich der Oberkieferfortsatz nicht mit dem medialen und lateralen Nasenfortsatz vereinigt hat. Verwächst der Ober- nicht mit dem Unterkieferfortsatz, entstehen quere Gesichtsspalten, die vom Mundwinkel zum Ohr ziehen. Hieraus resultiert häufig eine Makrostomie. Umgekehrt kommt es zur Mikrostomie, wenn die Verschmelzung von Ober- und Unterkieferfortsatz zu breitflächig erfolgt. Bei der gespaltenen Nase ist die Fusion der medialen Nasenfortsätze unvollständig.

1. 4 Kausale Genese der LKGS-Spalten

Die kausale Genese der LKGS-Spalten ist uneinheitlich und nach wie vor weitgehend ungeklärt. Viele Spalten treten im Rahmen chromosomal bedingter Fehlbildungskomplexe oder monogen bedingter Syndrome auf. In der Literatur lassen sich über 300 Syndrome finden, die mit einer Spalte vergesellschaftet sein können.

Andrä (1996) listet vier Hypothesen auf, die für eine Spaltbildung wahrscheinlich sind. Danach können Chromosomenanomalien (z. B. Trisomien) für diese Missbildung ursächlich sein. Für die Erklärung isolierter Spalten, die etwa 70 – 75 % ausmachen (*Kunstmann 2001, Berge 2002*), kommen sie jedoch nicht in Frage. Ebenso verhält es sich mit der Möglichkeit eines monogenen Erbgangs. Dieser lässt sich bei der Betrachtung isolierter Spaltbildungen nur in einzelnen Sippen belegen. Allein durch peristatische Faktoren verursachte isolierte Spalten wurden ebenfalls extrem selten nachgewiesen. Auf Grund des wechselhaften Erscheinungsbildes der Stammbäume und der großen Merkmalsvariabilität geht man bei der Mehrheit der isolierten Spaltbildungen gegenwärtig von einem multifaktoriellen System mit additiver Polygenie und Schwellenwerteffekt aus (*Mitchell 1992, Schutte und Murray 1999*). Hiermit ist eine Beteiligung mehrerer Gene in Verbindung mit Umwelteinflüssen (z. B. Pharmaka, chemische/physikalische Noxen, O₂-Mangel) gemeint. Dabei sind die genetischen Faktoren als die ätiologischen Kriterien mit dem größten Stellenwert anzusehen sind.

1. 4. 1 Kandidatengene

Weltweit konzentrieren sich verschiedene Arbeitsgruppen auf die Identifizierung von Genen, die für die Entstehung nichtsyndrom-assoziiertes Spalten ursächlich sind. Ein bestimmtes krankheitsverursachendes Gen, das allein für die LKGS-Spalten verantwortlich ist konnte bisher nicht gefunden werden. Der rasche Fortschritt in der Molekulargenetik ermöglichte jedoch die Identifikation einiger Gene, bei denen es Hinweise auf ein Mitwirken an der Entstehung isolierter Spalten gibt.

Im Anhang 1 sind die Kandidatengene zusammengefasst, die in den letzten Jahren untersucht wurden. Die Übersicht gibt neben der Lokalisation der entsprechenden

Gene Auskunft über die Autoren, das Studiendesign (Assoziationsstudie oder Kopplungsanalyse) und die Ergebnisse.

1. 4. 2 Kopplungsanalyse

Das bei einer Kopplungsanalyse beobachtete Phänomen ist die Häufigkeit von Rekombination versus Nichtrekombination. Als Rekombination wird die getrennte Vererbung zweier Loci (Genorte) bezeichnet, d. h. ein Nachkomme besitzt an einem Locus das väterlicherseits und an einem anderen das mütterlicherseits erhaltene Allel (bestimmte Ausprägung eines Genortes). Dies entsteht, wenn die beiden Loci auf verschiedenen Chromosomen oder aber auf dem gleichen Chromosom, aber sehr weit voneinander entfernt lokalisiert sind. Liegen die beiden Loci benachbart auf dem gleichen Chromosom ist eine Rekombination nur dann möglich, wenn zuvor ein Crossing-over stattgefunden hat, was mit zunehmender Nähe zwischen den Loci seltener wird. Daher führt eine benachbarte Lage zweier Loci im Genom in der Regel zu einer Nichtrekombination, d. h. einer gemeinsamen Weitervererbung entweder der väterlichen oder der mütterlichen Allele.

Die Kopplungsanalyse bietet eine Möglichkeit zur Lokalisation von Kandidatengenen der LKGS-Spalten. Voraussetzung ist die Untersuchung von Familien mit Betroffenen in mehreren Generationen. Die Betroffenen zeichnen sich durch einen stark erhöhten Hintergrund an Anfälligkeit aus. Auf diesem familiären Hintergrund führt das Vorhandensein eines Hauptsuszeptibilitätsfaktors zur Überschreitung des Schwellenwertes zur Krankheitsentstehung und damit zur Manifestation der Erkrankung.

Zur Analyse werden bei den Betroffenen und Gesunden in mehreren Generationen hochinformativ genetische Marker bestimmt. Liegt ein genetischer Marker in räumlicher Nähe zum krankheitsverursachenden Gen, wird bei erkrankten Personen ein Allel dieses Markers überzufällig häufig nachweisbar sein.

1. 4. 3 Assoziationsanalyse

Der Assoziationsanalyse liegt ein anderes Grundphänomen als der Kopplungsanalyse zugrunde. Hier wird eine möglicherweise veränderte Frequenz eines Allels bei Merkmalsträgern gegenüber Nichtmerkmalsträgern untersucht. Im Vergleich zur Kopplungsanalyse handelt es sich also nicht um eine Eigenschaft von zwei Loci, sondern von Allelen.

In Assoziationsstudien werden Personen, die ein bestimmtes Merkmal aufweisen, mit einer Kontrollgruppe verglichen, die das Merkmal nicht besitzt. Bei der klassischen Fall-Kontroll-Studie sind die Kontrollpersonen nicht mit den Merkmalsträgern verwandt. Polymorphismen verschiedener Kandidatengene werden bei den Merkmalsträgern und den Kontrollpersonen untersucht und die Häufigkeiten der jeweiligen Allele in beiden Gruppen miteinander verglichen. Findet sich ein Allel statistisch signifikant gehäuft in der Gruppe der Merkmalsträger, kann dies auf einen pathogenetischen Zusammenhang zwischen dem Allel des betreffenden Gens und der Erkrankung hinweisen.

1. 5 Das Kandidatengen MSX 1

Ein Kandidatengen, dem ein besonderes Augenmerk gilt ist das Homeobox-Gen MSX 1. Dieses ist auch Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Die Ergebnisse von Kopplungsanalysen und Assoziationsstudien sowie Untersuchungen an transgenen Mäusen weisen auf eine Mitbeteiligung von MSX 1 an der Entstehung von LKGS-Spalten hin.

1. 5. 1 Die Homeobox-Gene

Homeobox-Gene stellen eine große Familie entwicklungsregulatorischer Gene dar, die sowohl bei Nichtvertebraten als auch bei Vertebraten während der frühen Entwicklung als Regulatoren von Transkriptionsvorgängen eine Schlüsselrolle spielen. Sie liefern Informationen für Proteine, welche die Transkription anderer Genkomplexe regulieren (*Gehring 1993*) und wirken damit auf die Musterbildung

während der Embryonalentwicklung vielzelliger Organismen ein. Die Musterbildung, d. h. die dreidimensionale räumliche Anordnung von Organen und Geweben, basiert auf einem Zusammenspiel molekularer Signale, deren Gesamtheit als Positionsinformation verwirklicht wird und auf die Entwicklung der Lagebeziehungen von Zellgruppen einwirkt. Die Positionsinformation entsteht durch lokale Unterschiede in der Konzentration regulatorischer Proteine, die spezifische Gene aktivieren bzw. reprimieren.

Bei der Homeobox-Genklasse handelt es sich um DNA-Segmente, die Homeobox, die für einen Proteinabschnitt kodiert, den man als Homeodomäne bezeichnet. Diese Homeodomäne bildet ein sogenanntes Helix-Turn-Helix-Motiv, das sich auf einen spezifischen DNA-Abschnitt nachgeschalteter Gene setzt und durch Interaktionen mit anderen Zellbestandteilen diese Zielgene an- oder ausschaltet.

Die Klasse der Homeobox-Gene wurde 1984 erstmalig bei der Fruchtfliege *Drosophila* beschrieben (*McGinnis 1984*). Seitdem wurden Homeobox-Gene in verschiedenen anderen Organismen entdeckt. Eine Besonderheit der Homeobox-Gene ist mit Werten von 60 – 80 % die erstaunliche Ähnlichkeit der Homeobox bei allen Tieren. Eine noch größere Übereinstimmung findet man bei den von der Homeobox kodierten Proteinabschnitten. Bei den Homeobox-Genen handelt es sich damit um hochkonservierte DNA-Regionen. Als hochkonserviert bezeichnet man das Phänomen, dass Gene oder Basenfolgen sowohl bei frühzeitlichen als auch bei heutigen Lebensformen vorkommen. Es wird davon ausgegangen, dass diese Gene bzw. ihre Genprodukte (fast) unverändert blieben, weil sie sich in der Evolution besonders bewährt haben.

Während bei *Drosophila* nur ein einziger Komplex von Homeobox-Genen bekannt ist, besitzen Wirbeltiere vier unterschiedliche Komplexe auf vier verschiedenen Chromosomen, die jeweils bis zu 13 HOX-Gene umfassen (*Gehring 1994*). Die Gene eines Komplexes werden zeitlich nacheinander und colinear zur Körperachse exprimiert.

1. 5. 2 Die MSX-Familie der Homeobox-Gene

Die MSX-Familie der Homeobox-Gene weist ausgeprägte Homologien zu den *Drosophila*-msh (muscle segment homeobox)-Genen auf (*Davidson 1995*). Bei ihrer

Entdeckung wurden sie ursprünglich als HOX 7 und HOX 8 bezeichnet. Nachdem jedoch ihre Homologie zu den Drosophila-msh-Genen bekannt wurde, wurden sie in MSX 1 und MSX 2 umbenannt. Transkripte von MSX-Genen spielen bei der Embryonalentwicklung verschiedener Wirbeltiere eine Rolle.

1. 5. 3 Das Homeobox-Gen MSX 1

1. 5. 3. 1 Identifizierung und Charakterisierung von MSX 1

Seit Ende der 80-er Jahre wurde bei verschiedenen Spezies das Drosophila-msh-Homolog MSX 1 (HOX 7) identifiziert (*Robert 1989, Hill 1989, Ivens 1990, Su 1991, Takahashi 1990, Holland 1991, Suzuki 1991*). Das MSX 1-Homeobox-Gen wird während der Embryonalentwicklung an diversen Stellen exprimiert, an denen Epithel-Mesenchym-Interaktionen stattfinden und ist damit an den Signalprozessen zwischen verschiedenen Gewebeschichten beteiligt. Die Transkripte dieses Gens wurden bei einer ganzen Reihe von Wirbeltierembryos in sich entwickelnden mesodermalen und neuralen Geweben, in den Gliedmaßen und in den Herzklappen nachgewiesen. Das Maus-HOX 7-Gen zeigt außerdem ein orts- und zeitspezifisches Expressionsmuster während der embryonalen Entwicklung des Gesichtsschädels (*Mackenzie 1991*).

Hewitt et al. (1991) isolierten ein Kosmid aus einer Genbibliothek, welches die Sequenz des humanen MSX 1 (HOX 7)-Gens enthielt und bestimmten mittels Hybridisierung die kodierenden Abschnitte. Desweiteren wurden Vergleiche zwischen den kodierenden Sequenzen des humanen MSX 1 (HOX 7)-Gens und der HOX 7-cDNA der Maus angestellt. Hierbei wurde eine Sequenzübereinstimmung der beiden Homeobox-Gene von 94 % beobachtet. Die Aminosäuresequenzen der jeweiligen Genprodukte stimmten in 80 % überein.

Padanilam et al. berichteten 1992 ebenfalls über die Klonierung und die Charakterisierung der humanen MSX 1 (HOX 7)-cDNA. Die cDNA wurde aus einer Genbibliothek isoliert, die anhand von Material aus dem Gesichtsschädel menschlicher Embryonen erstellt wurde. Im Rahmen ihrer Untersuchungen gelang es *Padanilam et al.* zudem in nichtkodierenden DNA-Abschnitten einen CA-Dinucleotid-Repeat zu identifizieren und Primer zu erstellen, die diesen Mikrosatelliten flankieren und damit die Amplifikation der entsprechenden DNA-Abschnitte ermöglichen.

Nachfolgend wurde eine Genotypisierung dieses Mikrosatelliten durchgeführt. Hierbei konnten vier verschiedene Allele nachgewiesen werden, die sich jeweils um zwei Basenpaare (bp) unterscheiden: 169, 171, 173 und 175 bp. Anhand der Ergebnisse von *Padanilam et al.* war es außerdem möglich, das humane MSX 1 (HOX 7)-Gen auf einer definierten Position auf dem kurzen Arm des Chromosoms 4 zu kartieren: 4p16.1 - 16.3.

1. 5. 3. 2 Mausversuche zu MSX 1

Die Beteiligung von MSX 1 bei der Spaltgenese wurde bisher sowohl durch Human- als auch durch Mausstudien erhärtet.

Satokata und Maas (1994) führten eine Knockout-Studie mit transgenen Mäusen durch, die homozygot für ein MSX 1-Nullallel ($MSX 1^{-}/MSX 1^{-}$) waren, d. h. die Versuchstiere verfügten über ein nicht funktionierendes MSX 1-Gen, und beobachteten die daraus resultierenden phänotypischen Konsequenzen. Alle Versuchstiere zeigten vorherrschend eine Spalte des sekundären Gaumens, wobei dieser $MSX 1^{-}/MSX 1^{-}$ -Phänotyp mit der Gaumenspalte beim Menschen vergleichbar ist. Zudem manifestierte ein Großteil der Tiere eine mangelhafte Ausbildung des Alveolarfortsatzes der Mandibula und der Maxilla und eine unterbliebene Entwicklung bestimmter Zahnknospen. Weitere Fehlbildungen betrafen das Os nasale, das Os frontale und das Os parietale sowie den Malleus im Mittelohr. *Houzelstein et al. (1997)* generierten MSX 1-Nullallel-Mäuse durch Insertion eines *nlacZ*-Reporter-Gens anstelle der MSX 1-Homeobox. Versuchstiere, die homozygot für ein MSX 1-Nullallel ($MSX 1^{-}/MSX 1^{-}$) waren, zeigten die gleichen Fehlbildungen, die bereits von *Satokata und Maas* beschrieben wurden. Im Unterschied zu den Mäusen von *Satokata und Maas* wiesen die Tiere jedoch zusätzlich eine mediane Unterkieferspalte auf. Außerdem litten sie unter schwerer Atemnot mit nachfolgender Zyanose und verstarben einige Stunden nach der Geburt.

Weitere Arbeitsgruppen studierten anhand von Versuchen mit transgenen Mäusen die Rolle von MSX 1 innerhalb verschiedener Signalkaskaden. *Thomas et al. (1998)* z. B. untersuchten eine Signalkaskade, in der die epitheliale Sekretion von Endothelin-1 anscheinend die mesenchymale Expression von dHAND stimuliert, welches wiederum die MSX 1-Expression reguliert. Mäuse, die ein Nullallel für das

Endothelin-1-Gen aufwiesen, manifestierten neben Defekten des Aortenbogens auch kraniofaziale Fehlbildungen. *Peters et al. (1998)* beschrieben bei Mäusen u. a. die Ausbildung einer Spalte des sekundären Gaumens als Folge eines nicht funktionierenden Pax9-Gens, das über Bmp4 ebenfalls die Expression von MSX 1 zu regulieren scheint. *Zhang et al. (2002, 2003)* züchteten nach dem Vorbild von *Satokata und Maas* MSX 1⁻/MSX 1⁻-Mäuse mit den gleichen Fehlbildungen, um in darauf aufbauenden Versuchen die Signalwirkung von MSX 1 zu untersuchen. Hierbei zeigte sich, dass MSX 1 Bmp4, Shh und Bmp2 vorgestaltet ist und die Transkription dieser Gene zu beeinflussen scheint, wobei Bmp4 dem MSX 1-Gen nicht nur nach- sondern auch vorgeschaltet ist.

1. 5. 3. 3 Humanstudien zu MSX 1

Basierend auf Tiemodellen mit kraniofazialen Missbildungen, die mit einigen Spaltausprägungen beim Menschen vergleichbar sind, wurde angenommen, dass MSX 1 auch bei der Spaltgenese des Menschen eine entscheidende Rolle spielt. Mittlerweile gehört es zu den Kandidatengenen, für die ein möglicher Zusammenhang zu den nicht-syndromassoziierten LKGS-Spalten am häufigsten untersucht wurde (Tabelle 5. 1). Neben klassischen Fall-Kontroll-Studien liegen mittlerweile zahlreiche familienbasierte Assoziationsstudien, Kopplungs- sowie Mutationsanalysen vor, wobei die Ergebnisse uneinheitlich sind.

a) Kopplungsanalysen

Stein et al. (1995) waren die ersten, die sich im Zusammenhang mit der Spaltgenese beim Menschen mit dem Kandidatengen MSX 1 auseinandersetzten. Sie untersuchten in einer Kopplungsanalyse 39 Familien aus den USA, England und der Tschechoslowakei, konnten jedoch über keine signifikanten Ergebnisse berichten. Erste positive Ergebnisse einer Kopplungsanalyse lieferten *Lidral et al. (1998)*. Ihre Stichprobe umfasste 194 Spaltträgerfamilien. Aufgrund der unterschiedlichen formalen Genese wurde zwischen LK(+/-G)-Spalten und G-Spalten unterschieden, wobei für beide Gruppen eine Kopplung zu MSX 1 aufgezeigt werden konnte. *Beaty et al. (2002)* wiesen in ihrer Studie, in der sie 269 Spaltträger aus den USA und deren Eltern untersuchten, ebenfalls eine Kopplung von MSX 1 zu LKGS-Spalten

nach. Andere Arbeitsgruppen dagegen konnten eine Kopplung von MSX 1 zu LKGS-Spalten nicht bestätigen (*Marazita et al. 2002, Scapoli et al. 2002*). In Kopplungsanalysen neuere Datums konnten für eine finnische (*Koillinen et al. 2003*) bzw. indische Stichprobe (*Field et al. 2004*) auch keine signifikanten Ergebnisse nachgewiesen werden.

b) Klassische Fall-Kontroll-Studien

Lidral et al. (1997) führten eine der ersten Studie durch, in der eine mögliche Assoziation von MSX 1 zu LKGS-Spalten untersucht wurde. Allerdings konnten sie zwischen den aus den Philippinen stammenden Spaltträgern und Kontrollen keine Unterschiede in der Allelfrequenz nachweisen. *Hwang et al. (1998)* konnten anhand von Untersuchungen an Spaltträgern aus den USA (N = unbekannt) ebenfalls keine Assoziation von MSX 1 zu irgendeiner Spaltform aufzeigen.

Romitti et al. (1999) dagegen gelang für ihr US-amerikanisches Krankengut der Nachweis einer positiven Assoziation von MSX 1 sowohl mit LKGS-Spalten als auch mit G-Spalten. Die Ergebnisse von *Beaty et al. (2001)* zeigten zwischen Trägern einer G-Spalte (N = 44) und Kontrollpersonen einen signifikanten Unterschied in der Allelverteilung. *Mitchell et al. (2001)* und *Hecht et al. (2002)* konnten für ihr Untersuchungsgut aus Dänemark bzw. den USA über keine Assoziation berichten.

c) Familienbasierte Assoziationsstudien

Scapoli et al. (2001) führten bei einer Stichprobe von 38 Familientrios eine Analyse der Allelfrequenz von MSX 1 durch und konnten keinen Zusammenhang zwischen dem Gen und nicht-syndromalen LKGS-Spalten finden. *Beaty et al. (2002)* dagegen berichteten für ihr Untersuchungsgut über signifikante Assoziationen, während *Marazita et al. (2002)* anhand ihrer 60 chinesische Familien umfassende Studie keine Beziehung von MSX 1 zu LKGS-Spalten bestätigen konnten.

Dagegen gelang anderen Arbeitsgruppen das Replizieren positiver Ergebnisse. Die Ergebnisse von *Fallin et al. (2003)* anhand eines 206 Patienten umfassenden Kollektivs aus der gleichen Bevölkerungsgruppe stimmten mit denen von *Beaty et al.* überein. *Jugessur et al. (2003)* wiesen für ihre 162 norwegische Spaltträger umfassende Studie eine geringe Assoziation zwischen MSX 1 und G-Spalten nach.

Vieira et al. (2003) untersuchten 176 Spaltträger aus Lateinamerika und entdeckten eine signifikante Assoziation zwischen MSX 1 und LKGS-Spalten. Auch in später veröffentlichten Studien von *Suzuki et al. (2004)* an einem vietnamesischen Krankengut (N = 162) und *Suazo et al. (2004)* an 60 Familientrios wurde eine Assoziation bestätigt. *Koillinen et al. (2003)* und *Field et al. (2004)* wiederum konnten keine signifikanten Abweichungen zwischen Merkmalsträgern und entsprechenden Kontrollen nachweisen.

c) Mutationsanalysen

Basis der Mutationsanalysen sind vorausgegangene Untersuchungen, in denen zwischen Spaltträgern und Kontrollen ein signifikanter Unterschied in der Häufigkeitsverteilung eines bestimmten Allels ermittelt wurden. Man nimmt an, dass in dem entsprechenden Allel Mutationen vorliegen, welche für die Entstehung von LKGS-Spalten verantwortlich sind.

Bereits *Lidral et al. (1998)* führten eine Mutationssuche des MSX 1-Gens durch. Hierbei wurden zwar keine den Spalten gemeinsame Mutation identifiziert, trotzdem ging man davon aus, dass die Ergebnisse die Basis für zukünftige Mutationsanalysen bilden. Mittlerweile wurden in verschiedenen Studien diverse Mutationen nachgewiesen, die als mögliche Ursache für nicht-syndromassoziierte LKGS-Spalten deklariert werden. Entsprechende Beweise stehen jedoch aus.

In einer groß angelegten internationalen Studie untersuchten *Jezewski et al. (2003)* eine panethnische Stichprobe, die sich aus 917 Spaltträgern aus Europa, Asien und Südamerika zusammensetzte. Hierbei wurde bei 2 % der Spaltträger eine Missense- oder Punktmutation im MSX 1-Gen identifiziert, während keine der 500 Kontrollpersonen eine Mutation in diesem DNA-Abschnitt aufwies. *Suzuki et al. (2004)* berichteten über zwei Missense-Mutationen, wobei eine dieser Mutationen bei circa 2 % des untersuchten Materials nachweisbar war. *Vieira et al. (2004, 2005)* konnten in ihren Arbeiten ebenfalls Missens- bzw. Punktmutationen nachweisen. In erst kürzlich erschienen Studien (*Modesto et al. 2006, Lace et al. 2006, Tongkopetch et al. 2006*) konnten ebenfalls verschiedene Mutationen identifiziert werden.

2. Ziel der Arbeit

Wie in den vergangenen Abschnitten bereits erläutert, handelt es sich bei MSX 1 um ein besonders seit den 90-er Jahren intensiv untersuchtes Kandidatengen für orofaziale Spaltbildungen. Basierend auf den Ergebnissen verschiedener Mausstudien wurden bisher Assoziationsanalysen für diverse Populationen durchgeführt. Für deutsche Bevölkerungsgruppen liegen bislang keine derartigen Studien vor.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es daher, eine solche Assoziationsstudie an einer aus Deutschland stammenden Stichprobe durchzuführen. Auf Grund der bisherigen Erforschungen zu MSX 1 entschieden wir uns dieses Gen an einem Krankengut der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie und Plastische Chirurgie der Friedrich Schiller-Universität Jena auf eine Assoziation mit LKGS-Spalten zu untersuchen.

Hierzu wird anhand von DNA-Proben von Spaltträgern und gesunden Kontrollen mittels molekulargenetischen Methoden eine Allelbestimmung durchgeführt, um festzustellen wie viele verschiedene Allele des CA-Dinucleotid-Repeats des MSX 1-Gens bei unserem Untersuchungsgut vorliegen. Anschließend wird die Verteilung der entsprechenden Allele ermittelt und durch statistische Auswertung der Allelhäufigkeitsverteilung bestimmt, ob zwischen den untersuchten Spaltträgern und Kontrollpersonen ein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit eines dieser Allele besteht und damit für das vorliegende Kollektiv eine Assoziation von MSX 1 zu LKGS-Spalten vorliegt.

3. Material und Methoden

3. 1 Patientengut und Untersuchungsmaterial

Bei den untersuchten Probanden handelte es sich um 63 (36 männliche und 27 weibliche) nicht miteinander verwandte Träger einer nichtsyndrom-assoziierten Spalte und 75 (38 männliche und 37 weibliche) gesunde und ebenfalls nichtverwandte Kontrollen. Letztere wiesen keine Spaltanamnese in der Familie auf, während die Spaltträger sowohl aus simplexen (N = 43) als auch aus multiplexen (N = 20) Familien stammten. Syndromale Spalten wurden aus dieser Studie ausgeschlossen. Das Vorliegen eines Syndrom wurde anhand einer ausführlichen Anamnese und des klinischen Befundes beurteilt. Alle untersuchten Personen waren deutscher Herkunft.

Die Spaltträger entstammten dem Krankengut der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie/Plastische Chirurgie der Friedrich Schiller-Universität Jena. Während des Zeitraums der Materialsammlung waren sie in die Spaltträgersprechstunde bzw. zur stationären Aufnahme in die Klinik einbestellt. Die Kontrollgruppe rekrutierte sich aus Patienten der Klinik für Kieferorthopädie der Friedrich Schiller-Universität Jena sowie aus Mitarbeitern und Studenten der Friedrich Schiller-Universität Jena oder deren Angehörigen.

Nach Aufklärung über Gegenstand und Ziel der vorliegenden Studie wurde von den Probanden bzw. ihrer Eltern die Zustimmung zur Entnahme einer Blutprobe für diesen Zweck erbeten. Bei Unterzeichnung einer Einverständniserklärung wurde jedem Probanden ca. 2 ml Blut entnommen.

3. 2 Molekulargenetische Methoden

Die Untersuchungen des Materials wurden im Labor des Rechtsmedizinischen Institutes der Friedrich Schiller-Universität Jena durchgeführt.

3. 2. 1 DNA-Extraktion

Zunächst wurden die gesammelten Blutproben auf Filterpapierkarten (Forensic Stain Card) ausgetropft und getrocknet. Aus diesem Trockenblut wurde die DNA aus den kernhaltigen Leukozyten mit der Methode nach Old extrahiert. Das Prinzip dieser Methode ist die Zellyse mit anschließender Trennung der DNA von den übrigen Zellbestandteilen mittels chemischer Ausfällung und Zentrifugation. Hierzu wurden 450 µl 1x Old-T-Puffer (1,5 M NaCl, 250 mM EDTA-Na₂, 100 mM Tris-HCl, 1,0 l Aqua bidest.), 50 µl Proteinase K, 5 µl 20-%ige SDS-Lösung und ein 0,5 x 0,5 cm großes Stück aus der zu untersuchenden ausgetropften Blutkarte in ein Reaktionsgefäß gegeben und über Nacht bei 37° C inkubiert.

Tabelle 3. 1:

Zusammensetzung des Old-T-Puffers

Reagenzien	Menge
NaCl	1, 5 M
EDTA-Na ₂	250 mM
Tris-HCl	100 mM
Aqua bidest.	1, 0 l

Am nächsten Tag wurde das Reaktionsgemisch mit 500 µl Phenol versetzt, 3 Minuten geschüttelt und 5 Minuten bei 13 000 U/min zentrifugiert. Es folgte das Abpipettieren des DNA-haltigen Überstandes, die Überführung in ein neues Reaktionsgefäß, die nochmalige Versetzung mit 500 µl Phenol, 3-minütiges Schütteln und 5-minütiges Zentrifugieren bei 13 000 U/min. Die obere Schicht wurde wieder abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss erfolgte die zweimalige Wiederholung der Reinigungsprozedur mit 500 µl Chloroform. Nach der Chloroformreinigung wurde der Überstand abpipettiert, in ein Reaktionsgefäß mit 30 µl 7,5 M CH₃COONH₄ überführt, mit dem 2-fachen Volumen absolutem Ethanol aufgefüllt und geschwenkt. Über Nacht wurde die DNA bei – 20° C ausgefällt.

Am nächsten Tag wurde das Reaktionsgemisch 20 Minuten bei 13 000 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es blieb ein DNA-Pellet zurück, das mit 2 ml 70-%igem Ethanol gewaschen wurde. Anschließend nochmaliges 20-minütiges Zentrifugieren bei 13 000 U/min und Verwerfen des Überstandes. Das Pellet wurde bei 60° C getrocknet und mit 100 µl sterilem Aqua bidest. gelöst.

3. 2. 2 PCR-Amplifikation

Zur weiteren Analyse wurden die (CA)_n-Mikrosatelliten-Sequenzen (CA-Dinucleotid-Repeats) mit den von *Padanilam et al. (1992)* beschriebenen Primern (vorwärts 5'-GGGCATGTTGATGTCTGCTGAC-3' und rückwärts 5'-TTAGATTGTCATCAGTCCTC-3') mittels Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR) vervielfältigt.

Die Polymerasekettenreaktion ermöglicht es mit Hilfe spezifischer, hitzestabiler Enzyme DNA-Abschnitte definierter Größe in vitro zu amplifizieren. Voraussetzung für die Durchführung einer PCR ist, dass die Randbereiche der zu vervielfältigenden Nukleotidsequenz bekannt sind. Zwei zu diesen Randbereichen komplementären Oligonukleotide, die Primer, fungieren für die DNA-Polymerase als Startmoleküle zur DNA-Synthese.

Tabelle 3. 2:

Reaktionsansatz für PCR

Reagenzien	Menge
DNA	1, 0 µl
Vorwärts-Primer (5'-GGGCATGTTGATGTCTGCTGAC-3')	2, 5 µl
Rückwärts-Primer (5'-TTAGATTGTCATCAGTCCTC-3')	2, 5 µl
dNTPs (A, C, G, T)	0,25 µl
Taq-Polymerase	0, 2 µl
BSA (bovine serum albumin)	0, 5 µl
Puffer	2, 5 µl
Aqua bidest.	15, 55 µl

Die Amplifikationen wurden in einem Reagenziengemisch durchgeführt, das jeweils 1 µl des DNA-Extraktes, 2,5 µl PCR-Puffer (GeneAmp® 10X PCR Buffer), 1,5 µl MgCl₂, 0,25 µl dNTPs (Desoxyadenosin (A), -cytosin (C), -guanosin (G) und -thymidin (T)), 0,5 µl BSA (bovine serum albumin), 2,5 µl von jedem Primer (erstgenannter war fluoreszenzmarkiert) und 0,2 µl Taq-Polymerase (AmpliAq Gold® 5U/µl) enthielt und mit sterilem Aqua bidest. auf das Gesamtvolumen von 25 µl aufgefüllt wurde (Tabelle 3. 2).

Die Reaktionsansätze wurden vorsichtig gevortext, 1 Minute bei 13 000 U/min zentrifugiert und in den Thermocycler Biometra® gestellt, der mit folgendem Programm gestartet wurde. Zunächst erfolgte eine 6-minütige Erhitzung des Reaktionsgemisches auf 94° C. Dieser anfängliche Denaturierungsschritt trennt die DNA-Doppelhelix in Einzelstränge auf, die als Matrize für die Synthese komplementärer Stränge dienen. Dann wurden 32 Zyklen angeschlossen, in denen jeweils folgende Schritte durchlaufen wurden: 1-minütige DNA-Denaturierung bei 94° C, zur Anlagerung der Primer an die Einzelstränge (Annealing) für 1 Minute Senkung der Temperatur auf 50° C und für die Synthese der komplementären Stränge durch die DNA-Polymerase (Elongation) 30 Sekunden lang Erhöhung der Temperatur auf 72° C. Dieser Zyklus aus Denaturierung→Annealing→Elongation gewährleistet, dass für weitere Untersuchungen eine ausreichende Menge spezifischer DNA-Zielsequenzkopien hergestellt worden ist. Die neu synthetisierten Tochterstränge dienen im nächsten Zyklus selbst als Matrizen, so dass nach n Zyklen ein theoretisches Maximum von 2ⁿ DNA-Moleküle der gewünschten DNA-Zielsequenz synthetisiert ist. Das Endprodukt wurde abschließend weitere 10 Minuten bei 72° C inkubiert. Die abschließende Elongation gewährleistet eine vollständige Polymerisation aller DNA-Fragmente.

Tabelle 3. 3:
Einstellungsparameter für PCR (32 Zyklen)

Zyklusschritt	Temperatur	Dauer
Denaturierung	95° C	60 sec.
Annealing	50° C	60 sec.
Elongation	72° C	30 sec.

3. 2. 3 Gel-Elektrophorese

Zur Überprüfung der Amplifikationseffizienz wurden von jedem PCR-Produkt 3,5 µl auf ein 8,9 %-iges Acryl-PDA-Gel (4,5 ml 30 %-iges Acryl-PDA, 7,5 ml Aqua bidest., 3,0 ml 35 mM Tris-Sulfat, 105 µl 10 %-iges Ammoniumpersulfat und 5,3 µl TEMET) aufgetragen und es erfolgte die Auftrennung der DNA-Moleküle in einer Elektrophorese durch Wanderung im elektrischen Feld bei 1000 Volt, 40 mA, 15 Watt und 12° C. Da die Phosphatreste der DNA bei neutralem pH-Wert in ionisierter Form vorliegen, wandern sie im elektrischen Feld zur Anode. Durch Auflegen eines mit Bromphenolblau durchgefärbten Agarosegelstreifens wird eine visuelle Abschätzung des Gellaufes ermöglicht, da das sichtbare Bromphenolblau in der Elektrophorese mit den unsichtbaren PCR-Proben mitwandert. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist abhängig von der Molekülgröße und Konformation der DNA, der Gesamtladung des Moleküls, der Acryl-PDA-Konzentration des Gels und den eingestellten Größen der Elektrophorese.

Die so entstandenen Banden wurden mit einer Silberfärbung sichtbar gemacht. Das Gel wurde hierzu zuerst 5 Minuten lang in einer 2,5%-igen HNO₃-Lösung und dann zur Anlagerung der positiv geladenen Silberionen an die negativ geladenen Phosphatreste der DNA 20 Minuten lang in AgNO₃ inkubiert. Anschließend folgte die Entwicklung des Gels in einer 2%-igen Na₂CO₃-Lösung. Die Entwicklerlösung wurde mehrfach erneuert und das Gel so lange inkubiert bis die Färbung die gewünschte Intensität erreicht hatte. Die Reaktion wurde mit einer 4,5%-igen CH₃COOH-Lösung gestoppt. Nach Abschluss der Färbung wurde das Gel getrocknet und in Folie eingeschweisst.

Die als scharfe Bande sichtbaren PCR-Produkte befinden sich gemäß ihrer Größe auf unterschiedlicher Höhe auf dem Acryl-PDA-Gel. Zusätzliche Banden entstehen durch unspezifische Anlagerung der Primer oder ungleiche Primermengen.

3. 2. 4 Fragmentlängenanalyse

Bei einem positiven Ergebnis in der Elektrophorese wurden entsprechend der Bandenintensität auf dem Gel 0,5 - 5 µl des PCR-Produktes mit 12 µl deionisiertem Formamid, welches die Dichte der Probe erhöht, und 0,5 µl eines Längenstandards

versetzt und nach 3-minütiger Denaturierung bei 95° C in einer Kapillarelektrophorese (ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer) einer Fragmentlängenanalyse unterzogen.

Der ABI PRISM® 310 trennt DNA-Moleküle unter Einwirkung eines Stromflusses mit einer definierten elektrischen Spannung und bei einer definierten Temperatur innerhalb eines Polymers größenabhängig auf. Hierbei wandert die fluoreszenzmarkierte Probe durch eine polymergefüllte Kapillare und passiert ein Detektionsfenster, wobei die Farbstoffe durch ein Laserlicht angeregt ihrerseits ein Licht abstrahlen. Dieses wird von einer CCD-Kamera erfasst, welche die Fluoreszenzintensität in Daten umsetzt. Es werden die Intensitäten der Farbstoffe der Probe sowie die Intensität eines Längenstandards ermittelt. Bei der Analyse mit Hilfe der GeneScan-Software wird durch Interpolation die Fragmentlänge der Probe an Hand des Standards bestimmt.

3. 2. 5 Sequenzanalyse

Zur Ermittlung der genauen Basenpaarlängen wurde das PCR-Produkt, ebenfalls im ABI PRISM® 310, sequenziert. Dieses musste vor der Sequenzierung zur Entfernung störender Zusätze aus den vorausgegangenen Reaktionsschritten wie im Folgenden beschrieben aufbereitet werden. Zunächst wurde eine Qiagen-Reinigung (QIAquick® PCR-Purification Kit) durchgeführt. Hierzu wurde das PCR-Produkt in einem Qiagen-Röhrchen mit dem fünffachen Volumen PB-Puffer vermischt und 2 Minuten bei 15 000 U/min zentrifugiert. Anschließend erfolgte das Verwerfen des PB-Puffers, die Zugabe von 750 µl PE-Puffer, 2-minütiges Zentrifugieren bei 15 000 U/min sowie das Verwerfen des PE-Puffers. Das Röhrchen wurde zum Entfernen der Restflüssigkeit wieder 2 Minuten bei 15 000 U/min zentrifugiert und danach in ein neues Sammelgefäß gegeben und mit 40 µl Aqua bidest. aufgefüllt.

Im Anschluss an die Qiagen-Reinigung wurde eine neue PCR-Reaktion (Sequenzierreaktion) angesetzt. Bei dieser wurden 5 – 12,8 µl des gereinigten PCR-Produktes mit 3,2 µl eines unmarkierten Sequenzierprimers und 4 µl eines Reaktionsmixes (ABI PRISM® BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit) versetzt und mit Aqua bidest. auf ein Endvolumen von 20 µl gebracht. Die Reaktionsansätze wurden vorsichtig gevortext, 1 Minute bei 13 000 U/min zentrifugiert und in den

Thermocycler Biometra[®] gestellt, der mit folgendem Programm gestartet wurde: Zuerst 30 Sekunden lang Denaturierung der DNA bei 96° C, dann 25 Zyklen mit jeweils für 15 Sekunden DNA-Denaturierung bei 96° C, 15 Sekunden bei 50° C und 4 Minuten bei 60° C. Das so entstandene Sequenzierprodukt wurde vor dem Auftragen auf den ABI PRISM[®] 310 auch einer Reinigungsprozedur unterzogen. Zum Sequenzierprodukt wurden hierzu 2 µl 3 M Natriumacetat (pH-Wert: 4,6 – 5,0) und 50 µl absoluten Ethanols gegeben. Das Ganze wurde gevortext, für 10 Minuten ins Eisfach gestellt und für 25 Minuten bei 15 000 U/min und 4° C sedimentiert. Es folgte das vorsichtige Abheben des Ethanols und das Waschen des verbliebenen Präzipitats mit 250 µl 70%-igen Ethanols für 20 Minuten bei 15 000 U/min und 4° C. Nach Verwerfen des Ethanols wurde das Produkt in der Vakuumzentrifuge getrocknet, in 12 µl Formamid aufgenommen, gevortext und 2 Minuten bei 15 000 U/min zentrifugiert.

Die Proben wurden in Teströhrchen (Genetic Analyzer Tubes) gegeben und 2 Minuten lang bei 90° C denaturiert, bevor schließlich die Sequenzanalyse im oben genannten Gerät erfolgte.

3. 3 Statistische Tests

In statistischen Testverfahren wird an Hand zweier Stichproben untersucht, ob die ermittelten Ergebnisse durch eine zufallsbedingte Streuung der Messwerte zu erklären sind (Nullhypothese H_0) oder, ob ein tatsächlicher Effekt vorliegt (Alternativhypothese H_1).

Es wird kalkuliert, mit welcher Wahrscheinlichkeit sich das ermittelte Ergebnis zufällig eingestellt haben könnte, wenn H_0 tatsächlich zutrifft. Wird diese Wahrscheinlichkeit als gering eingestuft, nämlich kleiner als das vereinbarte Signifikanzniveau α , kann H_0 verworfen und das Ergebnis als signifikant angeführt werden. Das Signifikanzniveau α entspricht der Wahrscheinlichkeit für einen Fehler 1. Art, der dadurch charakterisiert ist, dass die Nullhypothese (H_0) zutrifft, aber aufgrund der Stichprobe verworfen wird. Das zufallsbedingte Ergebnis wird fälschlich als signifikant bezeichnet. Um Fehler dieser Art kontrollieren zu können, legt man das Signifikanzniveau vorab fest (in der Regel $\alpha = 0,05$).

Mit Hilfe statistischer Testverfahren wird aus den Beobachtungsdaten die jeweilige Testgröße (in der vorliegenden Arbeit: χ^2 -Test nach Pearson bzw. Exakter Test nach Fischer mit 95% Konfidenzintervall) sowie der dazugehörige p -Wert ermittelt.

Beim χ^2 -Test (Chi-Quadrat-Test) handelt es sich um ein spezielles Verfahren für den Vergleich von Häufigkeitsunterschieden zweier Merkmale. Den Ausgangspunkt bilden im einfachsten Fall zwei qualitative Merkmale (hier: Spaltträgergruppe und entsprechende Kontrolle) mit je zwei Ausprägungen (hier: jeweils untersuchtes Allel vorhanden oder nicht vorhanden). Die beobachteten Häufigkeiten für das Auftreten der vier Merkmalskombinationen in einer Stichprobe vom Umfang n werden tabellarisch in einer 2x2- oder Vierfeldertafel zusammengefasst. Abbildung 3. 1 zeigt exemplarisch den Vergleich der gesamten Spaltträgergruppe mit der gesamten Kontrollgruppe bezüglich der Häufigkeitsverteilung des Allels 171 bp.

			Allel 171bp		Gesamt
			nicht vorhanden	vorhanden	
Merkmal	keine Spalte	Anzahl	63	87	150
		% von Stichprobe	42,0%	58,0%	100,0%
	Spalte	Anzahl	61	69	130
		% von Stichprobe	46,9%	53,1%	100,0%
Gesamt	Anzahl		124	156	280
	% von Stichprobe		44,3%	55,7%	100,0%

Abb. 3. 1: Vierfeldertafel

Vergleich der gesamten Spaltträgergruppe mit der gesamten Kontrollgruppe bezüglich der Häufigkeitsverteilung des Allels 171 bp

Ist mindestens eine der vier erwarteten Häufigkeiten kleiner als 5, wird anstelle des Vierfeldertests der Exakte Test nach Fischer verwendet.

Der p -Wert bezeichnet die Wahrscheinlichkeit mit der sich die ermittelten Ergebnisse zufällig ergeben haben könnten. Er formuliert die zutreffende Irrtumswahrscheinlichkeit, wenn man die Nullhypothese H_0 ablehnt. Ist diese Wahrscheinlichkeit gering, d. h. kleiner als das vorab vereinbarte Signifikanzniveau α , wird H_0 verworfen und das Ergebnis als statistisch signifikant bezeichnet.

Um mögliche statistisch signifikante Häufigkeitsunterschiede in der Verteilung der in der vorliegenden Arbeit bestimmten Allele zu ermitteln, wurden für alle Vergleichsgruppen der Chi-Quadrat-Test (χ^2 -Test) nach Pearson bzw. der Exakte Test nach Fischer durchgeführt (Signifikanzniveau: $\alpha = 0,05$).

4. Ergebnisse

Die Sequenzanalyse ergab vier verschiedene Allele mit den Basenpaarlängen 171, 173, 175 und 177 (Abb. 4. 1 – 4. 4)

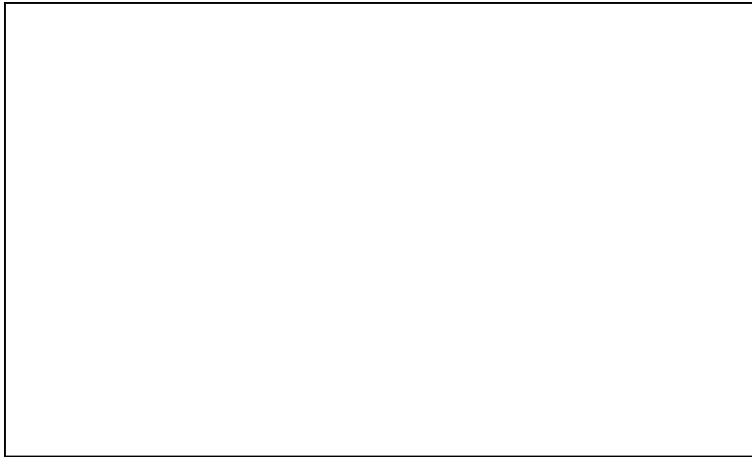


Abb. 4. 1: (CA)₉-Repeat des Allels 171 bp

Lokalisation des Repeats innerhalb des Allels 171 bp: Beginn bei Base 68,
Ende bei Base 85

(A = Adenosin, C = Cytosin, G = Guanotin, T = Thymin)

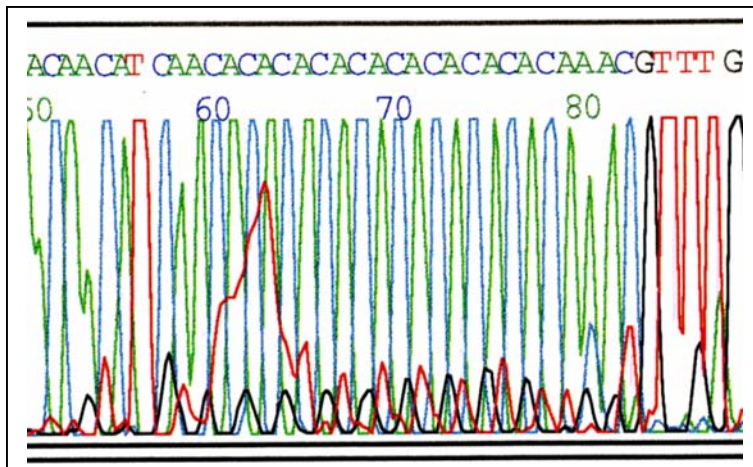


Abb. 4. 2: (CA)₁₀-Repeat des Allels 173 bp

Lokalisation des Repeats innerhalb des Allels 173 bp: Beginn bei Base 60,
Ende bei Base 80

(A = Adenosin, C = Cytosin, G = Guanotin, T = Thymin)

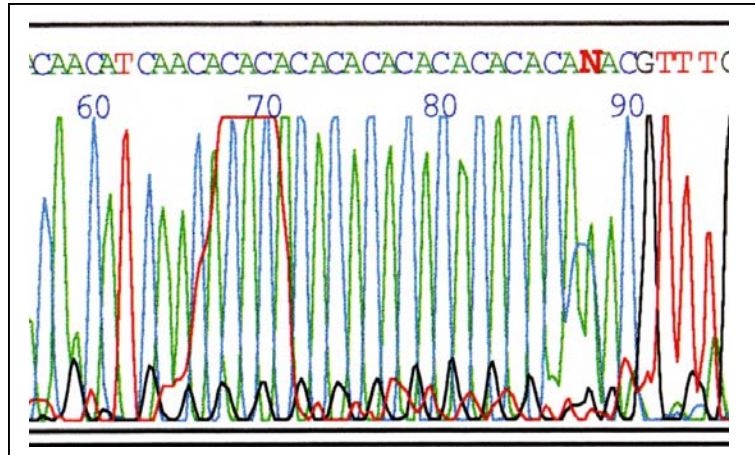


Abb. 4. 3: (CA)₁₁-Repeat des Allels 175 bp

Lokalisation des Repeats innerhalb des Allels 175 bp: Beginn bei Base 65,
Ende bei Base 87

(A = Adenosin, C = Cytosin, G = Guanodin, T = Thymin)

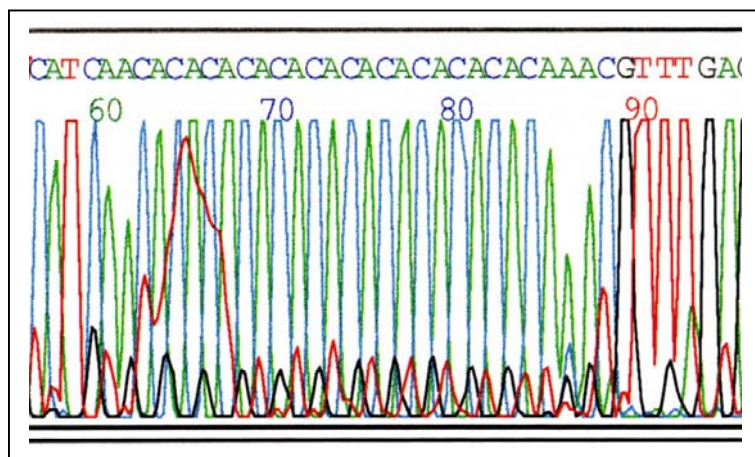


Abb. 4. 4: (CA)₁₂-Repeat des Allels 177 bp

Lokalisation des Repeats innerhalb des Allels 177 bp: Beginn bei Base 63,
Ende bei Base 85

(A = Adenosin, C = Cytosin, G = Guanodin, T = Thymin)

Zur Ermittlung von Unterschieden in der Allelhäufigkeitsverteilung zwischen Spaltträgern und Kontrollen wurde neben der Differenzierung der Geschlechter eine Unterteilung der Spaltträgergruppe in totale und partielle Spalte vorgenommen. Des Weiteren erfolgte eine Unterscheidung nach den Merkmalen simplexe (Sx) und multiplexe (Mx)

Familienanamnese, da Thesen existieren, die von zwei unterschiedlichen Genesen ausgehen (Lidral et al. 1998, Martin et al. 2000).

Bezugsgröße bei Betrachtung von Allelhäufigkeiten ist die Anzahl von Kopien eines Genortes, nicht etwa die Anzahl von Personen in einer Stichprobe. Daher wurde in den folgenden Tabellen nicht die Probandenanzahl N, sondern jeweils die Anzahl der Allele 2N angegeben.

Tabelle 4. 1:

Häufigkeitsverteilung der Allele bei Unterscheidung zwischen totalen und partiellen Spalten sowie Sx und Mx

Gruppe	Verteilung der Allele				Vergleichsgruppe	Chi-Quadrat-/ p-Wert				
	171 bp	173 bp	175 bp	177 bp		171 bp ⁽⁹⁾	173 bp	175 bp	177 bp	
<u>tot. S⁽¹⁾, Sx⁽⁶⁾</u> m ⁽⁴⁾ (2N ⁽⁶⁾ = 42)	20 (47,6)	1 (2,4)	15 (35,7)	6 (14,3)	K ⁽³⁾ (m) (w)	0,87/0,44	0,55/0,65	0,58/0,54	0,71/0,54	
w ⁽⁵⁾ (2N = 18)	10 (55,6)	3 (16,7)	1 (5,6)	4 (22,2)		K (w)	0,32/0,78	4,13/0,08	5,86/ 0,02	0,57/0,71
m + w (2N = 60)	30 (50,0)	4 (6,7)	16 (26,7)	10 (16,7)		K (m + w)	1,11/0,36	0,11/0,79	0,26/0,72	1,42/0,25
<u>part. S⁽²⁾, Sx</u> m (2N = 12)	6 (50,0)	2 (16,7)	3 (25,0)	1 (8,3)	K (m) (w)	0,18/0,76	2,12/0,19	0,08/1	0,01/1	
w (2N = 18)	11 (61,1)	0 (0,0)	7 (38,9)	0 (0,0)		K (w)	0,36/0,71	3,21/0,15	0,63/0,69	1,55/0,4
m + w (2N = 30)	17 (56,7)	2 (6,7)	10 (33,3)	1 (3,3)		K (m + w)	0,02/1	2,13/0,21	3,87/0,06	2,43/0,2
<u>alle S, Sx</u> m (2N = 54)	26 (48,1)	3 (5,6)	18 (33,3)	7 (13,0)	K (m) (w)	0,9/0,38	0,01/1	0,29/0,7	0,46/0,57	
w (2N = 36)	21 (58,3)	3 (8,3)	8 (22,2)	4 (11,1)		K (w)	0,9/0,39	0,27/0,68	1,3/0,34	0,07/1
m + w (2N = 90)	47 (52,2)	6 (6,7)	26 (28,9)	11 (12,2)		K (m + w)	0,01/1	0,17/0,75	0,34/0,61	0,03/1
<u>tot. S, Mx⁽⁷⁾</u> m (2N = 12)	9 (75,0)	1 (8,3)	2 (16,7)	0 (0,0)	K (m) (w)	1,46/0,35	0,18/1	0,79/0,50	1,2/0,59	
w (2N = 6)	2 (33,3)	0 (0,0)	3 (50,0)	1 (16,7)		K (w)	2,92/0,14	0,53/1	0,79/0,27	2,12/0,33
m + w (2N = 18)	11 (61,1)	1 (5,6)	5 (27,8)	1 (5,6)		K (m + w)	1,55/0,39	0,72/0,63	3,65/0,09	0,1/1
<u>part. S, Mx</u> m (2N = 8)	3 (37,5)	0 (0,0)	2 (25,0)	3 (37,5)	K (m) (w)	1,06/0,46	0,44/1	0,06/1	5,52/0,05	
w (2N = 14)	8 (57,1)	14 (100,0)	4 (28,6)	2 (14,3)		K (w)	0,79/0,66	-	0,03/1	1,56/0,31
m + w (2N = 22)	11 (50,0)	0 (0,0)	6 (27,3)	5 (22,7)		K (m + w)	0,03/1	1,67/0,35	0,92/0,46	0,05/1
						0,50/0,5	1,89/0,23	0,16/0,79	2,60/0,15	

Fortsetzung Tabelle 4. 1:

Häufigkeitsverteilung der Allele bei Unterscheidung zwischen totalen und partiellen Spalten sowie Sx und Mx

Gruppe	Verteilung der Allele				Vergleichsgruppe	Chi-Quadrat-/ p-Wert			
	171 bp	173 bp	175 bp	177 bp		171 bp ⁽⁹⁾	173 bp	175 bp	177 bp
alle S, Mx									
m (2N = 20)	12 (60,0)	1 (5,0)	4 (20,0)	3 (15,0)	K (m) (w)	0,08/0,81	0/1	0,64/0,58	0,57/0,68
w (2N = 20)	10 (50,0)	0 (0,0)	7 (35,0)	3 (15,0)		K (w)	0,4/0,75	1,03/1	1,13/0,48
m + w (2N = 40)	22 (55,0)	1 (2,5)	11 (27,5)	6 (15,0)	K (m + w)	0,12/0,86	1,5/0,31	0,3/0,68	0,58/0,58
tot. S, Sx + Mx									
m (2N = 54)	29 (53,7)	2 (3,7)	17 (31,5)	6 (11,1)	K (m) (w)	0,11/0,86	0,17/1	0,1/0,85	0,13/0,77
w (2N = 24)	12 (50,0)	3 (12,5)	4 (16,7)	5 (20,8)		K (w)	0,09/0,81	2,14/0,32	1,85/0,27
m + w (2N = 78)	41 (52,6)	5 (6,4)	21 (26,9)	11 (14,1)	K (m + w)	0,66/0,48	0,05/1	0,01/1	1,11/0,32
part. S, Sx + Mx									
m (2N = 20)	9 (45,0)	2 (10,0)	5 (25,0)	4 (20,0)	K (m) (w)	0,86/0,45	0,61/0,6	0,12/0,79	1,82/0,23
w (2N = 32)	19 (59,4)	0 (0,0)	11 (34,4)	2 (6,3)		K (w)	1,02/0,4	3,33/0,14	0,51/0,55
m + w (2N = 52)	28 (53,8)	2 (3,8)	16 (30,8)	6 (11,5)	K (m + w)	0/1	3,74/0,1	3,60/0,08	0,84/0,5
alle S, Sx + Mx									
m (2N = 74)	38 (51,4)	4 (5,4)	22 (29,7)	10 (13,5)	K (m) (w)	0,27/0,63	1,03/0,37	1,13/0,35	0,03/1
w (2N = 56)	31 (55,4)	3 (5,4)	15 (26,8)	7 (12,5)		K (w)	0,41/0,62	0,002/1	0,01/1
m + w (2N = 130)	69 (53,1)	7 (5,4)	37 (28,5)	17 (13,1)	K (m + w)	0,21/0,72	0/1	0,14/0,85	0,03/1
						0,22/0,72	1,22/0,35	1,6/0,28	0,003/1
						0,68/0,47	0,75/0,48	0,96/0,34	0,39/0,58

(1) tot. S = totale Spalte, (2) part. S = partielle Spalte, (3) K = Kontrolle, (4) m = männlich, (5) w = weiblich, (6) Sx = simplexe Familienanamnese, (7) Mx = multiplexe Familienanamnese, (8) 2 N = Anzahl der Allele, (9) bp = Basenpaare, (10): **fett gedruckt** = ermittelte Anzahl des jeweiligen Allels, (in Klammern) = prozentualer Anteil innerhalb der untersuchten Gruppe

Da in der Literatur im Hinblick auf die unterschiedliche embryologische Entstehungsweise zwischen den Lippen-, Kieferspalten mit oder ohne Spalte des Gaumens (LK(+/-G)) und den isolierten Gaumenspalten (G) unterschieden wird, wurde in einer zweiten Einteilung in derselben Spaltträgergruppe zwischen simplerer und multiplexer Familienanamnese sowie LK(+/-G)-Spalten und G-Spalten unterschieden. Auch hier wurde zusätzlich zwischen den Geschlechtern differenziert (Tabelle 4. 2).

Tabelle 4. 2:

Häufigkeitsverteilung der Allele bei Unterscheidung zwischen LK(+/-G)- und G-Spalten sowie Sx und Mx

Gruppe	Verteilung der Allele				Vergleichsgruppe	Chi-Quadrat-/ p-Wert			
	171 bp	173 bp	175 bp	177 bp		171 bp ⁽⁹⁾	173 bp	175 bp	177 bp
LK(+/-G)⁽¹⁾, Sx⁽⁶⁾									
m ⁽⁴⁾ (2N ⁽⁸⁾ = 52)	25	3	17	7	K ⁽³⁾ (m)	0,9/0,37	0,02/1	0,2/0,7	0,57/0,57
	(48,1)	(5,8)	(32,7)	(13,5)		(w)	0,2/0,82	0,39/0,67	0,56/0,48
w ⁽⁵⁾ (2N = 32)	17	3	8	4	K (w)	0,37/0,67	0,05/1	0,78/0,43	0,002/1
	(53,1)	(9,4,0)	(25,0)	(12,5)					
m + w (2N = 84)	42	6	25	11	K (m + w)	1,39/0,27	0,06/1	1,17/0,35	0,31/0,67
	(50,0)	(7,1)	(29,8)	(13,1)					
G⁽²⁾, Sx									
m (2N = 2)	1	0	1	0	K (m)	0,03/1	0,11/1	0,42/1	0,2/1
	(50,0)	(0,0)	(50,0)	(0,0)		(w)	2,4/0,33	-	2,4/0,33
w (2N = 4)	4	0	0	0	K (w)	2,64/0,16	0,48/1	0,84/0,6	0,55/1
	(100,0)	(0,0)	(0,0)	(0,0)					
m + w (2N = 6)	5	0	1	0	K (m + w)	1,53/0,4	0,52/1	0,14/1	0,71/0,63
	(83,3)	(0,0)	(16,7)	(0,0)					
LK(+/-G), Mx⁽⁷⁾									
m (2N = 20)	12	1	4	3	K (m)	0,08/0,81	0,002/1	0,64/0,58	0,57/0,68
	(60,0)	(5,0)	(20,0)	(15,0)		(w)	1,01/0,47	0,62/1	1,74/0,24
w (2N = 12)	5	0	5	2	K (w)	1,33/0,35	1,43/0,36	3,62/0,12	0,19/1
	(41,7)	(0,0)	(41,7)	(16,7)					
m + w (2N = 32)	17	1	9	5	K (m + w)	0,26/0,7	0,95/0,47	0,33/0,65	0,64/0,54
	(53,1)	(3,1)	(28,1)	(15,6)					
G, Mx									
m (2N = 0)	0	0	0	0	K (m)	-	-	-	-
	(0,0)	(0,0)	(0,0)	(0,0)		(w)	-	-	-
w (2N = 8)	5	0	2	1	K (w)	0,03/1	0,96/0,6	0,27/0,63	0,001/1
	(62,5)	(0,0)	(25,0)	(12,5)					
m + w (2N = 8)	5	0	2	1	K (m + w)	0,06/1	0,69/0,64	0,01/1	0,03/1
	(62,5)	(0,0)	(25,0)	(12,5)					
LK(+/-G), Sx + Mx									
m (2N = 72)	37	4	21	10	K (m)	0,4/0,62	0,006/1	0,001/1	0,8/0,44
	(51,4)	(5,6)	(29,2)	(13,9)		(w)	0,02/1	0,08/1	0,002/1
w (2N = 44)	22	3	13	6	K (w)	1/0,34	0,52/0,53	2,30/0,17	0,05/1
	(50,0)	(6,8)	(29,5)	(13,6)					
m + w (2N = 116)	59	7	34	16	K (m + w)	1,35/0,27	0,38/0,27	1,22/0,32	0,6/0,45
	(50,9)	(6,0)	(29,3)	(13,8)					
G, Sx + Mx									
m (2N = 2)	1	0	1	0	K (m)	0,03/1	0,11/1	0,42/1	0,2/1
	(50,0)	(0,0)	(50,0)	(0,0)		(w)			
w (2N = 12)	9	0	2	1	K (w)	1,06/0,36	1,43/0,36	0,01/1	0,15/1
	(75,0)	(0,0)	(16,7)	(8,3)					
m + w (2N = 14)	10	0	3	1	K (m + w)	0,96/0,4	1,21/0,4	0,03/1	0,17/1
	(71,4)	(0,0)	(21,4)	(7,1)					

(1) LK(+/-G) = Lippenkieferspalte mit/ohne Gaumenspalte, (2) G = isolierte Gaumenspalte, (3) K = Kontrolle, (4) m = männlich, (5) w = weiblich, (6) Sx = simplexe Familienanamnese, (7) Mx = multiplexe Familienanamnese, (8) 2 N = Anzahl der Allele, (9) bp = Basenpaare, (10): **fett gedruckt** = ermittelte Anzahl des jeweiligen Allels, (in Klammern) = prozentualer Anteil innerhalb der untersuchten Gruppe

In Tabelle 4. 3 ist die Häufigkeitsverteilung der Allele getrennt nach Geschlecht für die Kontrollgruppe dargestellt.

Tabelle 4. 3:

Häufigkeitsverteilung der Allele bei der Kontrollgruppe

Gruppe	Verteilung der Allele				Vergleichsgruppe	Chi-Quadrat-/ p-Wert			
	171 bp	173 bp	175 bp	177 bp		171 bp ⁽⁵⁾	173 bp	175 bp	177 bp
Kontrolle m ⁽²⁾ (2N ⁽⁴⁾ = 76)	43 (56,6)	4 (5,3)	22 (28,9)	7 (9,2)	K ⁽¹⁾ (w)	0,13/0,42	1,57/0,24	2,71/0,12	0,34/0,61
w ⁽³⁾ (2N = 74)	44 (59,9)	8 (10,8)	13 (17,6)	9 (12,2)	-	-	-	-	-
m + w (2N = 150)	87 (58,0)	12 (8,0)	35 (23,3)	16 (10,7)	-	-	-	-	-

(1) K = Kontrolle, (2) m = männlich, (3) w = weiblich, (4) 2 N = Anzahl der Allele, (5) bp = Basenpaare, (6): **fett gedruckt** = ermittelte Anzahl des jeweiligen Allels, (in Klammern) = prozentualer Anteil innerhalb der untersuchten Gruppe

Auf die o. g. Einteilungen basierend fand bezüglich der Allelhäufigkeiten jeweils der Vergleich aller Spalträger mit allen männlichen bzw. weiblichen Kontrollen statt. Um einen Unterschied der Allelhäufigkeit zwischen den beiden Geschlechtern innerhalb der Spalträger- bzw. Kontrollgruppe zu ermitteln, wurde zudem ein Vergleich zwischen den männlichen und weiblichen Probanden der jeweiligen Gruppe angestellt.

Bei Untersuchung der gesamten Spalträgergruppe ist bezüglich der Häufigkeitsverteilung der vier Allele festzustellen, dass das Allel 171 bp mit 53,1 % am häufigsten vorkommt. Allel 175 bp ist mit 28,5 % vertreten. Die Allele 177 bp und 173 bp lassen sich bei 13,1 % bzw. 5,4 % der untersuchten Spalträger identifizieren. Bei der Kontrollgruppe ergibt sich für die Allele 171 bp, 175 bp, 177 bp und 173 bp eine prozentuale Verteilung von 58,0 %, 23,3 %, 10,7 % bzw. 8,0 %. Ein signifikanter Unterschied zwischen der gesamten Spalträgergruppe und der gesamten Kontrollgruppe in der Häufigkeitsverteilung der jeweiligen Allele besteht somit nicht (p = 0,47; 0,34; 0,58 bzw. 0,48). Auch zwischen den weiblichen und männlichen Spalträgern liegt bei p-Werten zwischen 0,72 und 1,0 keine signifikante Abweichung vor (Tabelle 4. 1. letzte Zelle und Tabelle 4. 3).

Betrachtet man die Untergruppen lässt sich ebenfalls weder bei den Einteilungen nach totalen und partiellen Spalten (Tabelle 4. 1) noch bei den Einteilungen nach LK(+/-G)- und G-Spalten (Tabelle 4. 2) ein signifikanter Unterschied der Allelhäufigkeitsverteilungen zwischen Spaltträgern und den jeweiligen Kontrollen beobachten.

Ein signifikanter Unterschied konnte allein bei den totalen Spalten mit simplexer Familienanamnese zwischen den männlichen und weiblichen Spaltträgern in der Häufigkeitsverteilung des Allels 175 bp ein festgestellt werden ($p = 0,02$).

5. Diskussion

5. 1 Assoziationsstudien

In der vorliegenden Fall-Kontroll-Studie wurde für eine deutsche Stichprobe ein Vergleich der Häufigkeitsverteilung der Allele des MSX1-Ca_n-Dinucleotid-Repeats zwischen Spaltträgern und nicht verwandten Kontrollpersonen angestellt. Treten die Markerallele signifikant häufiger bei Patienten mit Spalte auf, folgert man, dass sie mit der Krankheit assoziiert sind (*Blanco et al. 1998, 2001*).

5. 1. 1 Fall-Kontroll-Studie versus familienbasierte Assoziationsstudie

Bei der Untersuchung von Allelhäufigkeiten besteht eine mögliche Fehlerquelle darin, dass bei Patienten und Kontrollen, die unterschiedlichen Populationen – mit unterschiedlichen Frequenzen der Markerallele – entstammen, falsch-positive Assoziationen resultieren.

Zur Vermeidung solcher Populationseffekte werden häufig familienbasierte Assoziationsstudien durchgeführt. Unter diesem Begriff verbirgt sich eine Reihe unterschiedlicher Analysemethoden, denen gemeinsam ist, dass die untersuchte Kontrollgruppe nicht aus unverwandten Individuen besteht, sondern in den von den Eltern an betroffene Kinder nicht weitergegebenen Allelen. Hierdurch soll sichergestellt werden, dass Patienten und Kontrollen genetisch einheitlichen Populationen entstammen (Schaid und Sommer 1994).

Trotz des angeführten Vorteils der familienbasierten Assoziationsstudie gegenüber der klassischen Fall-Kontroll-Studie in Hinsicht auf mögliche Populationseffekte, fiel der Entscheid in der vorliegenden Arbeit zu Gunsten der Fall-Kontroll-Studie. Der Grund hierfür war, dass die für eine Assoziationsanalyse mit elterlichen Kontrollen notwendigen Familientrios (Vater, Mutter und betroffenes Kind) während des Zeitraums unserer Probensammlung nur in kleiner Zahl greifbar waren. Ursächlich hierfür war meistens,

dass aufgrund einer vorliegenden Scheidungs- bzw. Trennungssituation der Eltern oder unbekannter Vaterschaft nur ein Elternteil zur Verfügung stand. In anderen Fällen handelte es sich bei den Spaltträgern um Adoptiv- bzw. Pflegekinder oder um erwachsene Patienten, die ohne Eltern in der Spaltträgersprechstunde bzw. zur stationären Aufnahme vorstellig wurden.

Zudem ist auch bei einer familienbasierten Assoziationsstudie eine biologische Familienschaft ohne entsprechende Tests (z. B. Vaterschaftstest) nicht gesichert.

Um einen Populationseffekt möglichst gering zu halten, wurden nur Probanden in die Stichprobe aufgenommen, die laut Anamnese aus Thüringen, Sachsen, Bayern und Hessen stammten.

5. 2 MSX 1 als Kandidatengen

MSX 1 wird als Kandidatengen in Betracht gezogen, da in Modellorganismen aufgezeigt werden konnte, dass dieses Gen bei der Gesichts- und Kieferentwicklung eine entscheidende Rolle spielt. So berichtete erstmalig *Mackenzie 1991* über ein orts- und zeitspezifisches Expressionsmuster des MSX 1-Gens bei der Maus während der embryonalen Entwicklung des Gesichtsschädels. In neueren Studien wurde festgestellt, dass transgene Mäuse mit einem MSX 1-Nullallel neben anderen Fehlbildungen eine Spalte des sekundären Gaumens aufwiesen, die mit der Gaumenspalte beim Menschen vergleichbar ist (*Satokata und Maas 1994, Houzelstein et al. 1997, Thomas et al. 1998, Peters et al. 1998 Zhang et al. 2001, 2003*). Diese Ergebnisse und die Tatsache, dass ein hoher Grad an Homologien zwischen den kodierenden Sequenzen des humanen MSX 1 und des MSX 1 bei der Maus sowie der jeweiligen Genprodukte existiert (*Hewitt et al., Padanilam et al. 1992*) bilden somit eine fundierte Basis für die Bestimmung von MSX 1 zum Kandidatengen bei der Erforschung der kausalen Genese der Spalten beim Menschen.

5. 3 Anzahl und Basenpaarlänge der ermittelten Allele

Im Rahmen einer Arbeit zur Charakterisierung des humanen MSX1-Gens, gelang die Identifizierung eines CA_n-Dinucleotid-Repeats in einem nichtkodierenden DNA-Abschnitt (*Padanilam et al. 1992*). Zudem wurden Primer erstellt, die diesen Mikrosatelliten flankieren und damit die Amplifikation der entsprechenden DNA-Abschnitte ermöglichen. Hierbei konnten vier verschiedene Allele nachgewiesen werden, die sich jeweils um zwei Basenpaare (bp) unterscheiden: 169, 171, 173 und 175 bp.

Auf diese Ergebnisse basierend wurden nachfolgend im Rahmen von Koppelungs- und Assoziationsstudien bei Spaltträgern die Amplifikation, Fragmentlängenbestimmung sowie Sequenzierung des Kandidatengens MSX 1 von verschiedenen Arbeitsgruppen durchgeführt. Bei den meisten der veröffentlichten Studien wurden US-amerikanische Populationen untersucht (*Stein et al. 1995, Hwang et al. 1998, Lidral et al. 1998, Romitti et al. 1999, Beaty et al. 2001, 2002, Fallin et al. 2003*). Ebenfalls häufig erforscht sind lateinamerikanische Bevölkerungsgruppen (*Vieira et al. 2003, Blanco et al. 2004*). Vielen anderen Arbeiten liegen Stichproben asiatischer (*Lidral et al. 1997, Marazita et al. 2002, Suzuki et al. 2004*) oder skandinavischer Herkunft (*Mitchell et al. 2001, Jugessur 2003*) zu Grunde. Im Gegensatz hierzu wurden Stichproben anderer Abstammung nur selten untersucht (Tabelle 5. 1).

Die Zielsetzung einiger Assoziationsstudien war die Bestimmung der Häufigkeitsverteilung der vier von *Padanilam et al. 1992* beschriebenen Allele des CA-Dinucleotid-Repeats bei Spaltträgern im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen (*Blanco et al. 1998, 2001, 2004*). Der Leitgedanke hierbei war, dass ein signifikanter Unterschied in der Häufigkeitsverteilung eines Allels zwischen Spaltträgern und Kontrollpersonen die Schlussfolgerung zuließe, dass das entsprechende Allel bzw. Mutationen in diesem Allel für eine Spalte prädisponieren.

Basierend auf den Untersuchungen von *Blanco et al.*, die in zwei Studien (1998 + 2001) zur Verteilung der o. g. Allele über signifikante Unterschiede zwischen bestimmten Spaltträgergruppen und den entsprechenden Kontrollen berichteten, wurden in der vorliegenden Arbeit diese Allele für eine Spaltträgerstichprobe aus dem Krankengut der

Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Friedrich Schiller-Universität Jena bestimmt sowie eine Untersuchung ihrer Häufigkeitsverteilung durchgeführt.

Wie bei *Padanilam et al. (1992)* ergab unsere Analyse ebenfalls vier verschiedene Allele des CA-Dinucleotid-Repeats. Anstatt der beschriebenen Basenpaarlängen von 169, 171, 173 und 175 bp, resultierten aus der Fragmentlängenbestimmung jedoch Basenpaarlängen von 171, 173, 175 und 177 bp. In den anderen - im Rahmen dieser Arbeit recherchierten - Studien, in denen eine Fragmentlängenanalyse durchgeführt wurde, stimmen dagegen die ermittelten Basenpaarlängen mit denen von *Padanilam et al. (1992)* überein (*Blanco et al. 1998, 2001, 2004; Vieira et al. 2003; Suazo et al. 2004; Suzuki et al. 2004*). Bei der weiteren Recherche konnte eine Arbeit gefunden werden, bei der die Fragmentlängenbestimmung ebenfalls von *Padanilam et al. (1992)* abweichende Resultate ergab (*Marazita et al. 2002*). Hier wird über Basenpaarlängen von 167, 171, 175 und 177 bp berichtet.

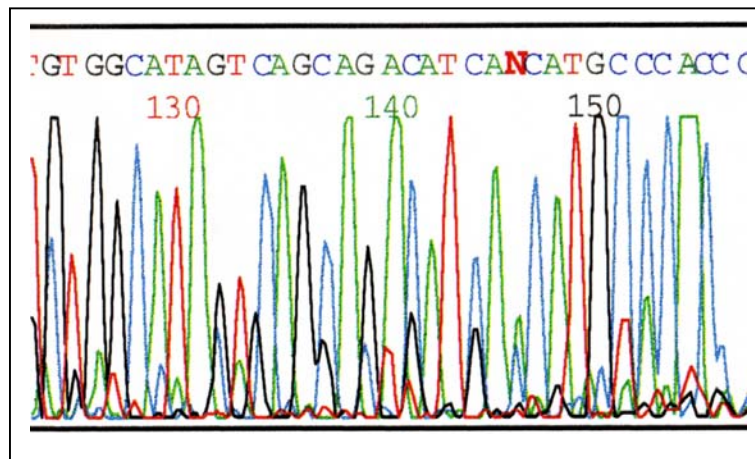
Als Ursache für diese unterschiedlichen Ergebnisse sind zunächst systematische Fehler wie Eich- und/oder Funktionsfehler der Analysegeräte auszuschließen. Diesbezüglich ist anzumerken, dass unsere Untersuchungen im Genlabor des Rechtsmedizinischen Institutes der Friedrich Schiller-Universität Jena durchgeführt wurden. Aufgrund der forensischen Bedeutung der hier ermittelten Ergebnisse muss permanent gewährleistet sein, dass diese nicht durch fehlerhafte Geräte verfälscht werden. Daher finden regelmäßig Kontrollen und wenn erforderlich neue Eichungen der Geräte statt.

Ebenfalls zu berücksichtigen sind systematische Fehler, die durch eventuelle Abweichungen in den Protokollen bei der Amplifikation und/oder Fragmentlängenanalyse entstehen. Wie die zuvor genannten Arbeitsgruppen führten wir sowohl die Amplifikation als auch die Fragmentlängenanalyse nach dem Protokoll von *Padanilam et al. (1992)* durch. Über einen Zeitraum von ungefähr 11 Monaten wurden in unterschiedlichen Serien die Proben analysiert, wobei sich immer die gleichen Basenpaarlängen von 171, 173, 175 und 177 bp ergaben. Auch bei wiederholter Untersuchung der Proben mit modifizierten Protokollen wurden diese Fragmentlängen bestimmt.

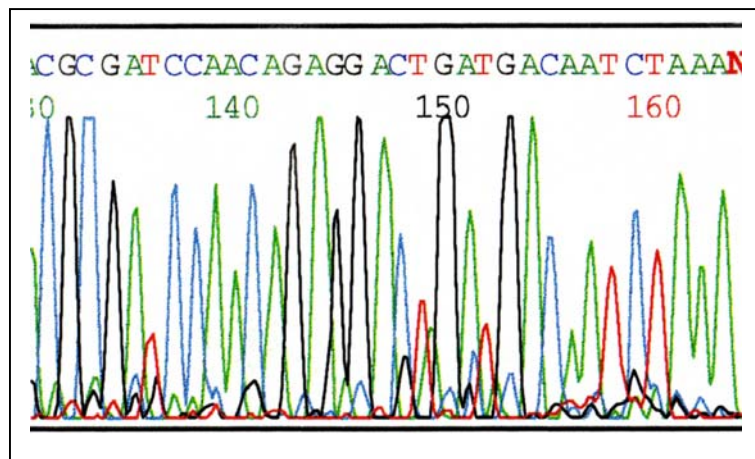
Des Weiteren sind fehlerhafte Primer als Fehlerquelle in Betracht zu ziehen. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma Quiagen (Köln,

Deutschland) hergestellt und entsprachen den von *Padanilam et al. (1992)* beschriebenen Primern (vorwärts 5'-GGGCATGTTGATGTCTGCTGAC-3' und rückwärts 5'-TTAGATTGTCATCAGTCCTC-3'). Fehler in der Basenabfolge der verwendeten Primer konnten indirekt in der von uns durchgeführten Sequenzanalyse der zu den Primern komplementären DNA-Abschnitten ausgeschlossen werden (Abb 5. 1).

Ein systematischer Fehler scheint somit unwahrscheinlich, lässt sich jedoch nicht sicher ausschließen.



A)



B)

Abb. 5. 1: komplementäre DNA-Abschnitte zu den Primern

A) Lokalisation des komplementären DNA-Abschnitts zum Vorwärts-Primer (5'-GGGCATGTTGATGTCTGCTGAC-3'): Beginn bei Base 153, Ende bei Base 132)

B) Lokalisation des komplementären DNA-Abschnitts zum Rückwärts-Primer (5'-TTAGATTGTCATCAGTCCTC-3'): Beginn bei Base 162, Ende bei Base 143)

(A = Adenosin, C = Cytosin, G = Guanosin, T = Thymin)

Ebenso kann eine tatsächlich existierende Abweichung der Basenpaarlängen nicht ausgeschlossen werden. Eine mögliche Ursache für das Vorkommen unterschiedlicher Fragmentlängen in den verschiedenen Studien könnte zum Beispiel in der Untersuchung verschiedener Populationen liegen. Padanilam et al. (1992) analysierten die DNA von Stichproben US-amerikanischer Herkunft, die Probanden von *Blanco et al.* (1998, 2001, 2004) und *Suazo et al.* (2004) stammten aus Chile, während das Krankengut von *Marazita et al.* (2002) und *Suzuki et al.* (2004) chinesischer bzw. vietnamesischer Herkunft war. In der vorliegenden Arbeit wiederum wurden deutsche Spaltträger und Kontrollpersonen untersucht.

5. 4 Häufigkeitsverteilung der ermittelten Allele

Blanco et al. berichteten in zwei Ihrer Publikationen insgesamt bei mehreren der ermittelten Allele über signifikante Unterschiede bezüglich der Häufigkeitsverteilung zwischen bestimmten Spaltträgergruppen bzw. deren gesunden Verwandten und den entsprechenden Kontrollen. In einer 1998 durchgeführten Analyse wurden 73 Patienten mit einer nicht-syndromalen LKGS-Spalte, 127 Verwandte ohne Spalte und 77 nichtverwandte Kontrollpersonen untersucht. Beim Vergleich der männlichen Spaltträger aus multiplexen Familien sowie deren männlichen gesunden Verwandten mit den männlichen unverwandten Kontrollen wurden von den vier ermittelten Allelen (169, 171, 173 und 175 bp) für die Allele 169 bp und 173 bp signifikante Abweichungen in der Häufigkeitsverteilung beobachtet. Für die Allele 169 bp und 175 bp wurde ein signifikanter Unterschied der Häufigkeitsverteilung zwischen den weiblichen gesunden Verwandten und den weiblichen nichtverwandten Kontrollen festgestellt.

In einer 2001 veröffentlichten Studie untersuchten Blanco et al. 73 Patienten mit einer nicht-syndromassozierten LKGS-Spalte und 87 gesunde nichtverwandte Kontrollpersonen. Hier zeigten sich signifikante Unterschiede in der Verteilung des Allels 173 bp zwischen den Spaltträgern mit multiplexer Familienanamnese und Kontrollen. Diese Abweichung wurde besonders deutlich bei der Gegenüberstellung der männlichen Spaltpatienten mit multiplexer Familienanamnese und den männlichen Kontrollen.

In anderen von *Blanco et al. (1998, 2004)* durchgeführten Fall-Kontroll-Studien konnte dagegen zwischen Spaltträgern und Kontrollpersonen kein signifikanter Unterschied in der Allelfrequenz nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden 63 nicht miteinander verwandte Spaltträger (m = 36, w = 27) und 75 Kontrollpersonen (m = 38, w = 37) untersucht. Für unsere Stichprobe ließ sich im Gegensatz zu *Blanco et al. (1998, 2001)* bezüglich der Häufigkeitsverteilung weder für das Allel 173 bp noch für das Allel 175 bp ein signifikanter Unterschied zwischen den jeweils untersuchten Spaltträgergruppen und den entsprechenden Kontrollen feststellen. Ebenso verhielt es sich bei den anderen beiden von uns bestimmten Allelen 171 bp und 177 bp.

Für das Allel 175 bp konnte lediglich bei Betrachtung der totalen Spalten mit simplerer Familienanamnese zwischen den männlichen (2N = 42) und weiblichen (2N = 18) Spaltträgern dieser Untergruppe in der Häufigkeitsverteilung ein signifikanter Unterschied ermittelt werden ($p = 0.02$). Während beim männlichen Geschlecht dieser Untergruppe das Allel 175 bp 15 mal (35, 7 %) vertreten war, ließ es sich beim weiblichen Geschlecht nur 1 mal (5, 6 %) nachweisen. Da alle Vergleiche der Spaltträgergruppen und Kontrollen jedoch keine signifikanten Ergebnisse liefern, ist dieses Ergebnis im Rahmen dieser Arbeit nur von geringer Bedeutung.

Da das von *Padanilam et al. (1992)* beschriebene Allel 169 bp in der vorliegenden Arbeit nicht ermittelt wurde, kann für dieses Markerallel keine Ergebnisdiskussion erfolgen.

Das von uns ermittelte Allel 177 bp wurde auch von *Marazita et al. (2002)* bei einer chinesischen Stichprobe bestimmt. Im Gegensatz zu unserer Studie führten *Marazita et al.* jedoch keine Fall-Kontroll-Studie, sondern eine Kopplungs- sowie eine familienbasierte Assoziationsstudie durch. Daher lassen sich die Ergebnisse dieser beiden Arbeiten nicht miteinander vergleichen. Es sei aber angemerkt, dass *Marazita et al.* für das Allel 177 bp weder eine Kopplung noch eine Assoziation nachweisen konnten.

Derartig divergierende Ergebnisse liegen auch für andere Studiendesigns vor, in denen ein Zusammenhang zwischen nicht-syndromassoziierten LKGS-Spalten und MSX 1 untersucht wurde (Tabelle 5. 1).

Tabelle 5. 1:**Kandidatengenstudien zu MSX 1 im Zeitraum zwischen 1995 und 2006**

<u>Lokalisation</u>	<u>Autor</u>	<u>Jahr</u>	<u>Population</u>	<u>Studiendesign</u>			
				<u>Kopplung</u>	<u>Fall-Kontroll</u>	<u>Familientrios</u>	<u>Mutation</u>
4p16.1 - 16.3	Stein et al.	1995	USA, England	(-)			
	Lidral et al.	1997	Philippinen		(-)		
	Blanco et al.	1998	Chile		(-)		
	Blanco et al.	1998	Chile		(+)		
	Hwang et al.	1998	USA		(-)		
	Lidral et al.	1998	USA	(+)			(+)
	Romitti et al.	1999	USA		(+)		
	Beaty et al.	2001	USA		(+)		
	Blanco et al.	2001	Chile		(+)		
	Mitchell et al.	2001	Dänemark		(-)		
	Beaty et al.	2002	USA	(+)		(+)	
	Hecht et al.	2002	diverse		(-)		
	Marazita et al.	2002	China	(-)		(-)	
	Scapoli et al.	2002	Italien	(-)		(-)	
	Fallin et al.	2003	USA			(+)	
	Jezewski et al.	2003	diverse				(+)
	Jugessur et al.	2003	Norwegen			(+)	
	Koilinen et al.	2003	Finnland	(+)		(+)	
	Vieira et al.	2003	Lateinamerika			(+)	
	Blanco et al.	2004	Chile		(-)		
	Field et al.	2004	Indien	(-)		(-)	
	Suazo et al.	2004	Chile		(+)		
	Suzuki et al.	2004	Vietnam			(+)	(+)
	Vieira et al.	2004	Chile				(+)
	Vieira et al.	2005	USA, Philippinen				(+)
	Lace et al.	2006	Lettland				(+)
	Modesto et al.	2006	USA				(+)
	Tongkopetch	2006	Thailand				(+)

(+) = signifikante Ergebnisse

(-) = keine signifikanten Ergebnisse

5. 4. 1 Mögliche Ursachen für die unterschiedlichen Ergebnisse verschiedener Kopplungs- und Assoziationsstudien

Bei der Diskussion der möglichen Ursachen für die unterschiedlichen Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen – seien dies wie im Falle der vorliegenden Arbeit Analysen bezüglich der Allelhäufigkeitsverteilung oder eben Arbeiten, die auf ein anderes Studiendesign basieren – werden in erster Linie die unterschiedlichen zu Grunde liegenden Populationen (*Marazita et al. 2002, Blanco et al. 2004, Modesto et al. 2006 u. a.*) sowie zu kleine Stichprobenumfänge (*Koilinen et al. 2006 u. a.*) angeführt. Daher ist man bemüht, insbesondere Studien, in denen für bestimmte Gene und Populationen signifikante Ergebnisse erzielt wurden, anhand anders stämmiger Populationen, für die derartige Analysen noch nicht durchgeführt wurden, zu reproduzieren. Dabei werden auch immer größere Stichproben herangezogen. Trotzdem liegen bisher selbst innerhalb gleichstämmiger Stichproben keine einheitlichen signifikanten Ergebnisse bezüglich Allelhäufigkeitsverteilungen und Mutationen vor. Insbesondere in Anbetracht der Tatsache, dass auch in Studien mit panethnischen Populationen und sehr großen Stichproben keine bahnbrechenden Ergebnisse erzielt werden konnten (*Jezewski et al. 2003 mit N = 917, Vieira et al. 2005 mit N = 1098*) sind weitere mögliche Ursachen für die unterschiedlichen Ergebnisse zu beleuchten. So ist zu überlegen, ob den Studienansätzen zur Klärung der genetischen Ursachen nicht-syndromassoziierter Spalten beim Menschen wirklich eine fundierte Basis zugrunde liegt.

Zum Beispiel werden zur Kandidatengenauswahl Tierversuche an transgenen Mäusen herangezogen, wobei alle zitierten Tierversuchen (*Satokata und Maas 1994, Houzelstein et al. 1997, Thomas et al. 1998, Peters et al. 1998, Zhang et al. 2002, 2003*) Mäuse aufwiesen, die neben einer Spalte weitere Anomalien und somit syndromale Spalten zeigten. Solche Tiermodelle als Basis für Studien an nichtsyndrom-assozierten Spalten beim Menschen zu verwenden, muss daher kritisch begutachtet werden.

Ferner ist zu hinterfragen, ob die Untersuchung einzelner Gene ausreichend ist. Vor dem Hintergrund von Studien an Mäusen, in denen verschiedene Umwelt-Gen- bzw. Gen-Gen-Interaktionen (*Thomas et al. 1998, Peters et al. 1998, Zhang et al. 2002, 2003, Rice 2005, Gupta und Bei 2006*), – z. B. innerhalb von Signalkaskaden (Abb. 5. 2) – dargestellt werden konnten, ist es möglicherweise weiterführend solche Wechselwirkungen zu erforschen. Auch hier sei einschränkend erwähnt, dass die untersuchten Mäuse syndromale Spalten zeigten.

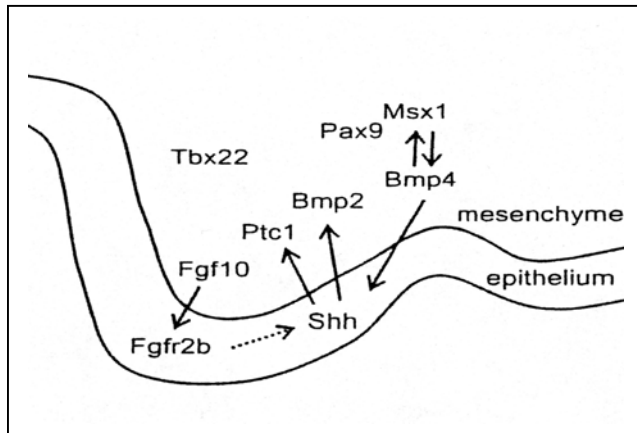


Abb. 5. 2:

Beispiel für Gen- und Gentranskriptinteraktionen während der embryonalen Entwicklung des Gaumens bei der Maus

(Rice D. P. C.. Craniofacial Anomalis: From Development to Molecular Pathogenesis. Current Molecular Medicine 2005, 5, 699 – 722)

5. 5 Schlussfolgerung und Ausblick

Trotz der mittlerweile großen Anzahl von Kopplungs- und Assoziationsstudien an verschiedenen Populationen konnte die kausale Genese der nicht-syndromalen LK(+/-GS)- und G-Spalten bisher nicht geklärt werden. Aktuell wird weiterhin von einem multifaktoriellen System mit additiver Polygenie und Schwellenwerteffekt ausgegangen. Letzten Endes muss dies jedoch als wissenschaftliches Konstrukt in Ermangelung eindeutiger und einheitlicher Erkenntnisse angesehen werden.

Wie für eine Reihe anderer Gene (Anhang 1) konnten auch für das Kandidatengen MSX 1 in verschiedenen Studien einige signifikante Ergebnisse erzielt werden, die zum Teil jedoch sehr von einander abweichen. Diese divergierenden Ergebnisse werden in erster Linie auf das Vorliegen unterschiedlicher Populationen zurückgeführt, was denkbar scheint. Jedoch können abweichende Ergebnisse innerhalb der gleichen Populationen hierdurch nicht erklärt werden. Ebenfalls häufig werden zu kleine Stichprobenumfänge angeführt. Hiergegen ist einzuwenden, dass auch groß angelegte panethnische Untersuchungen keine wirklich weiterführenden Resultate vorbringen konnten. Daher wäre es auch in der vorliegenden Arbeit zu einseitig, die fehlende Signifikanz der ermittelten Ergebnisse allein auf die Abstammung und den Umfang der Stichprobe zurückzuführen.

Vielmehr ist der Ansatz der vorliegenden Studie kritisch zu begutachten. Insbesondere ist zu hinterfragen, ob durch die Untersuchung eines einzelnen Genes weiterführende Ergebnisse zu erwarten sind. Beispielsweise werden Umwelt-Gen- bzw. Gen-Gen-Interaktionen (z. B. im Rahmen von Signalkaskaden), die unabhängig von vermuteten Mutationen – z. B. infolge kurzzeitig wirksamer exogener Faktoren (O₂-Mangel u. a.) – Auswirkungen auf die Expressionsmechanismen von MSX 1 haben, durch eine solche Analyse nicht erfasst. Entscheidende Resultate könnten hier zum Beispiel durch Studien zu den Expressionsmechanismen von MSX 1 an Gaumenfortsatzkulturen geliefert werden. Die Basis für Humanstudien könnten tierexperimentell gewonnene Ergebnisse bieten. Die Tiere (z. B. Mäuse) sind in kurzer Zeit und in gewünschter Anzahl verfügbar. Kurzfristige Planungen sind möglich und Experimente können in Anbetracht neuer Forschungshypothesen ad hoc modifiziert werden. Hierbei ist es jedoch notwendig Tiermodelle zu verwenden, denen das gleiche Krankheitsbild zu Grunde liegt wie den zu untersuchenden humanen Patienten. D. h. dass bei Analysen nichtsyndrom-assoziiierter LKGS-Spalten des Menschen die entsprechenden Tiermodelle neben der Spalte keine weiteren Anomalien aufweisen dürfen. Andernfalls wären die entsprechenden Ergebnisse nur bedingt übertragbar.

Hinsichtlich der Kriterien Zeit und Wirtschaftlichkeit könnte man durch Stichprobenpooling, Paralleluntersuchungen mehrerer Gene mit Einbeziehen von exogenen Faktoren und Gen-Gen-Interaktionen sowie Anwendung verschiedener sich ergänzender Methoden zukünftige Studien ökonomischer gestalten.

6. Literaturverzeichnis

Alappat S, Zhang ZY, Chen YP.

Msx homeobox gene family and craniofacial development.
Cell Res. 2003 Dec; 13 (6): 429 – 442.

Amos C, Gasser D, Hecht JT.

Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. New BCL3 information.
Am J Hum Genet. 1996; 59: 743 – 744.

Ardinger HH, Buetow KH, Bell GI, Bardach J, VanDemark DR, Murray JC.

Association of genetic variation of the transforming growth factor-alpha gene with cleft lip and palate.
Am J Hum Genet. 1989 Sep; 45 (3): 348 – 353.

Arslan-Kirchner M.

Genetische Aspekte bei Lippen-Kiefer-Gaumenspalten.
Sprache – Stimme – Gehör 2001; 25: 54 – 58.

Andrä A, Neumann HJ.

Lippen-, Kiefer-, Gaumenspalten: Entstehung – Klinik – Behandlungskonzepte.
Einhorn-Press Verlag GmbH, Reinbek 1996.

Beaty TH, Hetmanski JB, Zeiger JS, Fan YT, Liang KY, VanderKolk CA, McIntosh I.

Testing candidate genes for non-syndromic oral clefts using a case-parent trio design.
Genet Epidemiol. 2002 Jan; 22 (1): 1 – 11.

Beaty TH, Wang H, Hetmanski JB, Fan YT, Zeiger JS, Liang KY, Chiu YF, Vanderkolk CA, Seifert KC, Wulfsberg EA, Raymond G, Panny SR, McIntosh I.

A case-control study of nonsyndromic oral clefts in Maryland.
Ann Epidemiol. 2001 Aug; 11 (6): 434 – 442.

Beiraghi S, Foroud T, Diohy S, Bixler D, Conneally PM, Delozier-Lanchet D, Hodes ME.

Possible localization of a major gene for cleft lip and palate to 4q.
Clin Genet 1994; 46: 255 – 256.

Berge SJ, Plath H, Hansmann M.

Bedeutung der pränatalen Diagnostik von LKG-Spalten.
Mund Kiefer GesichtsChir. 2002; 6: 85 – 90.

Blanton SH, Crowder E, Malcolm S,

Exclusion of linkage between cleft lip with or without cleft palate and markers on chromosomes 4 and 6.

Am J Hum Genet. 1996; 58: 239 – 241.

Blanco R, Suazo J, Santos JL, Paredes M, Sung H, Carreno H, Jara L.

Association between 10 microsatellite markers and nonsyndromic cleft lip palate in the Chilean population.

Cleft Palate Craniofac J. 2004 Mar; 41 (2): 163 – 167.

Blanco R, Chakraborty R, Barton SA, Carreno H, Paredes M, Jara L, Palomino H, Schull WJ.

Evidence of a sex-dependent association between the MSX1 locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Chilean population.

Hum Biol. 2001 Feb; 73 (1): 81 – 89.

Blanco R, Jara L, Villaseca MC.

Genetic variation of MSX 1 has a sexual dimorphism in non syndromic cleft palate in the Chilean population.

Rev Med Chil. 1998 Jun; 126 (6): 637 – 645.

Blanco R, Jara LS, Villaseca MCG.

Association between the genetic variation of MSX1 (Hox-7) and non syndromic cleft lip palate in Chilean subjects.

Rev. Méd. Chile 1998; 126: 637 – 645.

Brown JM, Wedden SE, Millburn GH, Robson LG, Hill RE, Davidson DR, Tickle C.

Experimental analysis of the control of expression of the homeobox-gene Msx-1 in the developing limb and face.

Development 1993; 119: 41 – 48.

Bull HG, Lenzen C.

Differentialdiagnostik und Therapie der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten.

Zentralbl Gynakol. 2003; 125: 398 – 403.

Carinci P, Pezzetti F, Scapoli L, Padula E, Baciliero U, Curioni C, Tognon M.

Nonsyndromic cleft lip and palate: Evidence of linkage to a microsatellite marker on 6p23.

Am J Hum Genet. 1995; 56: 337 – 339.

Carinci F, Pezzetti F, Scapoli L, Martinelli M, Carinci P, Tognon M.

Genetics of nonsyndromic cleft lip and palate: a review of international studies and data regarding the Italian population.

Cleft Palate Craniofac J. 2000 Jan; 37 (1): 33 – 40.

Carreno H, Paredes M, Tellez G, Palomino H, Blanco R.

Association of non-syndromic cleft lip and cleft palate with microsatellite markers located in 6p
Rev Med Chil. 1999 Oct; 127 (10): 1189 – 1198.

Chenevix-Trench G, Jones K, Green A, Martin N.

Further evidence for an association between genetic variation in transforming growth factor alpha and cleft lip and palate.
Am J Hum Genet 1991; 48: 1012 – 1013.

Chenevix-Trench G, Jones K, Green AC, Duffy DL, Martin NG.

Cleft lip with or without cleft palate: associations with transforming growth factor alpha and retinoic acid receptor loci.
Am J Hum Genet. 1992 Dec; 51 (6): 1377 – 1385.

Cox TC.

Taking it to the max: The genetic and developmental mechanisms coordinating midfacial morphogenesis and dysmorphology.
Clin. Genet. 2004; 65: 163 – 176.

Davis JS, Ritchie HP .

Classification of congenital clefts of the lip and palate.
J Am Med Ass 1922; 79: 1323.

Fallin MD, Hetmanski JB, Park J, Scott AF, Ingersoll R, Fuernkranz, McIntosh I, Beaty TH.

Family-based analysis of MSX1 haplotypes for association with oral clefts.
Genet Epidemiol. 2003 Sep; 25 (2): 168 – 175.

Feng H, Sassani R, Barlett SP, Lee A, Hecht JT, Malcolm S, Winter RM, Vintiner GM, Buetow KH, Gasser DL.

Evidence, from family studies, for linkage disequilibrium between TGFA and a gene for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate.
Am J Hum Genet. 1994 Nov; 55 (5): 932 – 936.

Field LL, Ray AK, Marazita ML.

Transforming growth factor alpha: a modifying locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate.
Eur J Hum Genet. 1994; 2: 159 – 165.

Fogh-Andersen P (1942).

Inheritance of harelip and cleft palate.
Arnold Busck Co., Copenhagen.

Ganten D, Ruckpaul K (Hrsg.).

Grundlagen der molekularen Medizin.
Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2003.

Gehring WJ.

Exploring the homeobox.
Gene 1993; 135: 215 – 221.

Gehring WJ, Qian YQ, Billeter M, Furukubo-Tokunaga K, Schier AF, Resendez-Perez D, Folter M, Otting G, Wuthrich K.

Homeodomain-DNA recognition.
Cell 1994; 78: 211 – 223.

Gupta V, Bei M.

Modification of Msx1 by SUMO-1.
Biochem. Biophys. Res. Com. 2006; 345: 74 – 77.

Hay ED.

The Mesenchymal Cell, Its Role in the Embryo, and the Remarkable Signaling Mechanisms That Create It.
Dev. Dyn. 2005; 233: 706 – 720.

Hecht JT, Wang Y, Blanton SH, Michels VV, Daiger SP.

Cleft lip and Palate: No evidence of linkage to Transforming Growth Factor Alpha.
Am J Hum Genet. 1991; 49: 682 – 686.

Hecht JT, Wang Y, Connor B,

Nonsyndromic cleft lip and palate: no evidence of linkage to HLA or factor 13A.
Am J Hum Genet. 1993 Jun; 52: 1230 – 1233.

Hecht JT, Mulliken JB, Blanton SH.

Evidence for a cleft palate only locus on chromosome 4 near MSX1.
Am J Med Genet. 2002 Jul 15; 110 (4): 406 – 407.

Hewitt JE, Clark LN, Ivens A, Williamson R.

Structure and sequence of the human homeobox gene HOX7.
Genomics 1991; 11: 670 – 678.

Hilgers R-D, Bauer P, Scheiber V.

Einführung in die medizinische Statistik.
Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2003.

Hill RE, Jones PF, Rees AR, Sime CM, Justice MJ, Copeland NG, Jenkins NA, Graham E, Davidson DR.

A new family of mouse homeo box-containing genes: molecular structure, chromosomal location, and developmental expression of Hox-7.1.
Genes & Development 1989; 3: 26 – 37.

Hodge SE.

Linkage Analysis versus Association Analysis: Distinguishing between Two Models That Explain Disease-Marker Associations.
Am J Hum Genet. 1993; 53: 367 – 384.

Holder SE, Vintiner GM, Farren B, Malcolm S, Winter RM.

Confirmation of an association between RFLP's at the Transforming Growth Factor-Alpha Locus and Non-syndromic Cleft lip and Palate.
J Med Genet. 1992; 29: 390 – 392.

Houzelstein D, Cohen A, Buckingham ME, Robert B.

Insertional mutation of the mouse Msx1 homeobox gene by an nlacZ reporter gene.
Mech Dev. 1997 Jul; 65 (1-2): 123 – 133.

Hwang SJ, Beaty TH, McIntosh I, Hefferson T, Panny S.

Association between homeobox-containing gene MSX1 and the occurrence of limb deficiency.
Am J Med Genet. 1998; 75: 419 – 423.

Item CB, Turhani D, Kapral D, Sinko K, Cviki B, Weissenböck M, Yerit K, Lauer G, Ewers R, Watzinger F.

Neue Mutation des PVRL1 Gens bei Patienten mit nicht syndromischen Lippen-, Kiefer- und Gaumenspalten.
8. Kongress Österreichische Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie.

Ivens A, Flavin N, Williamson R, Dixon M, Bates G, Buckingham M, Benoit R.

The human homeobox gene HOX7 maps to chromosome 4p16.1 and may be implicated in Wolf-Hirschorn syndrome.
Hum Genet. 1990; 84: 473 – 476.

Jara L, Blanco R, Chiffelle I, Palomino H, Carreno H.

Association between alleles of the transforming growth factor alpha locus and cleft lip and palate in the Chilean population.
Am J Med Genet. 1995; 57: 548 – 551.

Jezewski PA, Vieira AR, Nishimura C, Ludwig B, Johnson M, O'Brian, Daack-Hirsch S, Schultz RE, Weber A, Nepomucena B, Romitti PA, Christensen K, Orioli IM, Castilla EE, Machida J, Natsume N, Murray JC.

Complete sequencing shows a role for MSX1 in non-syndromic cleft lip and palate.
J Med Genet. 2003 Jun; 40 (6): 399 – 407.

Jugessur A, Lie RT, Wilcox AJ, Murray JC, Taylor JA, Saugstad OD, Vindenes HA, Abyholm F.

Variants of developmental genes (TGFA, TGFB 3, and MSX1) and their associations with orofacial clefts: A case-parent triad analysis.
Genet Epidemiol. 2003 Apr; 24 (3): 230 – 239.

Juriloff DM.

Current status of genetic linkage studies of a major gene that causes CL/P in mice: exclusion map.

J Craniofac Genet Dev Biol. 1993 Oct-Dec; 13 (4): 223 – 229.

Kernahan DA, Stark RB.

A new classification for cleft lip and cleft palate.

Plast Reconstr Surg 1958; 22: 435.

Kirschner RE, Gannon FH, Xu J, Wang J, Karmacharya J, Bartlett SP, Whitaker LA.

Craniosynostosis and Altered Patterns of Fetal TGF- β Expression Induced by Inrauterine Constraint.

Plast Reconstr Surg. 2002 June: 2347 – 2354.

Koch J, Koch H, Grzonka M, Gundlach KK.

Die LKGS(N)-Spalten und ihre Kodierung mit der LAHS-Nomenklatur.

Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie 2003.

Koch J.

Zur Diagnostik der Lippen-, Kiefer- und Gaumenspalten.

Dtsch Stomatol 1963; 13: 660.

Koilinen H, Ollikainen V, Rautio J, Hukki J, Kere J.

Linkage and linkage disequilibrium searched for between non-syndromic cleft palate and four candidate loci.

J Med. Genet. 2003; 40: 464 – 468.

Kriens O.

LHASAHL – a concise documentation system for cleft lip, alveolus and palate diagnoses.

In: Kriens O (ed) What is a cleft lip and palate? A multidisciplinary update.

Workshop, Bremen 1987: Thieme Stuttgart

Kunstmann E, Radtke J, Epplen JT.

Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalten. Heterogene Krankheitsbilder.

Mund-,Kiefer- und Gesichtschirurgie 2001: 305 – 311.

Lace B, Vasiljeva I, Dundure I, Barkane B, Akota I, Krumina A.

Mutation analysis of the MSX1 gene exons and introns in patients with nonsyndromic cleft lip and palate.

Stomatologija. 2006; 8(1): 21 – 24.

Lidral AC, Romitti PA, Basart AM, Doetschman T, Leysens NJ, Daack-Hirsch S, Semina EV, Johnson LR, Machida J, Burds A, Parnell TJ, Rubenstein JL, Murray JC.

Association of MSX1 and TGFB3 with nonsyndromic clefting in humans.
Am J Hum Genet. 1998 Aug; 63 (2): 557 – 568.

Lidral AC, Murray JC, Buetow KH, Basart AM, Schearer H, Shiang R, Naval A, Layda E, Magee K, Magee W.

Studies of the candidate genes TGFB2, MSX1, TGFA, and TGFB3 in the etiology of cleft lip and palate in the Philippines.
Cleft Palate Craniofac J. 1997 Jan; 34 (1): 1 – 6.

Machida J, Yoshiura K, Funkhauser CD, Natsume N, Kawai T, Murray JC.

Transforming growth factor-alpha (TGFA): genomic structure, boundary sequences, and mutation analysis in nonsyndromic cleft lip/palate and cleft palate only.
Genomics. 1999 Nov 1; 61 (3): 237 – 242.

Mackenzie A, Leeming GL, Jowett AK, Ferguson MWJ, Sharpe PT.

The homeobox gene Hox-7.1 has specific regional and temporal expression patterns during early murine craniofacial embryogenesis, especially tooth development in vivo and in vitro.
Development 1991; 11: 269 – 285.

Maestri NE, Beaty TH, Hetmanski J, Smith EA, McIntosh I, Wyszynski DF, Liang KY, Duffy DL, VanderKolk C.

Application of transmission disequilibrium tests to nonsyndromic oral clefts: including candidate genes and environmental exposures in the models.
Am J Med Genet. 1997 Dec 19; 73 (3): 337 – 344.

Marazita ML, Field LL, Cooper ME, Tobias R, Maher BS, Peanchitlertkajorn S, Liu YE.

Genome Scan for Loci Involved in Cleft Lip With or Without Cleft Palate, in Chinese Multiplex Families.
Am J Hum Genet 2002; 71: 349 – 364.

Marazita ML, Field LL, Cooper ME, Tobias R, Maher BS, Peanchitlertkajorn S, Liu YE.

Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in China: assessment of candidate regions.
Cleft Palate Craniofac J. 2002 Mar; 39 (2): 149 – 156.

Martinelli M, Scapoli L, Pezzetti F, Carinci F, Francioso F, Baciliero U, Padula E, Carinci P, Tognon M.

Linkage analysis of three candidate regions of chromosome 1 in nonsyndromic familial orofacial cleft.
Am Hum Genet 2001; 65: 465 – 471.

McGinnis W, Levine MS, Hafen e, Kuroiwa A, Gehring WJ.

A conserved DNA sequence in homeotic genes of the Drosophila Antennapedia, and bithorax complexes.
Nature 1984; 308: 428.

Mitchell LE.

Guidelines for the design and analysis of studies on non-syndromic cleft lip and cleft palate in humans: Summary report from a workshop of the international consortium for oral cleft genetics.
Cleft Palate Craniofac J. 2002 Jan; 39 (1): 93 –100.

Mitchell LE, Murray JC, O'Brien S, Christensen K.

Evaluation of two putative susceptibility loci for oral clefts in the Danish population.
American Journal of Epidemiology 2001 May 15; 153 (10): 1007 – 1015.

Mitchell LE.

Transforming growth factor alpha locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: a reappraisal.
Genet Epidemiol. 1997; 14 (3): 231 – 240.

Mitchell LE, Healey SC, Chenevix-Trench G.

Evidence for an association between nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate and a gene located on the long arm of chromosome 4.
Am J Hum Genet. 1995 Nov; 57 (5):1130 – 1136.

Mitchell LE.

Interrpreting the evidence for an association between the retinoic acid receptor locus and non-syndromic cleft lip with or without cleft palate.
J Med Genet. 1994; 31: 425.

Mitchell LE, Risch N.

Mode of inheritance of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: A reanalysis
Am J Hum Genet 1992; 51: 323 – 332

Moore KL.

Embryologie. Lehrbuch und Atlas der Entwicklungsgeschichte des Menschen.
Schattauer Verlag 1990.

Moore KL.

Grundlagen der medizinischen Embryologie.
Ferdinand Enke Verlag 1996.

Modesto A, Moreno LM, Krahn K, King S, Lidral AC.

MSX 1 and orofacial clefting with and without tooth agenesis.
J Dent. Res. 2006 Jun; 85(6): 542 – 546.

Mossey PA, Arngrimsson R, McColl J, Vintiner GM, Connor JM.

Prediction of liability to orofacial clefting using genetic and craniofacial data from parents.

J Med Genet. 1998 May; 35 (5): 371 – 378.

Murray JC.

Gene/environment causes of cleft lip and/or palate.

Clin Genet 2002; 61: 248 – 256.

Padanilam BJ, Stadler HS, Mills KA, McLeod LB, Solursh M, Lee B, Ramirez F, Buetow KH, Murray JC.

Characterization of the human HOX 7 cDNA and identification of polymorphic markers.

Hum Mol Genet. 1992; 1: 407 – 410.

Palomino H, Cerda-Flores RM, Blanco R, Palomino HM, Barton SA, de Andrade M, Chakraborty R.

Complex segregation analysis of facial clefting in Chile.

J Craniofac Genet Dev Biol. 1997 Apr-Jun; 17 (2): 57 – 64.

Peachitlertkajorn S, Cooper ME, Liu Y, Field LL, Marazita ML.

Chromosome 17: Gene Mapping Studies of Cleft Lip With or Without Cleft Palate in Chinese Families.

Cleft Palate-Craniofacial Journal 2003 Jan.; 40 (1): 71 – 79.

Peters H, Neubuser A, Kratochwil K, Balling R.

Pax9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities.

Genes Dev. 1998 Sep 1; 12 (17): 2735 – 2747.

Pezzetti F, Scapoli L, Martinelli M, Carinci F, Bodo M, Carinci P, Tofnon M.

A locus in 2p13-p14 (OFC2), in addition to that mapped in 6p23, is involved in nonsyndromic familial orofacial cleft malformation.

Genomics. 1998 Jun 15; 50 (3): 299 – 305.

Prescott NJ, Lees MM, Winter RM, Malcolm S.

Identification of susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a two stage genome scan of affected sib-pairs.

Hum Genet. 2000 Mar; 106 (3): 345 – 350.

Rice DPC.

Craniofacial Anomalies: From Development to Molecular Pathogenesis.

Current Molecular Medicine 2005; 5: 699 – 722.

Robert B, Sassoon D, Jacq B, Gehring W, Buckingham M.

Hox-7, a mouse homeobox gene with a novel pattern of expression during embryogenesis.

EMBO J 1989; 8: 91 – 100.

- Romitti PA, Lidral AC, Munger RG, Daack-Hirsch S, Burns TL, Murray JC.**
Candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate and maternal cigarette smoking and alcohol consumption: evaluation of genotype-environment interactions from a population-based case-control study of orofacial clefts.
Teratology. 1999 Jan; 59 (1): 39 – 50.
- Sassani R, Bartlett SP, Feng H,**
Association between alleles of the Transforming Growth Factor-Alpha locus and the occurrence of cleft lip.
Am J Med Genet. 1993; 45: 565 – 569.
- Satokata I, Maas R.**
Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development.
Nat Genet. 1994 Apr; 6 (4): 348 – 356.
- Scapoli L, Martinelli M, Pezzetti F, Carinci F, Bodo M, Tognon M, Carinci P.**
Linkage disequilibrium between GABRB3 gene and nonsyndromic familial cleft lip with or without cleft palate.
Hum Genet. 2002 Jan; 110 (1): 15 – 20.
- Scapoli L, Pezzetti F, Carinci F, Martinelli M, Varinci P, Tognon M.**
Lack of linkage disequilibrium between transforming growth factor alpha Taq I polymorphism and cleft lip with or without cleft palate in families from Northeastern Italy.
Am J Med Genet. 1998 Jan 13; 75 (2): 203 – 206.
- Scapoli L, Pezzetti F, Carinici F, Martinelli M, Carinici P, Tognon M.**
Evidence of linkage to 6p23 and genetic heterogeneity in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate.
Genomics 1997; 43: 216 – 220.
- Schutte BC, Murray JC.**
The many faces and factors of orofacial clefts
Hum Mol Genet 1999; 8: 1853 – 1859
- Shaw B, Semb G, Nelson P, Brattström V, Molsted K, PrahI-Andersen B.**
The Eurocleft Project 1996 – 2000.
IOS Press, Amsterdam Berlin Oxford Tokyo Washington DC 2000.
- Shaw GM, Wasserman CR, Lammer EJ, O'Malley CD, Murray JC, Basart AM, Tolarova MM.**
Orofacial clefts, parental cigarette smoking and transforming growth factor-alpha gene variants.
Am J Hum Genet. 1996; 58: 551 – 561.

Shaw D, Ray A, Marazita M, Field L.

Further evidence of a relationship between the retinoic acid receptor alpha locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate (CL + P).

Am J Hum Genet. 1993; 53: 1156 – 1157.

Slayton RL, Williams L, Murray JC, Wheeler JJ, Lidral AC, Nishimura CJ.

Genetic Association Studies of Cleft Lip and/or Palate With Hypodontia Outside the Cleft Region.

Cleft Palate-Craniofacial Journal 2003 May; 40 (3).

Stein J, Mulliken JB, Stal S, Gasser DL, Malcolm S, Winter R, Blanton SH, Amos C, Seemanova E, Hecht JT.

Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: evidence of linkage to BCL3 in 17 multigenerational families.

Am J Hum Genet. 1995 Aug; 57 (2): 257 – 272.

Stoll C, Qian JF, Feingold J, Sauvage P, May E.

Genetic variation in Transforming Growth Factor Alpha: Possible Association of BamH1 Polymorphism with Bilateral Sporadic Cleft lip and Palate.

Am J Hum Genet. 1992; 50: 870 – 871.

Suzuki RH, Padanilam BJ, Vitalle E, Ramirez F, Solursh M.

G-Hox-7, a novel homeobox-containing gene in the chicken.

Dev Biol 1991; 148: 375 – 388.

Suzuki Y, Jezewski PA, Machida J, Watanabe Y, Shi M, Cooper ME, Viet LT, Tin NTD, Hai H, Natsume N, Shimosato K, Marazita ML, Murray JC.

In a Vietnamese population, MSX1 variants contribute to cleft lip and palate.

Genetics In Medicine 2004 Jun; 6 (3): 117 – 125.

Takahashi Y, LeDouarin N.

cDNA cloning of a quail homeobox gene and its expression in neural crest-derived mesenchyme and lateral plate mesoderm.

Proc Natl Acad Sci. 1990; 87: 7482 – 7486.

Thomas T, Kurihara H, Yamagishi H, Kurihara Y, Yazaki Y, Olson EN, Srivastava D.

A signaling cascade involving endothelin-1, dHAND and msx1 regulates development of neural-crest-derived branchial arch mesenchyme.

Development. 1998 Aug; 125 (16): 3005 – 3014.

Thomson G.

Mapping disease genes: family-based association studies.

Am J Hum Genet 1995; 57: 487 – 498

Tongkobpetch S, Siriwan P., Shotelersuk V.

MSX1 mutations contribute to nonsyndromic cleft lip in a Thai population.

J Hum Genet. 2006; 51(8): 671 – 676.

Vastardis H, Karimbux N, Guthua SW, Seidmann JG, Seidmann CE.

A human MSX 1 homeodomain missense mutation causes selective tooth agenesis.
Nature Genet. 1996; 13: 417 – 421.

Veau V.

Division palatine.
Masson et Cie (1931), Paris.

Veau V.

Hasenscharten menschlicher Keimlinge auf der Stufe 21 – 23 mm SSL.
Z Anat Entwickl Gesch 1937; 108: 459.

Vieira AR, Avila JR, Daack-Hirsch S, Dragan E, Félix TM, Rahimov F, Harrington J, Schultz RR, Watanabe Y, Johnson M, Fang J, Brien SE, Orioli IM, Castilla EE, FitzPatrick DR, Jiang R, Marazita ML, Murray JC.

Medical Sequencing of Candidate Genes for Nonsyndromic Cleft Lip and Palate.
PLoS Genet. 2005 Dec; 1(6): 651 – 659.

Vieira AR, Castillo Taucher S, Aravena T, Astete C, Sanz P, Tastets ME, Monasterio L, Murray JC.

Mutational analysis of the muscle segment homeobox gene 1 (MSX1) in Chilean patients with cleft lip/palate]
Rev Med Chil. 2004 Jul;132(7): 816 - 22.

Vieira AR, Orioli IM, Castilla EE, Cooper ME, Marazita ML, Murray JC.

MSX1 and TGFB3 contribute to clefting in South America.
J Dent Res. 2003 Apr; 82 (4): 289 – 292.

Vieira AR.

Oral clefts and syndromic forms of tooth agenesis as models for genetics of isolated tooth agenesis.
J Dent Res. 2003 Mar; 83 (39): 162 – 165.

Vieira AR, Romitti PA, Orioli IM, Castilla EE.

Complex segregation analysis of 1,792 cleft lip and palate families in South America: 1967 – 1997.
Pesqui Odontol Bras 2003; 17 (2) 161 – 165.

Vieira AR, Karras JC, Orioli IM, Castilla EE, Murray JC.

Genetic origins in a South American clefting population.
Clin Genet 2002; 62: 458 – 463.

Vieira AR,, Orioli IM.

Candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate.
ASDC J Dent Child. 2001 Jul-Aug; 68 (4): 272 – 279.

Vintiner GM, Lo KK, Holder SE,

Exclusion of candidate genes from a role in cleft lip with or without cleft palate: linkage and association studies.

J Med Genet. 1993 Sep; 30: 773 – 778.

Vintiner GM, Holder SE, Winter RM, Malcolm S.

No evidence of linkage between the Transforming Growth Factor-Alpha gene in families with apparently autosomal dominant inheritance of cleft lip and palate.

J Med Genet 1992; 29: 393 – 397.

Vögele J.

Säuglingssterblichkeit im 19. und 20. Jahrhundert.

Institut für Geschichte der Medizin der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

(Vortrag anlässlich des Tages der Gesundheitsforschung, Februar 2005).

Wong FK, Hagberg C, Karsten A, Larson O, Gustavsson M, Huggare J, Larsson C, The BT, Linder-Aronson S.

Linkage Analysis of Candidate Regions in Swedish Nonsyndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate Families.

Cleft Palate-Craniofacial Journal 2000 Jul; 37 (4): 357 – 362.

Wyszynsky DF, Maestri N, Lawanda AF, McIntosh I, Smith EA, Garcia-Delgado C, Vinageras-Guarneros E,

No evidence of linkage for cleft lip with or without cleft palate to a marker near the transforming growth factor alpha locus in two populations.

Hum Hered 1997; 47: 101 – 109.

Zhang Z, Song Y, Zhao X, Zhang X, Fermin C, Chen Y.

Rescue of cleft palate in Msx1-deficient mice by transgenic Bmp4 reveals a network of BMP and Shh signaling in the regulation of mammalian palatogenesis.

Development. 2002 Sep; 129 (17): 4135 – 4146.

Zhang Z, Zhang X, Avniel WA, Song Y, Jones SM, Jones TA, Fermin C, Chen Y.

Malleal Processus Brevis Is Dispensable for Normal Hearing in Mice.

Developmental Dynamics 2003; 227: 69 – 77.

7. Anhang

7. 1 Studien über Kandidatengene zwischen 1989 und 2004

<u>Kandidatengen</u>	<u>Lokalisation</u>	<u>Autor</u>	<u>Jahr</u>	<u>Population</u>	<u>Studientyp</u>	
					Assoziation	Kopplung
ABL1	9q34.1	Stein et al.	1995	USA, England		(-)
APOC2		Marazita et al.	2002	China		(+)
BCL2	18q21.3	Chenevix-Trench	1992	Australien		(-)
BCL3	19q13.1	Stein et al.	1995	USA, England		(+)
		Amos et al.	1996			(+)
		Maestri et al.	1997	USA		(+)
		Wyszynski et al.	1997	USA, Mexiko	(+)	
		Lidral et al.	1998	USA		(-)
		Beaty et al.	2001	USA		(-)
		Beaty et al.	2002	USA		(+)
		Blanco et al.	2004	Chile	(+)	
CMYC	8q24.12	Stein et al.	1995	USA, England		(-)
COL2A1	12q12-q13.2	Stein et al.	1995	USA, England		(-)
COL9A1	16q	Stein et al.	1995	USA, England		(-)
COL11A1	1p21	Stein et al.	1995	USA, England		(-)
COL11A2	6p21.2	Stein et al.	1995	USA, England		(-)
CRTL1	5q15-14	Vintiner et al.	1993	England		(-)
		Stein et al.	1995	USA, England		(-)
CRTM	1p35	Stein et al.	1995	USA, England		(-)
DLX2		Lidral et al.	1998	USA		(-)
D2S443	2p13	Maestri et al.	1997	USA		(-)
		Beaty et al.	2002	USA	(+)	
D4S175	4q31	Beiraghi et al.	1994	nicht spezifiziert		(+)
		Mitchell et al.	1994	Australien	(+)	
		Mitchell et al.	1995	Australien	(+)	
		Blanton et al.	1996	diverse		(-)
D4S175	4q31	Marazita et al.	2002	China		(-)
		Blanco et al.	2004	Chile	(-)	
D4S192	4q31	Beiraghi et al.	1994	nicht spezifiziert		(+)
		Mitchell et al.	1995	Australien	(+)	
		Blanton et al.	1996	diverse		(-)
		Blanco et al.	2004	Chile	(-)	
D4S194	4q31	Marazita et al.	2002	China		(-)
D6S89	6p23	Hecht et al.	1993			(-)
		Blanton et al.	1996	diverse		(-)
		Blanco et al.	2004	Chile	(-)	

Fortsetzung:**7. 1 Studien über Kandidatengene im Zeitraum zwischen 1989 und 2004**

<u>Kandidatengen</u>	<u>Lokalisation</u>	<u>Autor</u>	<u>Jahr</u>	<u>Population</u>	<u>Studientyp</u>	
					<u>Assoziation</u>	<u>Kopplung</u>
D6S105	6p	Hecht et al.	1993			(-)
		Carinci et al.	1995			(+)
		Blanton et al.	1996	diverse		(-)
		Blanco et al.	2004	Chile	(-)	
D6S109	6p	Carinci et al.	1995			(+)
		Blanco et al.	2004	Chile	(+)	
D14S61		Maestri et al.	1997	USA		(-)
		Beaty et al.	2002	USA	(+)	
D17S250		Marazita et al.	2002	China		(-)
D17S579	17q21	Shaw et al.	1993	Indien	(+)	(-)
		Marazita et al.	2002	China		(-)
		Blanco et al.	2004	Chile	(-)	
D19S49		Marazita et al.	2002	China		(+)
D19S178	19q	Wyszynski et al.	1997	USA, Mexiko	(+)	
D19S574	19q	Martinelli et al.	1998	Italien		(+)
EDN1		Carinci et al.	1995			(-)
EDN1		Blanco et al.	2004	Chile	(-)	
EGF	4q25	Ardinger et al.	1989	USA	(-)	
		Stein et al.	1995	USA, England		(-)
EGFR	7p12	Ardinger et al.	1989	USA	(-)	
		Stein et al.	1995	USA, England		(-)
EN2	7q36	Chenevix-Trench	1992	Australien	(-)	
ER	6q24.27	Ardinger et al.	1989	USA	(-)	
F13A	6p25.24	Hecht et al.	1993			(-)
		Carinci et al.	1995			(-)
		Blanton et al.	1996	diverse		(-)
		Maestri et al.	1997	USA		(-)
		Marazita et al.	2002	China		(-)
		Blanco et al.	2004	Chile	(-)	
GABRB3	15q11.2 - q12	Scapoli et al.	2002	Italien		(+)
		Stein et al.	1995	USA, England		(-)
GAD1		Scapoli et al.	2002	Italien		(-)
GATA185H		Marazita et al.	2002	China	(-)	
GRL	5q11.13	Ardinger et al.	1989	USA	(-)	
HOX2B	17q21-2	Stein et al.	1995	USA, England		(-)
HOX2F	17q21-22	Chenevix-Trench	1992	Australien	(-)	
HOX2G	17q21-22	Chenevix-Trench	1992	Australien	(-)	

Fortsetzung:**7. 1 Studien über Kandidatengene im Zeitraum zwischen 1989 und 2004**

<u>Kandidatengen</u>	<u>Lokalisation</u>	<u>Autor</u>	<u>Jahr</u>	<u>Population</u>	<u>Studientyp</u>			
					<u>Assoziation</u>	<u>Kopplung</u>		
HRAS	11p	Stein et al.	1995	USA, England		(-)		
HXB	9q32-34	Stein et al.	1995	USA, England		(-)		
IGF2	11p	Stein et al.	1995	USA, England		(-)		
MSX2 (HOX8)	5q35	Stein et al.	1995	USA, England		(-)		
MTHFR		Hill & Fitzpatrick	1998			(-)		
MTHFR		Beaty et al.	2002	USA		(+)		
OFC1	6p24.3	Pezetti et al.	1998	Italien		(+)		
OFC2	2p13 - p14	Pezetti et al.	1998	Italien		(+)		
PVRL1	11q.23	Item et al.	2003	Österreich		(+)		
RARA	17q21.1	Chenevix-Trench	1992	Australien		(+)		
		Shaw et al.	1993	Indien		(+)		
		Vintiner et al.	1993	England		(-)	(-)	
		Mitchell et al.	1995	Australien		(+)		
		Stein et al.	1995	USA, England			(-)	
		Maestri et al.	1997	USA			(+)	
		Scapoli et al.	2002	Italien			(+)	
TCTE	6p	Hecht et al.	1993			(-)		
TGF α	2p13	Ardinger et al.	1989	USA		(+)		
		Chenevix-Trench	1991	Australien		(+)		
		Hecht et al.	1991				(-)	
		Chenevix-Trench	1992	Australien		(+)		
		Holder et al.	1992	England		(+)		
		Vintiner et al.	1992	nicht spezifiziert			(-)	
		Sassani et al.	1993	USA		(+)		
		Stoll et al.	1993	Frankreich		(-)		
		Feng et al.	1994	USA, England			(+)	
		Field et al.	1994	Indien			(-)	
		Jara et al.	1995	Chile		(-)		
		Mitchell et al.	1995	Australien		(+)		
		Stein et al.	1995	USA, England			(-)	
		Shaw et al.	1996	USA		(-)		
		TGF α	2p13	Lidral et al.	1997	Philippinen		(-)
				Maestri et al.	1997	USA		(+)
Mitchell et al.	1997			Dänemark		(+)		
Pezetti et al.	1998			Italien			(+)	
Scapoli et al.	1998			Italien			(-)	
Machida et al.	1999			Italien		(+)		
Romitti et al.	1999	USA		(-)				

Fortsetzung:**7. 1 Studien über Kandidatengene im Zeitraum zwischen 1989 und 2004**

<u>Kandidatengen</u>	<u>Lokalisation</u>	<u>Autor</u>	<u>Jahr</u>	<u>Population</u>	<u>Studientyp</u>	
					<u>Assoziation</u>	<u>Kopplung</u>
		Beaty et al.	2001	USA		(-)
		Marazita et al.	2002	China		(-)
		Jugessur et al.	2003	Norwegen	(+)	
TGFβ1	19q13.1	Stein et al.	1995	USA, England		(-)
TGFβ2	1q41	Stein et al.	1995	USA, England		(-)
TGFβ2	1q41	Lidral et al.	1997	Philippinen	(-)	
TGFβ3	14q24	Lidral et al.	1997	USA		(-)
		Maestri et al.	1997	USA		(+)
		Lidral et al.	1998	USA		(+)
		Romitti et al.	1999	USA	(+)	
		Beaty et al.	2001	USA		(-)
		Mitchell et al.	2001	Dänemark	(+)	
		Scapoli et al.	2002	Italien		(+)
		Jugessur et al.	2003	Norwegen	(+)	
		Vieira et al.	2003	Lateinamerika	(+)	
VIM	10p13	Hecht et al.	1993			(-)
YAC	6p24.3	Davies et al.	1995		(+)	

(+) = signifikante Ergebnisse

(-) = nicht signifikante Ergebnisse

7. 2 Glossar

Adenin

Neben Cytosin, Guanin und Thymin ein Grundbaustein der DNA, auch Base genannt.

Allel

Bestimmte Ausprägung eines Genortes (Genlocus).

Annealing

Anlagerung eines Primers an den zu amplifizierenden DNA-Einzelstrang.

Assoziationsanalyse

Untersuchung einer möglicherweise veränderten Frequenz eines Allels bei Merkmalsträgern gegenüber Nichtmerkmalsträgern untersucht. Findet sich ein bestimmtes Allel statistisch signifikant gehäuft in der Gruppe der Merkmalsträger, kann dies auf einen pathogenetischen Zusammenhang zwischen dem Allel des betreffenden Gens und der Erkrankung hinweisen.

Basen

Grundbausteine der DNA/RNA: Adenin, Thymin, Cytosin, Guanin, Uracil. Verbunden mit einem Zucker und einem Phosphat nennt man sie Nukleotide.

Chromosom

Stäbchenförmige Faltung der DNA während der Teilungsphase von Zellen. Jede höhere Tier- oder Pflanzenart hat eine charakteristische Anzahl von Chromosomen (Mensch 2x22 plus X oder Y). In einer ruhenden Zelle gibt es keine Chromosomen, die DNA ist dann ein locker gewundener Faden.

Codon

Reihe von drei benachbarten Nukleotiden (Triplett) auf der DNA, die den Bau einer bestimmten Aminosäure codieren.

Crossing-over

Überkreuzung von homologen Chromosomen, die zum Bruch und zu einem Austausch von DNA-Bereichen führt.

Cytosin

Neben Adenin, Guanin und Thymin ein Grundbaustein der DNA, auch Base genannt.

Denaturierung

Trennung der DNA-Doppelhelix in Einzelstränge.

DNS/DNA

Desoxyribonucleinsäure (englisch: DNA). Bezeichnung für den chemischen Aufbau des Genoms. Dieses enthält die Information für sämtliche Körperformen, -funktionen und -eigenschaften. Die kleinste informative Einheit der DNA besteht aus drei Nukleotiden, sogenannten Triplets, die jeweils eine Aminosäure „codieren“.

Elongation

Synthese der komplementären DNA-Stränge durch die DNA-Polymerase.

Enzym

Protein, das bei chemischen Reaktionen als Katalysator dient.

Exon

Abschnitt eines Gens, das die Information zum Bau eines Protein enthält (Gegenstück zu Intron).

Expression

Aktivierung eines Gens, so dass mRNA gebildet (Transkription) und schließlich ein Protein produziert wird (Translation). Alle Gene für alle Eigenschaften eines Individuums sind in allen Zellen vorhanden. Aber nur bestimmte Gene werden in bestimmten Zellen angeschaltet oder „exprimiert“.

Familientrio

Gruppe, die aus einem Merkmalsträger und beiden Elternteilen besteht, wobei letztere das untersuchte Merkmal nicht aufweisen.

Gel-Elektrophorese

Eine der ältesten, aber nach wie vor wichtigsten Methoden, um die Reihenfolge von DNA-Fragmenten zu identifizieren. Die DNA durchwandert ein elektrisches Feld, das die Fragmente gemäß ihrer unterschiedlichen elektrischen Ladungen und Gewichte voneinander trennt. Es entsteht ein charakteristisches Bandenmuster.

Gen

Einheit auf der DNA, die für eine bestimmte Eigenschaft oder Merkmal steht. Gene bestehen aus codierenden (Exon) und nichtcodierenden Anteilen (Intron). Im Kern jeder Zelle befinden sich sämtliche Gene eines Individuums, es werden aber organ-/funktionsspezifisch nur bestimmte Gene exprimiert. Gene sind keine statischen Einheiten, sondern können sich verändern, etwa durch Mutation.

Genbank/Genbibliothek

Sammlung einzelner DNA-Abschnitte, wobei jeder Abschnitt in vielfacher Anzahl (kloniert) vorliegt.

genetischer Marker

polymorphe DNA-Sequenz, die von einem einzigen chromosomalen Locus abstammt und die für die genetische Kartierung genutzt werden kann.

Genkarte

Aufzeichnung der Position und damit Reihenfolge von Genen auf dem Chromosom. Physikalische Genkarte: Angabe in Basenpaaren (bp). Genetische Genkarte: Angabe in centiMorgan (cM).

Genom

Gesamte genetische Information eines Organismus.

Genort/Genlocus

Position eines Gens auf einem Chromosom.

Genprodukt

Protein, das von einem bestimmten Gen codiert wird.

Guanin

neben Adenin, Cytosin und Thymin ein Grundbaustein der DNA, auch Base genannt.

heterozygot

An einem Genlocus im diploiden Chromosomensatz befinden sich zwei verschiedene Allele.

hochkonserviert

Gene oder Basenfolgen, die sowohl bei frühzeitlichen Lebensformen als auch bei heutigen Lebewesen vorkommen. Man geht davon aus, dass diese Gene/Genprodukte deswegen unverändert blieben, weil sie sich in der Evolution besonders bewährt haben.

Homeodomäne

Domäne eines Proteins, die 60 Aminosäuren umfasst und mit diesen die Proteine an ihre Zielgene anbindet.

Homologe Chromosomen

Zwei sich weitestgehend in der Gestalt und potentiellen Funktion entsprechende Chromosomen, die jedoch beim Menschen genetisch nicht identisch sind (je eines stammt von der Mutter und vom Vater).

homozygot

An einem Genlocus im diploiden Chromosomensatz kommt das gleiche Allel vor.

Hybridisierung

Paarung einsträngiger DNA und RNA zu zweisträngigen DNA/DNA- bzw. DNA/RNA-Hybriden.

Intron

Abschnitt eines Gens, der keine Information zum Bau von Aminosäuren enthält (Gegenstück zu Exon). Introns können Regulationssignale oder andere Gene enthalten. Sie werden vor der Übersetzung in ein Protein entfernt.

Kandidatengen

Gen, dem eine Mitwirkung bei der Entstehung bestimmter Merkmale zugeschrieben wird.

Kopplung

Tendenz von Genen oder anderen DNA-Sequenzen an bestimmten Loci aufgrund ihrer räumlichen Nähe auf einem Chromosom gemeinsam vererbt zu werden. Kopplung zwischen zwei Loci liegt vor, wenn die Rekombinationsrate zwischen den Loci kleiner als 0.5 ist.

Kopplungsanalyse

Methode zur Lokalisation von Kandidatengen auf der Basis von Rekombination versus Nichtrekombination. Voraussetzung ist die Untersuchung von Familien mit Betroffenen in mehreren Generationen. Zur Analyse werden bei den Betroffenen und Gesunden in mehreren Generationen hochinformativ genetische Marker bestimmt. Liegt ein bestimmter genetischer Marker in räumlicher Nähe zum krankheitsverursachenden Gen, wird bei erkrankten Personen ein bestimmtes Allel dieses Markers überzufällig häufig nachweisbar sein.

Monogener Erbgang

Liegt vor, wenn ein einzelnes Gen für ein Merkmal verantwortlich ist.

Musterbildung

Dreidimensionale räumliche Anordnung von Organen und Geweben.

Nichtrekombination

Als Rekombination wird die gemeinsame Vererbung zweier Loci (Genorte) bezeichnet, d. h. ein Nachkomme besitzt an beiden Loci entweder die väterlicherseits und oder die mütterlicherseits erhaltenen Allele (bestimmte Ausprägung eines Genortes).

Nukleotid

Baustein der DNA, bestehend aus Base+Zucker+Phosphat.

Polygener Erbgang

Liegt vor, wenn mehrere Gene für ein Merkmal verantwortlich sind.

Polymerase-Kettenreaktion/PCR

Die Polymerasekettenreaktion ist ein spezielles technisches Verfahren zum schnellen Vervielfältigen von DNA-Abschnitten. Mit dieser Technik lassen sich winzige Mengen von DNA millionenfach identisch vermehren, so dass schließlich genügend Material für eine weiterführende Untersuchung bereitsteht.

Positionsinformation

Bildet die Basis für die Musterbildung und beruht auf lokalen Unterschieden in der Konzentration regulatorischer Proteine, die spezifische Gene aktivieren bzw. reprimieren.

Primer

Kurzer DNA- oder RNA-Abschnitt, der unter Laborbedingungen zur Amplifikation von DNA-Abschnitten dient. Der Primer besitzt eine bestimmte Basensequenz, so dass er sich an einen komplementären Abschnitt eines DNA-Einzelstranges anlagern kann.

Rekombination

Als Rekombination wird die getrennte Vererbung zweier Loci (Genorte) bezeichnet, d. h. ein Nachkomme besitzt an einem Locus das väterlicherseits und an einem anderen das mütterlicherseits erhaltene Allel (bestimmte Ausprägung eines Genortes).

Repetitive DNA

Wiederholung der immer selben Folge von wenigen Nukleotiden.

Restriktionsenzyme

Sie schneiden die DNA an bestimmten Stellen. Dabei entstehen verschieden lange DNA-Abschnitte.

Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus = RFLP

Gentechnische Methode, mit der man sehr große Genome kartieren kann.

Sequenz

Reihenfolge von Bausteinen, beispielsweise Basen einer DNA oder Aminosäuren eines Proteins.

transgene Organismen

Pflanzen oder Tiere, in deren Erbmaterial ein oder mehrere Gene eines anderen Organismus eingeschleust wurden.

Transkription

Bildung von mRNA an einem DNA-Einzelstrang.

Translation

Übersetzung der Information der mRNA in eine Abfolge von Aminosäuren.

Triplet

Reihe von drei bestimmten Nukleotiden, die den Bau einer bestimmten Aminosäure codieren, daher auch Codon genannt.

Trisomie

Vorkommen eines überzähligen, insgesamt dann dreifach vorkommenden (homologen) Chromosoms.

Thymin

neben Adenin, Cytosin und Guanin ein Grundbaustein der DNA, auch Base genannt. Die RNA besitzt statt Thymin die Base Uracil.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Michelle Schmidt
Geboren am: 20.02.1977 in Bergheim (Erft)
Familienstand: ledig
Wohnhaft in: 07743 Jena, Dornburger Str. 13

Schulbildung

09/ 1996 – 06/ 1999 Hermann Lietz-Schule Spiekeroog;
Abschluss: Abitur mit der Gesamtnote sehr gut (1,4)

Studium

10/ 1999 – 07/ 2001 Vorklinisches Medizinstudium an der Friedrich Schiller-
Universität Jena
10/ 2001 – 07/ 2004 Klinisches Medizinstudium an der Friedrich Schiller-
Universität Jena
10/ 2004 – 09/ 2005 Praktisches Jahr
10/ 2005 Approbation

Stipendium

04/ 2000 – 10/ 2005 Stipendiatin der Studienstiftung des deutschen Volkes

Beruflicher Werdegang

seit 12/ 2005 Assistenzärztin an der Klinik für Mund-, Kiefer- und
Gesichtschirurgie/Plastische Chirurgie der FSU Jena

Michelle Schmidt

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind, mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. Dr. S. Schultze-Mosgau

Prof. Dr. Dr. D. Schumann

Prof. Dr. Dr. P. Hyckel

Dr. M. Michael,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum, Unterschrift des Verfassers

Danksagung

Danken möchte ich allen, die durch ihre freundliche Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Insbesondere danke ich

- Herrn Prof. Dr. Dr. D. Schumann für die Überlassung des interessanten und aktuellen Themas, für seine fachliche Begleitung der Arbeit und die Vermittlung wichtiger Kontakte;
- Herrn Prof. Dr. Dr. S. Schultze-Mosgau für die Übernahme der Betreuung der Promotion, sachliche Kritik und die tatkräftige Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit;
- Herrn Prof. Dr. Dr. P. Hyckel für zahlreiche fachliche Gespräche;
- Frau Prof. Dr. Klein für die Möglichkeit die molekulargenetischen Untersuchungen im Labor des Institutes für Rechtsmedizin der FSU Jena durchzuführen;
- Herrn Dr. M. Michael für die fachlichen Hinweise auf seinem Gebiet und die Betreuung im Labor.

Allen Patienten und Kontrollpersonen bzw. deren Eltern danke ich für ihre Kooperation. Ferner möchte ich den MTAs aus dem Labor des Institutes für Rechtsmedizin R. Winnefeld, A. Matern und K. Schlegel danken. Herrn Dr. J. J. Linke danke ich ebenfalls sehr für seine Hilfe. Nicht zuletzt danke ich meinem Lebensgefährten Kajetan Klos für seine vielseitige Unterstützung.