

**Identifizierung, molekulare Analyse und  
funktionelle Charakterisierung von  
Genen, die an neuronaler Entwicklung und  
geistiger Behinderung beteiligt sind**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Kristine Karla Freude  
aus Berlin

April 2005

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Hans-Hilger Ropers
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Horst Kreß

Disputation am 24. August 2005

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>1</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
1.1 Identifizierung von menschlichen Krankheitsgenen	6
1.2 Identifizierung von Kandidatengenen für monogene Erkrankungen mittels Kopplungsanalysen	9
1.3 Pathologische Mutationen	11
1.4 Geistige Behinderung	16
1.5 Syndromale und nicht-syndromale geistige Behinderung	18
1.6 X-chromosomal vererbte geistige Behinderung (XLMR)	20
1.7 Identifizierung neuer Gene assoziiert mit nicht-syndromaler XLMR (NS-MRX)	29
1.8 Identifizierung von Kandidatengenen für monogene Erkrankungen mittels zytogenetischer Methoden	32
1.9 Ziel dieser Arbeit	35
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>37</b>
2.1 <b>Material</b>	<b>37</b>
2.1.1 Verwendete Chemikalien und Materialien	37
2.1.2 Kits	40
2.1.3 Medien	41
2.1.4 Antikörper	42
2.1.5 Puffer und Lösungen	42
2.1.6 Zelllinien	46
2.1.7 Vektoren	46
2.1.8 Primer und DHPLC-Bedingungen für die Mutationsanalyse von <i>FTSJ1</i> und	

<i>PQBP1</i>	47	
2.1.9	Primer für Expressionsanalysen	51
2.1.10	Primer für X-Inaktivierungsstudien	53
2.1.11	Primer für <i>in vitro</i> Mutagenese	53
2.1.12	Primer zur Klonierung von <i>FTSJ1</i> , <i>PQBP1</i> und <i>POU3F2</i> in verschiedene Expressionsvektoren	54
2.1.13	Primer für die Bruchpunktklonierung	56
2.1.14	Datenbanken	57
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>59</b>
2.2.1	Molekularbiologische Standardmethoden	59
2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion	60
2.2.3	Reverse-Transkription	60
2.2.4	Mutationanalyse mittels DHPLC	61
2.2.5	Analyse des X-Inaktivierungsstatus spezifischer Gene	62
2.2.6	Northern Blot	63
2.2.7	Southern Blot	64
2.2.8	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH)	64
2.2.9	Bruchpunktklonierung	65
2.2.10	Sequenzierung	66
2.2.11	<i>In vitro</i> Mutagenese	67
2.2.12	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	67
2.2.13	Immunoblot (Western Blot)	68
2.2.14	Transfektion von eukaryotischen Zellen mit Plasmiden	69
2.2.15	Immunfluoreszenz	70
2.2.16	Zellysate für die Immunopräzipitation	70
2.2.17	Proteinbestimmung nach Bradford	71
2.2.18	Koimmunpräzipitation von Proteinen	71
2.2.19	Komplementationsstudien in <i>S. cerevisiae</i>	72
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>75</b>
3.1	<b>Identifizierung von <i>Netrin G1 (NTNG1)</i> als autosomales Kandidatengen für das Rett-Syndrom (RTT)</b>	<b>75</b>
3.1.1	Patientin mit reziproker balancierter Translokation 46,XX,t(1;7)(p13.3;q31.3) und Rett Syndrom (RTT)	75

3.1.2	Physikalische Kartierung der Bruchpunkte auf den Chromosomen 1 und 7	77
3.1.2.1	Chromosom 7	77
3.1.2.2	Chromosom 1	79
3.1.3	Eingrenzung des Bruchpunktbereiches auf Chromosom 1 durch Southern Blot Analyse	81
3.1.4	Klonierung der Bruchpunkte auf dem derivativen Chromosom 1 und dem derivativen Chromosom 7	84
3.1.5	<i>In silico</i> Analyse der Bruchpunktregion mit dem <i>Netrin G1</i> Gen ( <i>NTNG1</i> )	89
3.1.6	Expressionsstudien der beiden Transkriptvarianten von <i>NTNG1</i>	91
3.1.7	<i>In silico</i> Analyse von <i>NTNG1</i> Proteinen	92
<b>3.2</b>	<b>Identifizierung und funktionelle Analyse von X-chromosomalen Genen, die eine Rolle bei geistiger Behinderung spielen</b>	<b>94</b>
3.2.1	Auswahl einer Region auf dem X-Chromosom für eine Mutationsanalyse	94
3.2.2	Auswahl der Gene für die Mutationsanalyse	95
3.2.3	Das <i>FTSJ Homolog 1</i> ( <i>FTSJ1</i> ) Gen	97
3.2.3.1	Beschreibung der klinischen Merkmale der Indexpatienten und der weiteren betroffenen Familienmitglieder, bei denen Mutationen im <i>FTSJ1</i> Gen nachgewiesen worden sind	97
3.2.3.2	Darstellung der verschiedenen Mutationstypen in <i>FTSJ1</i>	101
3.2.3.2.1	Mutationsanalyse von <i>FTSJ1</i> bei Familie MRX44	102
3.2.3.2.2	Mutationsanalyse von <i>FTSJ1</i> bei Familie P48	103
3.2.3.2.3	Mutationsanalyse von <i>FTSJ1</i> bei Familie A3	104
3.2.3.3	<i>In silico</i> Charakterisierung der <i>FTSJ1</i> Transkripte	105
3.2.3.4	<i>In silico</i> Charakterisierung des <i>FTSJ1</i> Proteins	110
3.2.3.5	Expressionsstudien von <i>FTSJ1</i> in humanen Geweben	111
3.2.3.6	Funktionelle Analyse der Mutation 655G→A bei Familie MRX44	113
3.2.3.7	Funktionelle Analyse der Mutation 196C→T in Familie P48	120
3.2.3.8	Funktionelle Analyse der Mutation IVS2+1delG in Familie A3	120
3.2.3.9	Komplementationsstudien in <i>S. cerevisiae</i> zur Identifizierung des Zielmoleküls des humanen <i>FTSJ1</i>	123
3.2.3.9.1	Komplementationsstudien mit dem <i>mrm2Δ</i> Stamm	124
3.2.3.9.2	Komplementationsstudien mit dem <i>spb1Δ/spb1</i> Stamm	127
3.2.3.9.3	Komplementationsstudien mit dem <i>trm7Δ</i> Stamm	129
3.2.4	Das <i>Polyglutamin Bindeprotein 1</i> Gen ( <i>PQBP1</i> )	135
3.2.4.1	Mutationen in <i>PQBP1</i> führen zu syndromaler und nicht-syndromaler geistiger Behinderung	135
3.2.4.2	<i>In silico</i> Analyse der humanen <i>PQBP1</i> Transkripte und der daraus resultierenden	

Proteine	139	
3.2.4.3	Untersuchung des X-Inaktivierungsstatus von <i>PQBP1</i>	142
3.2.4.4	Expressionanalysen der mutierten <i>PQBP1</i> Transkripte	144
3.2.4.5	Zelluläre Lokalisation der mutierten <i>PQBP1</i> Proteine	147
3.2.4.6	Zelluläre Lokalisation von <i>PQBP1</i> und <i>POU3F2</i> (Brn2)	150
3.2.4.7	Koimmunpräzipitation von <i>PQBP1</i> und <i>POU3F2</i>	152
3.2.4.8	Zelluläre Lokalisation der <i>PQBP1</i> 641insC Mutante	154
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>156</b>
<b>4.1</b>	<b><i>NTNG1</i> ein neues autosomales Kandidatengen für Rett Syndrom (RTT)</b>	<b>156</b>
4.1.1	Eine Patientin mit RTT, die Trägerin einer balancierten reziproken Translokation t(1;7)(p13.3;q31.3) ist	156
4.1.2	Analyse des Bruchpunktbereiches auf Chromosom 1	157
4.1.3	Analyse des Bruchpunktbereiches auf Chromosom 7	158
4.1.4	Potentielle Funktionen der <i>NTNG1</i> Isoformen	161
4.1.5	Mögliche pathologische Auswirkungen einer gestörten <i>NTNG1</i> Expression	164
4.1.6	Zusammenfassung und Ausblick für <i>NTNG1</i> als Kandidatengen für RTT	167
<b>4.2</b>	<b>Mutationen in <i>FTSJ1</i> führen zu nicht-syndromaler geistiger Behinderung</b>	<b>169</b>
4.2.1	Funktionsverlust von <i>FTSJ1</i> in Familie P48 und Familie A3	169
4.2.2	Abweichende Proteinkonformation von <i>FTSJ1</i> in Familie MRX44	170
4.2.3	Mögliche Zielmoleküle, die von <i>FTSJ1</i> methyliert werden könnten	173
4.2.4	Zusammenfassung und Ausblick für <i>FTSJ1</i>	178
<b>4.3</b>	<b>Mutationen in <i>PQBP1</i> führen zu nicht-syndromaler und spezifischer geistiger Behinderung</b>	<b>180</b>
4.3.1	Mutationen in <i>PQBP1</i> und ihre Auswirkungen auf Transkriptionsebene	180
4.3.2	C-terminal trunkierte <i>PQBP1</i> Proteinvarianten	181
4.3.3	Interaktion zwischen <i>PQBP1</i> und <i>POU3F2</i> (Brn2)	184
4.3.4	Unterschiedliche Mutationen in <i>PQBP1</i> führen zu nicht-syndromaler und syndromaler, X-chromosomal gekoppelter, geistiger Behinderung	185
4.3.5	Zusammenfassung und Ausblick für <i>PQBP1</i>	188
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>190</b>

<b>6</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>194</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>197</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>227</b>
<b>9</b>	<b>PUBLIKATIONEN</b>	<b>229</b>
<b>10</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>230</b>
<b>11</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>233</b>
<b>12</b>	<b>ERKLÄRUNG</b>	<b>234</b>
<b>13</b>	<b>ANHANG</b>	<b>235</b>

# 1 Einleitung

Eines der Hauptanliegen der Humangenetik besteht darin, umfassende Informationen über Struktur und Funktion des Erbmaterials des Menschen zu sammeln. Mittlerweile ist durch die Arbeit des *Human Genome Project* das humane Genom nahezu vollständig kartiert, und die meisten exprimierten Sequenzen und bekannten Gene sind lokalisiert, wobei deren Funktionen größtenteils noch unbekannt beziehungsweise unzureichend erforscht sind. Deshalb wird in den folgenden Jahren der physikalischen Anordnung der Gene im menschlichen Genom eine Analyse der jeweiligen Genfunktionen folgen. Von besonderem Interesse sind hierbei Gene, die mit spezifischen Syndromen oder Krankheitsbildern assoziiert werden können. Durch die Identifizierung solcher krankheitsassoziiierter Gene kann man ein besseres Verständnis der molekularen und physiologischen Grundlagen von Krankheiten erhalten. Dadurch können sich neue oder verbesserte Möglichkeiten in der Diagnostik entwickeln, und langfristig könnte dies zu erfolgversprechenden Therapieansätzen für genetisch bedingte Erkrankungen führen.

## 1.1 Identifizierung von menschlichen Krankheitsgenen

Es wird vermutet, daß das menschliche Genom ungefähr 20.000 bis 25.000 protein-kodierende Gene umfaßt und nicht wie bisher angenommen 30.000 bis 40.000 (Human Genome Sequencing Consortium, 2004). Höchstwahrscheinlich werden nicht alle Gene mit Krankheitsbildern assoziierbar sein, da viele Gene eine zentrale Rolle während der Embryonalentwicklung spielen und ihr Funktionsverlust letal ist. Bei anderen Genen besteht die Möglichkeit der funktionellen Redundanz, so daß keine Veränderung des Phänotyps auftritt. Neben diesen protein-kodierenden Genen existiert vermutlich die doppelte Anzahl von „Genen“, welche für sogenannte *non-messenger* RNAs kodieren (Eddy, 2001). Diese RNAs werden nicht in Proteine translatiert, sondern agieren beispielsweise als regulatorische *antisense* RNAs und beeinflussen die Transkriptionseffizienz entsprechender *sense* mRNAs (Wutz et al., 1997). Sie können allerdings auch an die mRNA binden und posttranskriptionelle Ereignisse, wie beispielsweise Spleißen (Munroe



et al., 1991), RNA Transport (Okano et al., 1991) und die Stabilität von mRNA im Zytoplasma (Hildebrandt und Nellen 1992), beeinflussen. Mutationen in solchen *non-messenger* RNAs konnten z.B. bei Patienten mit spinozerebellarer Ataxie Typ 8 (*SCA8*) nachgewiesen werden. Vermutlich reguliert die *antisense* RNA die Expression des *KLHL1* (Kelch-like 1) Gens (Nemes et al., 2000), das als Aktin-bindendes Protein beschrieben worden ist (Kim et al., 1999).

Bei genetische verursachten Erkrankungen kann man grundsätzlich zwischen monogenen, polygenen, multifaktoriellen und chromosomalen Ursachen unterscheiden.

Monogene Erkrankungen werden durch Defekte in einem einzelnen Gen verursacht. Die häufigsten monogenen Erkrankungen sind die cystische Fibrose (CF) (Inzidenz: 1:2.000) und die Muskeldystrophie Typ Becker (BMD) und Duchenne (DMD) (Inzidenz: 1:3.500).

CF wird durch Mutationen im *CFTR* Gen (Cystic-Fibrosis-Transmembrane-Conductance Regulator) verursacht, das auf Chromosom 7q31.2 lokalisiert ist (Park et al., 1987). Liegt bei dieser progredienten Erkrankung das Protein in einer mutierten Form vor, kommt es zu einem gestörten Elektrolyt- und Wassertransport in der Zellmembran (Santis et al., 1990).

Die Muskeldystrophien vom Typ Becker und Duchenne werden X-chromosomal vererbt, so daß nur männliche Träger der Mutation erkranken. Als Muskeldystrophie bezeichnet man einen krankhaft fortschreitenden Schwund von Muskelgewebe. Die genetischen Ursachen beider Erkrankungen sind Mutationen im Dystrophin Gen. Dystrophin ist ein Eiweiß, welches wichtig für den Stoffwechsel der Muskeln wichtig ist.

Weitaus komplizierter ist die Situation bei polygenen Krankheiten, wie z.B. bei Alzheimer, Schizophrenie oder Diabetes Typ 1 und 2. Eine Phänotyp-Genotyp-Korrelation bei einer polygenen Erkrankung herzuleiten, ist wesentlich schwieriger als bei einer monogenen Krankheit.

Bei den multifaktoriellen Erkrankungen üben verschiedene Faktoren wie genetische Veranlagung, Umweltfaktoren und im Laufe des Lebens erworbene Veränderungen des genetischen Materials, einen Einfluß auf die Krankheitsentwicklung aus. Zu den multifaktoriell bedingten Erkrankungen zählen beispielsweise Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Krebs.

Darüber hinaus können genetisch bedingte Erkrankungen durch Chromosomenaberrationen, Störungen der Chromosomenzahl oder –struktur, verursacht werden.

Die nachfolgenden Kapitel und Ergebnisse der vorliegenden Arbeit beschäftigen sich ausschließlich mit Kandidatengen für monogene Erkrankungen.

Generell gibt es zwei häufig verwendete Methoden zur Identifizierung von krankheitsassoziierten Kandidatengen. Das ist einerseits die funktionelle Klonierung und andererseits die positionelle Klonierung.

Bei der funktionellen Klonierung versucht man ein unbekanntes Krankheitsgen basierend auf seiner biochemischen Funktion zu identifizieren. Nach der Isolation des betreffenden Proteins kann man dieses sequenzieren und verschiedene Oligonukleotidkombinationen für die gering degenerierten Abschnitte der betreffenden Aminosäuresequenz synthetisieren. Mittels dieser Oligonukleotide können anschließend spezifische cDNA Klone aus entsprechenden Banken isoliert werden, mit denen man dann genomische Banken untersuchen kann. Eine andere Möglichkeit ist die Herstellung eines spezifischen Antikörpers (AK) gegen das isolierte Protein. Für diese Analyse werden verschiedene cDNA Klone aus entsprechenden Geweben in Expressionsvektoren kloniert, und der spezifische AK sollte dann das Protein, translatiert vom gesuchten cDNA Klon detektieren.

Bei der positionellen Klonierung ist lediglich die genomische Region bekannt, in der das krankheitsassoziierte Gen lokalisiert ist. Die Eingrenzung dieser genomischen Region kann auf verschiedene Arten durchgeführt werden.

Am häufigsten verwendet man Kopplungsanalysen, bei denen die Segregation von polymorphen Markern mit dem pathologischen Phänotyp analysiert werden (s. auch Kapitel 1.2). Andere Möglichkeiten der positionellen Klonierung stellen zytogenetische Analysen von chromosomale Anomalien wie Deletionen oder chromosomale Translokationen dar (s. auch Kapitel 1.8).

## 1.2 Identifizierung von Kandidatengenen für monogene Erkrankungen mittels Kopplungsanalysen

Eine Möglichkeit monogene Krankheitsursachen zu bestimmen ist die genetische Kartierung mittels Kopplungsanalyse in Familien mit einem oder mehreren betroffenen Patienten. Sie beruht darauf, daß man versucht herauszufinden, wie häufig zwei Loci durch die meiotische Rekombination voneinander getrennt werden. Diese Rekombinationshäufigkeit, auch als Rekombinationsfrequenz bezeichnet, legt den Abstand zwischen zwei Loci fest (gemessen in centiMorgan (cM)). Je näher zwei Gene beieinander liegen, desto seltener werden sie durch meiotische Rekombination voneinander getrennt (White and Lalouel, 1988). Diese Gene werden nicht rekombiniert, d. h. gekoppelt als sogenannter Haplotyp an die Nachkommen weitergegeben.

Für die Kopplungsanalysen von Familien mit Erbkrankheiten benötigt man sogenannte Marker, die sich über das gesamte Genom verteilen. Diese genetischen Marker sind mendelnde Merkmale und müssen einen hohen Grad an Polymorphismen aufweisen, damit eine zufällig ausgewählte Person heterozygot für diesen DNA Abschnitt ist. Das Gen mit dem spezifischen Defekt, das für die Erbkrankheit verantwortlich sein sollte, wird bei allen betroffenen Mitgliedern der Familie mit einem bestimmten Marker gekoppelt vererbt. Anfangs dienten zur Kartierung nur eingeschränkt brauchbare Marker, wie z. B. verschiedene Blutgruppenantigene, die allerdings nur in geringer Anzahl im Genom vorkommen. Dies änderte sich, nachdem Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLPs) als Marker eingesetzt wurden. Mit Hilfe dieser RFLPs war es erstmals möglich, eine genetische Karte des humanen Genoms zu erstellen (Donis-Keller et al., 1987). Allerdings hatten diese Marker nur einen geringen Informationsgehalt, da die meisten RFLPs oft nur zwei Allele aufweisen (Nakamura et al., 1987). Dasselbe Prinzip von Restriktionsverdau und Southern Blot, das bei der Kartierung mit RFLPs verwendet wurde, wurde auch bei der nächsten Generation von Markern verwendet, den VNTR-Markern (variable number of tandem repeats) (Nakamura et al., 1987). Diese Repeats setzen sich aus einer variablen Anzahl sich tandemartig wiederholender DNA-Sequenzen

zusammen. Sie sind zwar hoch polymorph aber hauptsächlich in Zentromer- und Telomerregionen lokalisiert, so daß sie in vielen Fällen nicht hilfreich waren (Vergnaud et al., 1989). Daraufhin verwendete man sogenannte Mikrosatelliten oder STR-Marker (Short Tandem Repeats). Es wurde festgestellt, daß diese repetitiven DNA-Sequenzen bei verschiedenen Individuen variabel sind und mittels PCR Analyse einfach nachweisbar sind (Tautz, 1989; Litt und Luty, 1989). Momentan sind sogenannte „Single Nucleotide Polymorphisms“ (SNPs) die Marker der Wahl, da sie sehr häufig sind, über das gesamte Genom verteilt vorkommen (Wang et al., 1998) und ebenfalls mittels PCR Analysen nachgewiesen werden können.

Kopplungsanalysen beruhen auf dem Prinzip, daß Geschwisterkinder oder andere Familienangehörige mit gleichen Phänotypen in der genomischen Region, in der ein „Krankheitsgen“ liegt, die gleiche, genetisch gekoppelte Rekombinationsvariante geerbt haben sollten. Somit bestände eine Kopplung zwischen dem Phänotyp und dieser genomischen Region. Die zugrunde liegende Annahme bei der Kopplungsanalyse ist, daß bei einem Crossing Over zwischen zwei Loci eine maximale Rekombinationsfrequenz von 50% vorliegt. Dies liegt daran, daß bei einem Crossing Over immer nur zwei der vier Chromatiden beteiligt sind. Außerdem ergibt sich auf Grund der freien Rekombinierbarkeit von Loci auf unterschiedlichen Chromosomen ebenfalls eine maximale Rekombinationsrate von 50%. Darüber hinaus hat man festgestellt, daß ein *Crossing Over* nicht mit gleicher Wahrscheinlichkeit an jeder Stelle im Genom zu erwarten ist. Stattdessen wurde beobachtet, daß es sogenannte *hot spots of recombination* gibt, in denen Rekombinationen gehäuft auftreten (Bryda et al. 1992). Außerdem finden Doppel-*Crossing Overs* wesentlich seltener statt als statistisch zu erwarten wäre, denn ein schon vorhandenes *Crossing Over* führt dazu, daß weitere *Crossing Overs* verhindert werden. Dieses Phänomen ist auch als Chiasma-Interferenz bekannt (Ott, 1991).

Deswegen verwendet man heutzutage die Zwei-Marker-Kartierung, bei der der sogenannte Lod-Wert das statistische Maß für die Kopplung zweier Genloci ist. Bei dieser Methode wird die Wahrscheinlichkeit, daß die beobachtete Segregation von genetischen Merkmalen in einer Familie auf freier Rekombination zwischen den beteiligten Loci beruht, mit der Wahrscheinlichkeit für die beobachtete Konstellation unter der Annahme verglichen, daß die relevanten Gene gekoppelt

sind. Der daraus resultierende Wahrscheinlichkeitsquotient (der „odds“ für die Kopplung) wird als dekadischer Logarithmus (Log of Odds: Lod) angegeben. Ein Lod-Wert kleiner als -2 schließt Kopplung zweier Loci aus, und ein Lod-Wert größer als +3 gilt als Beweis für Kopplung. Die Wahrscheinlichkeit, daß zwei X-chromosomale Loci gekoppelt sind, ist viel größer als für beliebige Loci unbekannter Lokalisation, weshalb ein Lod von +2 für ausreichend angesehen wird, um Kopplung zu beweisen. Mit dieser Methode kann man auch Kopplungsanalysen in Familien durchführen, bei denen keine 100%ige Penetranz des Phänotyps vorliegt, oder die Phase unklar ist, also die Zuordnung der Allele zu einzelnen Chromosomen oder Haplotypen. Darüber hinaus kann man die Ergebnisse verschiedener Familien zu einem Gesamt Lod-Wert kombinieren.

Neben der Zwei-Marker-Kartierung wird immer häufiger die Multimarker-Kartierung verwendet. Mit dieser Methode lassen sich Kopplungsanalysen effizienter durchführen, wenn man gleichzeitig die Daten von mehr als zwei Loci analysieren möchte. Darüber hinaus ist der Informationsgehalt einzelner Marker innerhalb einer Familie oftmals unterschiedlich. Die gleichzeitige Analyse der Marker relativiert dieses Ungleichgewicht. Der wichtigste Unterschied zur Zwei-Marker-Kartierung besteht darin, daß die Reihenfolge der Marker und ihre genetischen Abstände berücksichtigt werden müssen. Diese Kartierungen werden von speziellen Computerprogrammen analysiert.

Kopplungsanalysen mit mehreren Familien, deren betroffene Familienmitglieder einen ähnlichen Phänotyp aufweisen, sind geeignet, um die Lokalisierungsdaten eines krankheitsassoziierten Gens sicher einer genomischen Region zuzuordnen, bevor mit einer Mutationsanalyse des betroffenen Gens begonnen wird. Dies ist sinnvoll, wenn die einzelnen Familien zu klein sind und man davon ausgehen kann, daß es sich um Defekte desselben Gens handelt.

### **1.3 Pathologische Mutationen**

Prinzipiell kann man drei verschiedene Mutationsarten unterscheiden, nämlich die Basensubstitution, bei der ein Nukleotid durch ein anderes ersetzt wird, die Deletion, bei der ein oder mehrere Nukleotide aus der Sequenz entfernt werden, und die Insertion, bei der ein oder mehrere zusätzliche Nukleotide in die Sequenz

eingefügt werden. Solche Sequenzveränderungen können exogene Ursachen haben, wie Mutagene (z.B. radioaktive Strahlung), aber auch endogene Ursachen, z.B. DNA-Replikationsfehler.

Bei einer Basensubstitution muß man zwischen einem kausativem und einem nicht kausativen Austausch von Nukleotiden unterscheiden. Ein kausativer Austausch führt zu einer veränderten Aminosäure des Genproduktes, während das Genprodukt bei einer nicht kausativen oder stillen Mutation unverändert bleibt. Grundlage für die Existenz von stillen Mutationen ist die Tatsache, daß der genetische Kode degeneriert ist, also eine Aminosäure von mehreren Tripletts kodiert wird. Allerdings betrifft dies nur die letzte Position des Tripletts, bei der eine genaue Basenpaarung des Antikodons mit der tRNA nicht notwendig ist. Dieses Prinzip bezeichnet man als sogenannte *Wobble Hypothese* (Crick, 1966). Die *Wobble Hypothese* erklärt gleichzeitig, warum es nicht 61 sondern nur 48 verschiedene Antikodons gibt (Alberts et al., 2002). Nukleotidaustausche an der dritten Position des Tripletts sind oft nicht kausative Austausche. Nukleotidaustausche an der ersten oder zweiten Stelle des Tripletts dahingegen führen häufig zu einer veränderten Aminosäure. Diese Veränderungen müssen nicht zwangsläufig pathologisch sein. Wird jedoch eine saure Aminosäure gegen eine basische Aminosäure ausgetauscht, oder eine negativ geladene Aminosäure gegen eine positiv geladene, so kann es zu einer Konformationsänderung beziehungsweise einer veränderten Bindungsaffinität des Proteins kommen, was letztendlich eine veränderte Proteinfunktion oder einen Funktionsverlust zur Folge haben kann (Bolhuis et al., 1993; Spacey et al., 2004,).

Darüber hinaus gibt es auch stille Mutationen, die bei verschiedenen Individuen einer Population auftreten und zu keiner Änderung einer Aminosäure führen. Nukleotidaustausche treten allerdings wesentlich häufiger in den nichtkodierenden Bereichen des Genoms, also in Introns und Pseudogenen auf. Darüber hinaus gibt es auch Nukleotidaustausche, die zu einer veränderten Aminosäure führen, welche jedoch die Funktion des Proteins nicht pathologisch beeinflusst. Diese nicht pathologischen Nukleotidaustausche werden unter dem Sammelbegriff Polymorphismen zusammengefaßt.

Des Weiteren sind verschiedene Substitutionsmutationen beschrieben worden, die Spleißdonor- oder Spleißakzeptorstellen zerstören. Prinzipiell können solche Formen der Mutation zwei Effekte verursachen. Eine Folge solcher Mutationen ist,

daß ein Exon beim Spleißen übersprungen wird. Diese Form von Mutation kann dazu führen, daß wichtige funktionelle Domänen des Proteins teilweise oder auch gänzlich fehlen. Aber auch wenn keine funktionellen Domänen zerstört sind, kann es zu einer Konformationsänderung des Proteins kommen, welche wiederum eine Veränderung der Funktion zur Folge haben kann. Dadurch können beispielsweise bestimmte Regionen des Proteins, die für spezifische Interaktionen mit anderen Proteinen wichtig sind, nicht mehr zugänglich sein. Die andere Möglichkeit besteht darin, daß ein Nukleotidaustausch an der Spleißakzeptor- oder Spleißdonorstelle zur Aktivierung einer kryptischen Spleißstelle im Intronbereich führt. Diese kryptischen Spleißstellen sind den konservierten Spleißstellen ähnlich, werden aber normalerweise nicht vom Spleißsystem benutzt. Durch die Aktivierung einer solchen kryptischen Spleißstelle kommt es zur Inkorporation von Teilen intronischer Sequenzen. Diese Art von Mutation kann drei unterschiedliche Folgen haben. Zum einen kann die Insertion der Intronsequenz dem Leseraster konform stattfinden, dann werden zusätzliche Aminosäuren in das resultierende Protein eingebaut. Diese Modifikation des resultierenden Proteins kann dadurch entweder toxisch sein, eine veränderte Interaktion mit anderen Proteinen zeigen, oder aber eine völlig neue Funktion aufweisen. Zum anderen besteht aber auch die Möglichkeit, daß die Modifikation an einer Stelle des Proteins auftritt, die keine Veränderung seiner Funktionalität hervorruft.

Eine weitere Möglichkeit einer Spleißstellenmutation besteht darin, daß das gesamte Intron wie eine exonische Sequenz abgelesen und komplett in die resultierende mRNA eingebaut wird. Auch hier ist es wichtig, ob es zu einer Leserasterverschiebung kommt und, wenn dies der Fall ist, an welcher Stelle das vorzeitige Stopkodon liegt. Wird das Intron dem Leseraster konform eingebaut, kann es wieder zur Veränderung von funktionellen Domänen kommen, beziehungsweise zu Konformationsänderungen des Proteins mit entsprechenden Funktionsverlusten oder Funktionsgewinnen (Strachan und Read, 1996).

Eine spezielle Form der Nukleotidsubstitution ist die sogenannte Nonsense-Mutation. Bei dieser Mutation wird ein Nukleotid so ausgetauscht, daß ein Stopkodon entsteht. Auf Grund dieses Stopkodons hört die Translation an dieser Stelle der Sequenz auf, und es kommt zu einem trunkierten Protein. Je nachdem an welcher Stelle der Sequenz diese Mutation auftritt, kommt es zu einem Abbau des Transkriptes durch *Nonsense mediated mRNA decay* (NMD). Transkripte,

deren Stopkodons auf Grund von Nonsense Mutationen mehr als 50 Bp stromaufwärts vom letzten Intron-Exon-Übergang liegen, werden durch den NMD Mechanismus erkannt und abgebaut (Hentze und Kuloznik, 1999). Dieser Mechanismus dient der Zelle zum Schutz vor trunkierten und potentiell toxischen Proteinen. Ist das betroffene Gen auf dem X-Chromosom lokalisiert, kommt es bei männlichen Betroffenen meistens zu einem Funktionsverlust dieses Gens. Bei weiblichen Individuen ist dies durch das Phänomen der X-Inaktivierung etwas komplexer. Durch die Inaktivierung eines X-Chromosoms wird gewährleistet, daß weibliche Individuen die gleiche funktionelle Gendosis wie männliche Individuen besitzen. Das inaktivierte X-Chromosom entwickelt sich zum sogenannten Barr-Körperchen (Barr und Carr, 1961) Normalerweise ist diese Inaktivierung zufällig. Gibt es jedoch in einem X-chromosomalen Gen eine Mutation, die einen negativen Einfluß auf die Genfunktion ausübt, dann kann es zu einer sogenannten schiefen X-Inaktivierung kommen. Bei der schiefen X-Inaktivierung findet keine zufällige Inaktivierung mehr statt. Vielmehr wird ein X-Chromosom präferentiell inaktiviert. Dieses Phänomen wurde erstmalig bei Konduktorinnen des Fragilen X Syndroms beschrieben. Bei einigen Trägerinnen der Mutation ist der pathologische Phänotyp weniger stark ausgeprägt oder gar nicht vorhanden, da die Mutation zu einer präferentiellen X-Inaktivierung zu Gunsten des nicht mutierten X-Chromosoms führt (Heine-Suner et al., 2003). Eine weitere Möglichkeit, daß bei Frauen ein gemäßiger pathologischer Phänotyp auftritt, betrifft die Mutation von Genen, die der X-Inaktivierung entkommen. Gene, die diesem Mechanismus entkommen zeigen eine geringere Methylierung im Bereich ihrer Promotoren, verglichen mit Genen die dem Mechanismus unterliegen (Fillipova et al., 2005). Darüber hinaus zeigen Gene die der X-Inaktivierung entkommen Unterschiede bei der zeitlichen Koordinierung der Replikation und eine veränderte Methylierung der Histone (Disteche et al., 2002). Eine Mutation in einem solchen Gen würde dazu führen, daß sowohl die mutierte als auch die nicht mutierte Kopie des Gens transkribiert wird. Dies hätte zur Folge das 50% des Genproduktes normal wäre und die Ausprägung des pathologischen Phänotyps, im Vergleich zu einem männlichen Träger der gleichen Mutation, schwächer ausgeprägt sein kann (Brown and Greally, 2003).



Prinzipiell ist auf Grund der zufälligen Inaktivierung des X-Chromosoms ein pathologischer Phänotyp bei X-chromosomalen Mutationen bei weiblichen Individuen meist geringfügiger ausgeprägt.

Nonsense-Mutationen, die autosomale Gene betreffen, müssen nicht unbedingt einen pathologischen Phänotyp verursachen, da oftmals die Funktion des nicht mutierte Allels auf dem homologen Chromosom ausreicht. Dieses Phänomen kann man bei vielen autosomal rezessiven Erkrankungen beobachten. Als Beispiel kann man hier das Tay Sachs Syndrom anführen. Das Tay Sachs Syndrom wird durch Mutationen im *Hexosaminidase A* Gen (*HEXA*) verursacht, die allerdings im homozygoten Zustand vorliegen müssen (Myerowitz und Costigan, 1988). Es kann auch zu einer sogenannten Haploinsuffizienz kommen, bei der 50% des Proteins nicht ausreichend sind, um die entsprechende Funktion des Proteins auszuüben. Ein Beispiel hierfür ist *SOX9*: auch wenn nur ein Allel von der Mutation betroffen ist kommt es zum Krankheitsbild der kampomelen Dysplasie (Wagner et al., 1994).

Neben den Substitutionen treten auch Deletionen oder Insertionen von Nukleotiden auf. Meistens führen Deletionen und Insertionen zu einer Verschiebung des offenen Leserasters. Diese Verschiebung resultiert dann oft in der Bildung eines vorzeitigen Stopkodons. Prinzipiell können solche Leserasterverschiebungen entweder zu einem C-terminalen trunkierten Protein führen oder zum Abbau des Transkripts durch NMD. Auch bei diesen Mutationen ist ausschlaggebend, ob das Gen X-chromosomal oder autosomal lokalisiert ist und der Träger der Mutation männlich oder weiblich ist. Demzufolge kommt es entweder zu einem Funktionsverlust, zu Haploinsuffizienz oder zu keinem pathologischen Phänotyp.

Es gibt aber auch Insertionen, bei denen Triplets inseriert werden. Diese Insertionen führen nicht zu einer Leserasterverschiebung, sondern die normale Aminosäuresequenz wird entsprechend der Insertion um eine oder mehrere Aminosäure verlängert. Ein Beispiel hierfür ist das *Huntingtin* Gen. Die Expansion eines CAG Triplets im kodierenden Bereich des Gens führt zum Funktionsverlust des translatierten Huntingtin Proteins. Pathogen ist diese Mutation, wenn ein kritischer Wert der Triplettanzahl überschritten wird. Der pathologische Phänotyp wird wahrscheinlich durch Aggregation des mutierten Proteins verursacht (Walling et al., 1998).

Alle diese minimalen Veränderungen im Genom sind mit den zytogenetischen Methoden nicht nachweisbar (siehe Kapitel 1.8) und müssen deswegen über sogenannte Kopplungsanalysen innerhalb der betroffenen Familien nachgewiesen werden (s. Kapitel 1.2).

## 1.4 Geistige Behinderung

Laut Internationaler Klassifikation der Krankheiten (International Classification of Disease: ICD) wird geistige Behinderung als ein Zustand verzögerter oder unvollständiger Entwicklung von geistigen Fähigkeiten definiert. Besonders betroffen sind die Fähigkeiten, die während der Entwicklung bis zum 18. Lebensjahr erworben werden, wie Kognition, Sprache, motorische und soziale Fähigkeiten. Geistige Behinderung kann allein auftreten oder zusammen mit anderen Symptomen. Generell überprüft man den intellektuellen Status einer Person mit standardisierten Intelligenztests, wie beispielsweise dem Raven-Test und dem Hamburg-Wechsler-Intelligenztest, die dem jeweiligen Alter der Versuchsperson angepaßt sind. Der Hamburg-Wechsler-Intelligenztest ist ein Verfahren zur Messung der allgemeinen Intelligenz, die bestimmt ist als die Fähigkeit, sinnvoll zu handeln, vernünftig zu denken und sich wirkungsvoll mit der Umwelt auseinander zu setzen. Er untergliedert sich in einen sprach- und in einen handlungsbezogenen Teil. Der Raven-Test ist dagegen ein sogenannter progressiver Matrizen-Test, der in erster Linie das Erfassen abstrakter Muster, das Herstellen von Beziehungen zwischen Einzelelementen geometrischer Figuren und die Fähigkeit zum systematischen Denken prüft. Im Gegensatz zum Hamburg-Wechsler-Intelligenztest erfaßt der Raven-Test die sprachfreien, intellektuellen Fähigkeiten. Beide Testverfahren dienen der Ermittlung eines spezifischen Intelligenzquotientens (IQ) Wertes. Liegt der IQ Wert unter 70, dann spricht man von Intelligenzminderung. Je niedriger der IQ Wert, desto ausgeprägter ist die geistige Einschränkung (Tabelle 1)

**Tabelle 1: Einteilung der geistigen Behinderung**

<b>Grad der Behinderung</b>	<b>Intelligenzquotient</b>
Leichte geistige Behinderung	50-70
Moderate geistige Behinderung	35-50
Schwere geistige Behinderung	20-35
Sehr schwere geistige Behinderung	< 20

Diese Bemessung der geistigen Behinderung mittels Intelligenztest ist nur bei leicht oder moderat geistig behinderten Personen anwendbar. Bei schwererer geistiger Behinderung ist die Durchführung der Tests unmöglich, und die Zuordnung des Grades der Behinderung erfolgt durch Einstufung zu bestimmten kindlichen Entwicklungsphasen. Darüber hinaus werden bei der Diagnose der geistigen Behinderung stets zusätzliche Faktoren berücksichtigt, die das Verhalten im täglichen Leben berücksichtigen. Dies sind das Kommunikationsverhalten, die Selbstversorgung, die Wohnsituation, das Sozialverhalten, die Benutzung der Infrastruktur, die Fähigkeit zur Selbstbestimmung, die Sorge um die eigene Gesundheit und Sicherheit, schulische Grundausbildung und die Freizeitgestaltung. Zusätzlich zu der substantiellen Einschränkung der intellektuellen Fähigkeiten müssen für die Diagnose geistige Behinderung mindestens zwei der oben genannten Bereiche des täglichen Lebens ebenfalls von Einschränkungen betroffen sein (American Psychiatric Association: [www.aamr.org](http://www.aamr.org)). Insgesamt sind ungefähr 2-3% der Bevölkerung von geistiger Behinderung betroffen (Chelly und Mandel, 2001). Die Ursachen für geistige Behinderung sind vielseitig und können in fünf Kategorien eingeteilt werden (s. Tabelle 2).

**Tabelle 2: Ursachen von geistiger Behinderung**

<b>Kategorie</b>	<b>Ursache</b>
traumatische Einwirkungen	z.B.: Gehirnblutungen, Sauerstoffmangel und schwere Kopfverletzungen
pränatale und postnatale Infektionen	z.B.: Röteln, Enzephalitis, Meningitis, Cytomegalieviren, Toxoplasmose, Listeriose und HIV Infektionen
Genetische Ursachen	z.B.: Chromosomen Anomalien: numerische (z.B. Down Syndrom) und strukturelle Chromosomen Anomalien (z.B. balancierte Translokationen) Mutationen in einzelnen Genen: Rett-Syndrom und die Phenylketonurie (eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung, die zu einer Inaktivierung des Abbaus von Phenylalanin führt)
Umweltfaktoren und Ernährung	z.B.: Armut, schlechte soziale Verhältnisse und Unterernährung
Toxine	Alkohol und Drogen

## 1.5 Syndromale und nicht-syndromale geistige Behinderung

Bei der geistigen Behinderung unterscheidet man syndromale und nicht-syndromale Formen. Die syndromale geistige Behinderung ist charakterisiert durch das Auftreten von zusätzlichen dysmorphen, metabolischen oder neurologischen Symptome zusätzlich zur geistigen Behinderung. Dem gegenüber ist bei der nicht-syndromalen geistigen Behinderung die eingeschränkten, intellektuellen Fähigkeiten das einzige phänotypische Merkmal (Gecz und Mulley, 2000).

Ein Beispiel für syndromale geistige Behinderung ist das Coffin-Lowry Syndrom. Patienten mit dieser Erkrankung zeigen neben mentaler Retardierung, Minderwuchs, progrediente Skelettanomalien (Kyphoskoliose, Pectus carinatum oder excavatum) und charakteristische faziale Dysmorphien. Coffin-Lowry

Syndrom wird verursacht durch Mutationen im *RSK2* (*ribosomal S-6 kinase 2*) Gen (Trivier et al., 1996). Es agiert möglicherweise als Proteinkinase, die über Phosphorylierung CREB (*cAMP response element binding protein*) aktiviert (Harum et al., 2001).

Im Gegensatz dazu sind bei der nicht-syndromalen geistigen Behinderung keine zusätzlichen pathologischen Merkmale vorhanden. Das erste Gen, das als Ursache für nicht-syndromale geistige Behinderung identifiziert wurde, war das *Fragile Mental Retardation 2* Gen *FMR2* (Gecz et al., 1996). Zuvor wurde bereits das *FMR1* Gen als Ursache des Martin Bell-Syndroms, auch als Fragiles X-Syndrom bezeichnet, identifiziert. Die X-chromosomalen Bereiche in denen *FMR1* und *FMR2* lokalisiert sind, zeigen in zytologischen Präparaten, unter Verwendung eines Mediums ohne Folat, bei Mutationen in einem der beiden Gene eine Konstriktion und Instabilität des X-Chromosoms. Auf Grund dieser Tatsache konnte *FMR2* als ein weiteres Gen für geistige Behinderung identifiziert werden. *FMR1* kodiert für das Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP). Dieses Protein kontrolliert unter anderem die Translation von neuronalen mRNAs (Feng et al., 1997). FMRP ist ein wichtiger Bestandteil des Mechanismus der RNA Interferenz und an der Translationskontrolle über Mikro-RNAs beteiligt (Brown et al., 2001; Darnell et al., 2001; Jin et al., 2004). Des weiteren ist RAC1 ein Interaktionspartner von FMRP und gemeinsam regulieren sie das Auswachsen von dendritischen Verzweigungen (Greenough et al., 2001). Eine weitere neuronale Funktion übt FMRP über die Interaktion mit CYFIP/Sra auf die neuronale Plastizität aus (Schenck et al., 2003). Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß FMRP wichtig zur Aufrechterhaltung der neuronalen Plastizität ist und möglicherweise einen Einfluß auf die Kontrolle der Translation spezifischer mRNAs ausübt. Individuen mit Fragile X-Syndrom tragen meistens Mutationen im CGG *Repeat* im untranslatierten 5' Bereich des *FMR1* Gens. Durch pathologische Verlängerungen einer Sequenz aus Wiederholungen des Nukleotidtripletts Cytosin-Guanin-Guanin (CGG-Repeat) kommt es zu einer Hypermethylierung der Promotorregion und dadurch zu einer Inaktivierung des *FMR1* Gens, die ihrerseits einen Funktionsverlust des FMRP Proteins verursacht (Jin und Warren, 2003; Willemsen et al., 2004). Genau wie bei *FMR1* führt eine Erhöhung der Anzahl von CCG Wiederholungen im untranslatierten 5' Bereich des *FMR2* Gens zu dessen Inaktivierung (Gecz et al., 1996).

Die diagnostische Unterteilung zwischen syndromaler und nicht-syndromaler geistiger Behinderung ist allerdings historisch bedingt. Gene, in denen Mutationen zu nicht-syndromaler geistiger Behinderung führen, sind besonders aufschlußreich, da ihre Funktionsanalysen Hinweise auf die biologischen Prozesse geben könnten, die sich ausschließlich auf die Entwicklung von kognitiven Fähigkeiten beziehen. Durch die Analyse von Genen, die nicht-syndromale geistige Behinderung verursachen, kann man weitestgehend ausschließen, daß die geistige Behinderung durch einen unspezifischen Nebeneffekt verursacht wird. Im Gegensatz dazu wird, beispielsweise, die geistige Behinderung bei der Phenylketonurie durch eine toxische Anhäufung von Phenylalanin verursacht, die letztendlich die Entwicklung des Gehirns negativ beeinflusst (Bowden and McArthur, 1972).

Mittlerweile sind etwas über 1200 Einträge in OMIM vorhanden, die in Zusammenhang mit geistiger Behinderung stehen, davon sind 282 Gene relevant, da sie durch molekularbiologische Methoden identifiziert worden sind (Inlow und Restifo, 2004). Mehr als 90 Einträge stehen im Zusammenhang mit nicht-syndromaler geistiger Behinderung. Zusammenfassend kann man festhalten, daß viele Gene einen direkten oder indirekten Einfluß auf die geistige Entwicklung beziehungsweise auf die Gehirnentwicklung haben. Die funktionelle Analyse der bereits beschriebenen Gene und die Identifizierung neuer Gene, die mit dem Phänotyp nicht-syndromaler geistige Behinderung assoziiert sind, ermöglichen einen Einblick und ein besseres Verständnis der molekularen Grundlagen, welche die Entwicklung von kognitiven Fähigkeiten betreffen.

## **1.6 X-chromosomal vererbte geistige Behinderung (XLMR)**

In den vorangegangenen Abschnitten wurde bereits dargestellt, daß viele verschiedene Ursachen zu geistiger Behinderung führen können. Bei der Analyse von genetisch bedingten Faktoren fällt jedoch auf, daß geistige Behinderung bei männlichen Personen wesentlich häufiger auftritt. Daraus konnte man schließen, daß eine große Anzahl von Genen, die eine Rolle bei der Entwicklung von kognitiven Fähigkeiten spielen, auf dem X-Chromosom lokalisiert sein müssten (Lehrke et al., 1972). Darüber hinaus war es wesentlich einfacher, X-

chromosomale Gene zu identifizieren, die mit geistiger Behinderung assoziiert sind, weil die Vererbung der X-chromosomalen krankheitsassoziierten Gene, unabhängig ob sie dominant oder rezessiv vererbt, wesentlich leichter nachzuvollziehen ist als eine autosomalen Vererbung. Die Identifizierung von XLMR assoziierten Genen ist besonders interessant, da dies bei einer Funktionsveränderung oder bei einem kompletten Funktionsverlust des betroffenen Gens in einem männlichen Individuum nicht von einer zweiten Kopie des Gens kompensiert werden kann.

Ist die geistige Behinderung X-chromosomal vererbt, spricht man von X-chromosomal vererbter, syndromaler geistiger Behinderung (S-XLMR) oder von X-chromosomal vererbter, nicht-syndromaler geistiger Behinderung (NS-XLMR). Zur Identifizierung und Charakterisierung von Genen, die ausschließlich für die Entwicklung von kognitiven Fähigkeiten wichtig sind, sind NS-XLMR Gene von besonderem Interesse. Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind 20 Gene auf dem X Chromosom identifiziert worden, deren Fehlfunktionen NS-XLMR verursachen (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Genetische Ursachen für NS-XLMR**

<b>Gen</b>	<b>Syndrom oder zusätzliche Symptome außer MRX</b>	<b>Funktion des resultierenden Proteins</b>	<b>Referenz</b>	<b>OMIM Nummer</b>
<i>ARHGEF6</i>	Bis jetzt nicht beschrieben	Guanin Nukleotid Austauschfaktor für Rho GTPasen, der zusammen mit Integrin Rac und cdc42 aktiviert. Diese Aktivierung stimuliert das Wachstum von Neuronen.	Kutsche et al., 2000	300267
<i>AGTR2</i>	Zurückbildung des <i>Nervus opticus</i>	Angiotensin II Rezeptor 2, der im Gehirn exprimiert wird. Funktion bislang unbekannt.	Vervoort et al., 2002	300034

<b>Gen</b>	<b>Syndrom oder zusätzliche Symptome außer MRX</b>	<b>Funktion des resultierenden Proteins</b>	<b>Referenz</b>	<b>OMIM Nummer</b>
<i>ARX</i>	Epilepsie; West Syndrom; Partington Syndrom	Humanes Ortholog des <i>D. melanogaster</i> <i>Aristaless</i> Homeobox Gens ARX ist ein Transkriptionsfaktor der unter anderem in Neuronen agiert.	Stromme et al., 2002 Bienvenu et al., 2002 Frints et al., 2002	300382
<i>DLG3</i>	Bis jetzt nicht beschrieben	Membran-assoziierte Guanylat Kinase, die eine Verbindung zwischen zwischen den Neurotrophinen und ihren Rezeptoren herstellt. Wichtig für die über Rezeptoren vermittelte synaptische Plastizität.	Tarpey et al., 2004	300189
<i>ACSL4</i> ( <i>FACL4</i> )	Bis jetzt nicht beschrieben	Fettsäure CoA Ligase 4 Reguliert den Ionentransport, z.B. von Kalzium.	Meloni et al., 2002	300157
<i>FGD1</i>	Aarskog-Scott Syndrom	Guanin Nukleotid Austauschfaktor (GEF) bindet spezifisch an die RHO GTPase Cdc42 und aktiviert diese. Stimuliert wahrscheinlich das Wachstum von Neuronen.	Lebel et al., 2002	305400
<i>FTSJ1</i>	Bis jetzt nicht beschrieben	S-Adenosyl-L-Methionin abhängige Methyltransferase. Wahrscheinlich beteiligt an der Methylierung spezifischer tRNAs und somit wichtig für die Translation.	Freude et al., 2004	300499

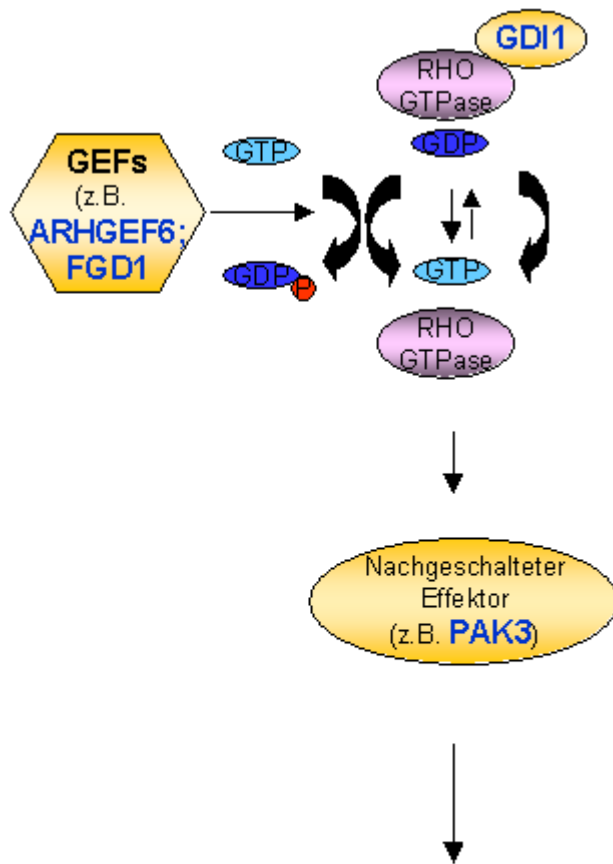


<b>Gen</b>	<b>Syndrom oder zusätzliche Symptome außer MRX</b>	<b>Funktion des resultierenden Proteins</b>	<b>Referenz</b>	<b>OMIM Nummer</b>
<i>FMR2</i>	Bis jetzt nicht beschrieben	Zellkern spezifisches Protein, welches vermutlich die Transkription aktivieren kann.	Gecz et al., 1996	309548
<i>GDI1</i>	Bis jetzt nicht beschrieben	Rab GDI-Dissoziations Inhibitor. Wahrscheinlich an der Reifung von synaptischen Vesikeln beteiligt.	D'Adamo et al., 1998	300104
<i>IL1RAPL1</i>	Bis jetzt nicht beschrieben	IL-1 Rezeptor Akzessorisches Protein	Carrie et al., 1999	300206
<i>MECP2</i>	Rett Syndrom	Methyl-CpG Bindeprotein. Ubiquitär exprimierter Transkriptionsrepressor, der auch neuronale Gene abschaltet.	Gomot et al., 2003	300005
<i>NLGN4</i>	Autismus Asperger Syndrom	NLGN4 gehört zur Familie der Neuroligine, die wichtig für die Entstehung von Synapsen sind.	Laumonnier et al., 2004	300427
<i>PAK3</i>	Bisher nicht beschrieben	Serin/Threonin Proteinkinase, die an aktivierte Formen von kleinen GTPasen bindet. PAK3 reguliert die Ausbildung des Aktinskeletts und stimuliert das neuronale Wachstum.	Allen et al., 1998	300124
<i>PQBP1</i>	Southerland-Haan Syndrom; Rennpening Syndrom	Polyglutamin Bindeprotein 1. Spielt möglicherweise eine Rolle bei Spleißvorgängen spezifischer Gene.	Kalscheuer et al., 2003	300463
<i>RSK2</i>	Coffin-Lowry Syndrom	Serin/Threonin Kinase, phosphoryliert CREB	Merienne et al., 1999	300075

<b>Gen</b>	<b>Syndrom oder zusätzliche Symptome außer MRX</b>	<b>Funktion des resultierenden Proteins</b>	<b>Referenz</b>	<b>OMIM Nummer</b>
<i>SLC6A8</i>	Epilepsie	Kreatin Transporter Gen	Rosenberg et al., 2004	300036
<i>TM4SF2</i>	Bisher nicht beschrieben	Tetraspanin, Transmembranprotein. Spielt eine Rolle bei der Integrin- vermittelten Signaltransduktion.	Zemni et al., 2000	300096
<i>JARID1C</i> ( <i>SMCX</i> )	Zusätzlich dysmorphische Merkmale	Spielt eine Rolle bei Umstrukturierungs-Vorgängen des Chromatins.	Jensen et al., 2005	314690
<i>ZNF41</i>	Bisher nicht beschrieben	Transkriptionsregulator	Shoichet et al., 2003	314995
<i>ZNF81</i>	Bisher nicht beschrieben	Transkriptionsregulator	Kleefstra et al., 2004	314998

An Hand der aufgelisteten Gene wird deutlich, daß die X chromosomal vererbte, geistige Behinderung äußerst heterogene Ursachen hat, und die Fehlfunktionen der identifizierten NS-XLMR Gene sehr unterschiedliche biologische Vorgänge beeinflussen. Bei einigen der bisher identifizierten NS-XLMR Gene ist es möglich, eine sinnvolle Zuordnung entsprechend ihrer Funktion vorzunehmen.

Eine solche Gruppe bilden die Gene, die eine funktionelle Rolle bei der durch RHO-GTPasen vermittelten Signalübertragung spielen. Ausgelöst wird diese Signalkaskade durch extrazelluläre Moleküle (z.B. Hormone), die an entsprechende Zellrezeptoren binden. Innerhalb der Zelle vermitteln RAS-ähnliche Proteine der RHO-Familie die Weiterleitung des Signals. Diese Übertragungskaskade ist für die Entwicklung und das Wachstum von Neuronen und neuronalen Fortsätzen von Bedeutung (Schmitz et al., 2000 und Brouns et al., 2001).



#### Steuerung Aktin abhängiger Prozesse:

**Migration, Adhäsion, Ablauf des Zellzyklus, Morphogenese, Axonleitung Phagozytose etc.**

(Übersichtsartikel: Schmidt and Hall, 2002)

Abb.1: **Schematische Darstellung der Signaltransduktion vermittelt, über RHO GTPasen.** In blauer Schrift sind die verschiedenen Proteine dargestellt, die entweder direkt die über RHO-GTPasen vermittelte Signaltransduktion aktivieren oder wie im Falle von PAK3 ein nachgeschalteter Effektor sind. Mutationen in den entsprechenden Genen sind assoziiert mit X-chromosomaler geistiger Behinderung. Dieser Signaltransduktionsweg ist unter anderem involviert in das Wachstum von Neuronen und die Aufrechterhaltung der synaptischen Plastizität.

NS-XLMR Gene, die regulatorische Funktionen innerhalb dieses zellulären Signaltransduktionsweges ausüben, sind: *ARHGEF6*, *FGD1*, *GDI1*, und *PAK3*.

*ARHGEF6* (alternative Genbezeichnungen: *αPIX* und *Cool-2*) und *FGD1* sind beides RHO-spezifische GEFs (*Guanine exchange factors*). *ARHGEF6* ist ein cytoplasmatisches RHO GEF Protein, das die RHO-GTPase durch Austausch des gebundenen GDPs gegen GTP aktiviert (Feng et al., 2002). *FGD1* fungiert

ebenfalls als Guanin Nukleotid Austauschfaktor (GEF), der RHO-GTPasen aktiviert (Zheng et al., 1996).

*GDI1* wird spezifisch in neuronalen Geweben exprimiert und reguliert die Aktivität von gehirnspezifischen RHO-GTPasen. Diese befinden sich in einem inaktiven Status, wenn sie GDP gebunden haben und an der Plasmamembran lokalisiert sind. *GDI1* induziert die Ablösung der RHO-GTPasen von der Plasmamembran, vermittelt die Umwandlung von GDP in GTP und überführt somit die inaktiven RHO-GTPasen in einen aktiven Status (D'Adamo et al., 1998).

PAK3 ist eine Kinase, die während der Gehirnentwicklung stark exprimiert ist. Sie agiert in der Signalkaskade nach den RHO-GTPasen (Allen et al., 1998).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß alle diese MRX Gene in die Übertragung von extrazellulären Signalen via RHO-GTPasen involviert sind und daß Mutationen in diesen Genen zu einer Fehlfunktion dieser Signalkaskaden führen. Experimentelle Daten haben gezeigt, daß RHO-GTPasen wichtige Faktoren für das Wachstum von Neuronen sind (Kozma et al., 1997). Jegliche direkte und indirekte Störung ihrer Funktion wirkt sich damit negativ auf die Entwicklung und das Wachstum von Nervenzellen aus.

Ein weiteres NS-XLMR-Gen ist der Angiotensin Rezeptor 2 (*AGTR2*). Das *AGTR2* Protein induziert ebenfalls eine Signalkaskade an der GTPasen beteiligt sind. Jedoch kann man dieses Gen nicht zu der oben genannten Gruppe zuordnen, da über RAC, das ebenfalls zur RHO-Familie der GTP-bindenden Proteine gehört, ein anderer Signaltransduktionsweg aktiviert wird, der letztendlich in der Transkriptionsaktivierung von cJUN spezifischen Genen endet (Murasawa et al., 2000).

Eine weitere Gruppe von NS-XLMR Genen ist entweder direkt oder indirekt an der Regulation der Expression von Genen beteiligt. Zu dieser Gruppe gehören: *ARX*, *MECP2*, *FRM2*, *ZNF41* und *ZNF81*.

*ZNF41* und *ZNF81* gehören zur Familie der KRAB/FPB Zinkfingerproteine und nehmen direkt Einfluß auf die Genexpression. Sie sind ubiquitär exprimiert und reprimieren die Transkription ihrer Zielgene, indem sie direkt an spezifische DNA Abschnitte binden (Schultz et al., 2002). Im Gegensatz dazu beeinflussen *ARX*, *MeCP2* und *FRM2* indirekt die Transkription durch Veränderung der Chromatinstruktur. *ARX* ist ein Homeobox Protein, das aus einer sogenannten *Paired*-Domäne und einer C-terminalen *Aristaless*-Domäne besteht. Es agiert als

Transkriptionsrepressor, der eine wichtige Rolle bei der embryonalen Entwicklung spielt (Meijlink et al., 1999). Die genaue Funktion von FRM2 ist noch nicht bekannt, jedoch weisen funktionelle Studien in Hefe und in Säugerzellen auf eine Funktion als Transkriptionsaktivator mit Zellkernlokalisierung hin (Hillman und Gecz, 2001). MeCP2 ist ebenfalls ein ubiquitär exprimierter Transkriptionsrepressor, der an CpG Dinukleotide bindet und als Komplex mit Sin3A und Histonacetylase die Transkription verhindert (Amir et al., 1999).

Eine weitere Einteilung der NS-XLMR Gene in funktionelle Gruppen ist auf Grund ihrer unterschiedlichen Funktionen nicht möglich. Offenbar führen Störungen der verschiedensten zellulären Funktionen zu nicht-syndromaler geistiger Behinderung. Dies können beispielsweise Störungen im Fettstoffwechsel sein, verursacht durch Mutationen in *ACSL4* (*FACL4*) (Meloni et al., 2002). Es können aber auch Defekte im Kreatin Transporter SLC6A8 (Solute Carrier Family 6 Member 8), der den Austausch von Kreatin gegen phosphoryliertes Kreatin und somit Energie für die Skelett- und Herzmuskulatur bereitstellt, zu nicht-syndromaler geistiger Behinderung führen (Rosenberg et al., 2004).

Bei der Auflistung der Gene, die mit nicht-syndromaler geistiger Behinderung assoziiert sind (Tabelle 3), wird deutlich, daß die Hälfte dieser Gene neben der nicht-syndromalen geistigen Behinderung auch syndromale geistige Behinderung verursachen können.

Ein Beispiel für einen genetischen Defekt, der sowohl Ursache für NS-XLMR als auch für S-XLMR sein kann, ist das Rett-Syndrom (RTT). Das Rett-Syndrom ist eine schwere, progressiv fortschreitende, neurologische Entwicklungsstörung, die hauptsächlich weibliche Personen betrifft (Hagberg et al., 2002). Bei dieser Erkrankung kommt es nach einer normalen Entwicklung in den ersten 6 bis 18 Monaten zu einer Regression der Entwicklung, und die bis dahin erworbenen Fähigkeiten werden wieder verlernt. Weitere typische Merkmale dieser Erkrankung sind stereotype Handbewegungen, Verlangsamung des Schädelwachstums, Verlust der Sprachfähigkeit, geistige Behinderung und motorische Störungen (Hagberg et al., 2002). Der genetische Defekt, der dieser Erkrankung zu Grunde liegt, betrifft das Methyl CpG Bindeprotein 2 Gen (*MECP2*), das auf Xq28 lokalisiert ist (Amir et al., 1999). MeCP2 bindet spezifisch an methylierte CpG Nukleotide der DNA und interagiert mit Sin3A und einer Histon Deacetylase. Dieser Komplex vermittelt die Deacetylierung von Histonen und somit durch

Komprimierung des Chromatins die Repression der Expression von Zielgenen (Jones et al., 1998). Neben der geistigen Behinderung sind weitere Symptome für RTT beschrieben worden, die eine Zuordnung in die Kategorie rechtfertigen. Allerdings hat man mittlerweile auch Mutationen in *MECP2* gefunden, die zu nicht-syndromaler geistiger Behinderung führen (Orrico et al., 2000 und Gomot et al., 2003).

Ein weiteres Beispiel ist das *RSK2* Gen, dessen Mutationen sowohl zu dem Coffin-Lowry Syndrom (Coffin et al., 1966), gekennzeichnet durch Skelettanomalitäten und geistiger Behinderung, als auch zu nicht-syndromaler geistiger Behinderung führen können (Merienne et al., 1999). Diese Beispiele zeigen deutlich, daß sowohl NS-XLMR als auch S-XLMR durch Fehlfunktion von ein und demselben Gen verursacht werden können. Offensichtlich hängt die phänotypische Ausprägung mit der Lokalisation der Mutation innerhalb des betroffenen Gens zusammen. Die Funktionsfähigkeit des resultierenden Proteins kann durch verschiedene Mutationen unterschiedlich stark eingeschränkt beziehungsweise aktiviert werden. Es können beispielsweise unterschiedliche Domänen betroffen sein, so daß die Interaktion mit dem jeweiligen Partner gestört ist. Mutationen in einem Gen können dadurch unterschiedliche Phänotypen erzeugen.

Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, daß Fehlfunktionen in verschiedenen Genen dasselbe Krankheitsbild verursachen.

Bis heute ist RTT als Erkrankung mit monogener Ursache beschrieben worden und in 90% der Fälle konnte die Diagnose RTT mit Mutationen in *MECP2* assoziiert werden. Bei den verbleibenden 10% der Patienten konnte bislang keine Mutation in *MECP2* nachgewiesen werden (Erlandson et al., 2003 und Ariani et al., 2004). Nach neuesten Erkenntnissen jedoch scheint RTT eine Erkrankung mit heterogenen Ursachen zu sein. Kürzlich konnte gezeigt werden, daß Mutationen im *CDKL5* Gen (auch als *STK9* bezeichnet) atypisches RTT Syndrom verursachen können (Tao et al., 2004; Weaving et al., 2004).

Ein weiteres Beispiel dafür, daß zwei unterschiedliche Gene denselben pathologischen Phänotyp verursachen können, ist die Lissenzephalie. Die Lissenzephalie wird durch eine Migrationsstörung der kortikalen Neuronen verursacht, die zu einer schweren Fehlbildung des Gehirns führen. Als genetische

Ursachen wurden Mutationen im Doublecortin X Gen (*DCX*) (Gleeson et al., 1998) und im Lissenzephalie 1 Gen (*LIS1*) (Chong et al., 1996) gefunden.

## **1.7 Identifizierung neuer Gene assoziiert mit nicht-syndromaler XLMR (NS-MRX)**

Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Analyse der genetischen Ursachen der X-chromosomal vererbten, geistigen Behinderung (XLMR) (siehe Kapitel 1.6). Dieser Krankheit zugrunde liegende, genetische Defekte wurden bereits in mehreren Genen nachgewiesen (siehe Tabelle 3). Damit ist gezeigt, daß es sich um eine äußerst heterogene Erkrankung handelt. Durch das *European X-linked Mental Retardation Consortium* (EURO-MRX; Chelly, Paris; Frijns, Leuven; Hamel, Nijmegen; Moraine, Tours; Ropers, Berlin) wurden Zelllinien und DNA aus Blutproben von Familien mit X-chromosomaler geistiger Behinderung gesammelt. Bei einigen der untersuchten Familien konnten inzwischen genetische Defekte in unterschiedlichen Genen nachgewiesen werden. Dennoch ist bei den meisten Familien (ca. 80%), deren betroffene Mitglieder unter nicht-syndromaler geistiger Behinderung leiden, der zugrunde liegende genetische Defekt noch nicht identifiziert (Ropers et al., 2003).

Der Nachweis genetischer Ursachen für nicht-syndromale geistige Behinderung ist wesentlich schwieriger als der für syndromale geistige Behinderung. Dies liegt hauptsächlich daran, daß man die Kopplungsdaten von Familien mit nicht-syndromaler geistiger Behinderung nicht zusammenfassend analysieren kann, während das bei syndromalen Formen möglich ist, wenn die anderen pathologische Merkmale weitestgehends übereinstimmend sind. Deshalb ist die Erforschung genetischer Ursachen für nicht-syndromale geistige Behinderung erst seit den letzten Jahren erfolgreich. Dies wurde ermöglicht durch die systematische Auswertung der Kopplungsdaten einzelner Familien mit NS-XLMR, durch die gezeigt werden konnte, daß die Wahrscheinlichkeit Gendefekte in bestimmten Regionen des X-Chromosoms zu finden, erhöht ist (Ropers et al., 2003). Die systematische Mutationsanalyse von gehirnexprimierten Genen in diesen Regionen bei betroffenen Mitgliedern gekoppelter Familien, führte zur Identifikation mehrerer

Gene, die in mutierter Form nicht-syndromale geistige Behinderung verursachen können (Ropers und Hamel, 2005).

**A**

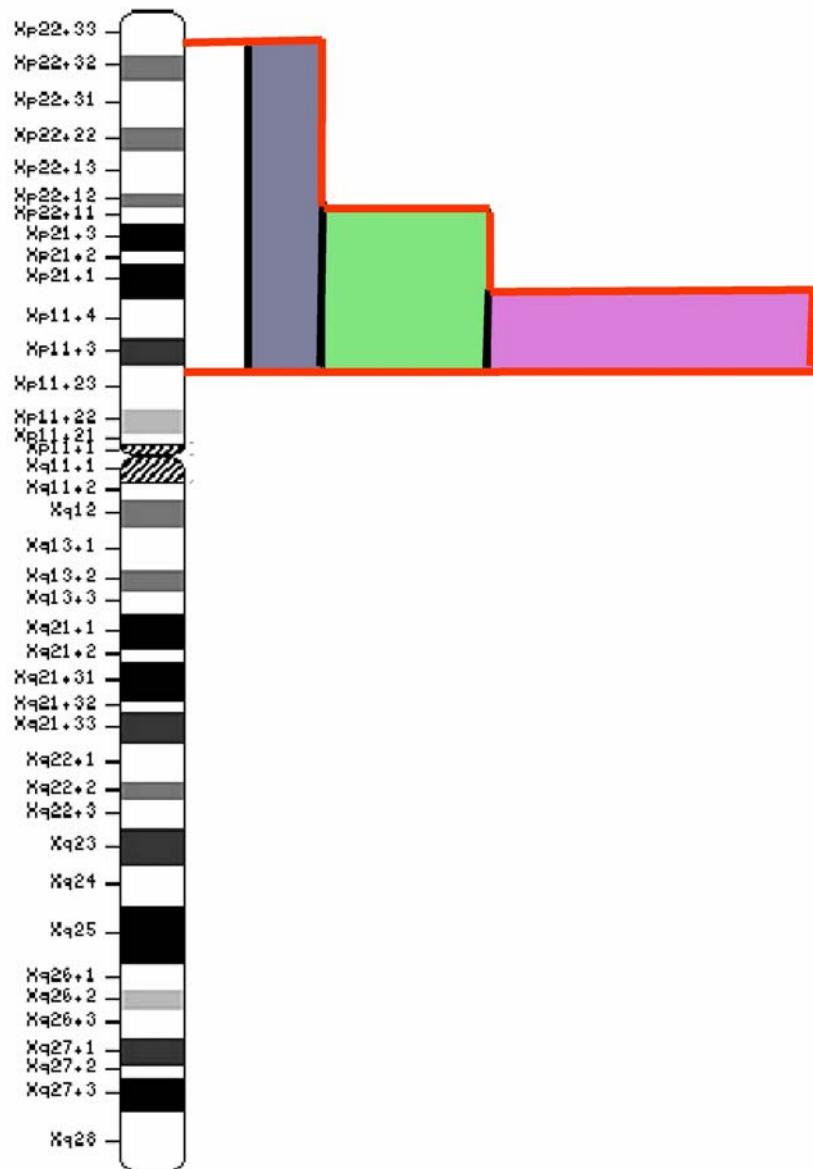


Abb.2A **Verteilung und Gewichtung der Kopplungsintervalle unterschiedlicher Familien mit X-chromosomal gekoppelter geistiger Behinderung (adaptiert aus Ropers et al., 2003)**

Schematische Darstellung der Vorgehensweise bei der Gewichtung der Kopplungsintervalle. Das Kopplungsintervall einer Familie ist als schwarzer, vertikaler Strich gekennzeichnet. Je kürzer das Kopplungsintervall, desto stärker ist seine Gewichtung (rosa Viereck) beziehungsweise je länger das Kopplungsintervall, desto geringer ist seine Gewichtung (blaues Viereck). Diese so für alle Familien ermittelte Gewichtung der Kopplungsintervalle wurde in Form von Rechtecken mit gleichen



Flächeninhalten vorgenommen, wobei die überlappenden Kopplungsintervalle aufsummiert wurden. Verbindet man die Oberkanten der Vierecke, erhält man bei genügend Kopplungsintervallen eine Art Kurve, die die Gewichtungssumme der Kopplungsintervalle darstellt (rot). Je geringer diese ist, desto unwahrscheinlicher ist es, daß in dieser Region Gene lokalisiert sind, die in mutierter Form X-chromosomale geistige Behinderung verursachen. Je höher allerdings die Werte sind (*Peak*), desto wahrscheinlicher ist es, daß in dieser Region Gene lokalisiert sind, die in mutierter Form X-chromosomale geistige Behinderung verursachen, da erheblich mehr betroffene Familien eine Kopplung in dieser Region zeigen.

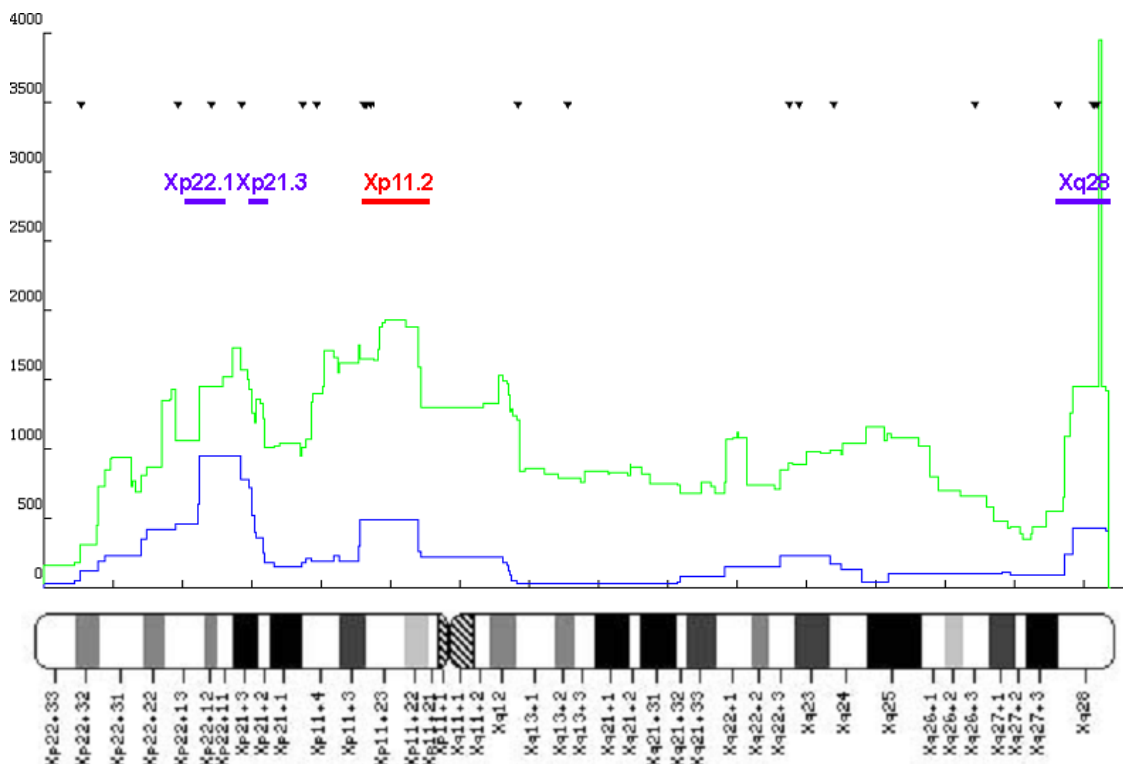


Abb.2B: **Verteilung und Gewichtung der Kopplungsintervalle unterschiedlicher Familien mit X-chromosomal gekoppelter geistiger Behinderung (adaptiert aus Ropers et al., 2003)**

Schematische Darstellung der Verteilung und Gewichtung der Kopplungsintervalle von 156 Familien. Die grüne Kurve repräsentiert das Ergebnis der Verteilung und Gewichtung für alle 156 Familien, während die blaue Kurve die Gewichtung und Verteilung der 32 Familien repräsentiert, bei denen bereits Mutationen in einem X-chromosomalen Gen gefunden worden waren. Die Pfeile im oberen Bereich der Abbildung stehen jeweils für ein Gen, in dem Mutationen identifiziert worden sind und die mit X-chromosomaler geistiger Behinderung assoziiert sind.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die systematische Mutationsanalyse auf die Region Xp11.2 beschränkt, da in dieser Region eine signifikante Überlappung von Kopplungsintervallen von NS-XLMR Familien vorhanden war, und bislang keine Gene identifiziert worden waren.

## **1.8 Identifizierung von Kandidatengenem für monogene Erkrankungen mittels zytogenetischer Methoden**

Die zweite Strategie, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verfolgt wurde, um Kandidatengene für geistige Behinderung zu bestimmen, ist die molekularbiologische Analyse der DNA von Patienten mit balancierten, reziproken Chromosomentranslokationen.

Prinzipiell kann man zwischen zwei Arten von Chromosomenanomalien unterscheiden. Dies sind einerseits numerische Anomalien und andererseits strukturelle Anomalien. Diese beiden Formen von Chromosomenanomalien können entweder in sämtlichen Körperzellen auftreten oder nur einzelne Zellen betreffen. Wenn sämtliche Zellen betroffen sind, muß die Chromosomenanomalie schon in der Gametogenese entstanden sein. Chromosomenanomalien, die alle Körperzellen betreffen, bezeichnet man als konstitutionelle Anomalien, während Chromosomenanomalien, die nur wenige Körperzellen betreffen, als somatische Anomalie bezeichnet werden. Die numerischen Chromosomenanomalien werden in Polyploidien, Aneuploidien und Mixoploidien unterteilt. Als Polyploidie bezeichnet man das Vorhandensein einer zusätzlichen Kopie eines Chromosomensatzes. Individuen einer mit solchen Chromosomenanomalie sind nicht entwicklungsfähig. Unter einer Aneuploidie versteht man den Gewinn oder Verlust von einzelnen Chromosomen. So wird beispielsweise das Down-Syndrom durch ein zusätzliches Chromosom 21 verursacht (Lejeune et al., 1959), während das Turner-Syndrom durch den Verlust eines X-Chromosoms verursacht wird (Ford et al., 1959). Die dritte Form von numerischen Chromosomenanomalien ist die Mixoploidie, bei der sich während der embryonalen Entwicklung Zellen mit einem aneuploiden oder polyploiden Chromosomensatz entwickeln und es bei weiteren Teilungen der Zellen zu einer Mosaikstruktur des Individuums kommt.

Strukturelle Chromosomenanomalien werden durch Brüche in den Chromosomen verursacht. Bei diesem Ereignis kommt es darauf an, bei wie vielen Chromosomen und an welcher Position im Chromosom eine Bruchstelle entsteht. Gibt es nur eine Bruchstelle in einem Chromosom, so kann diese entweder einfach repariert werden, oder das entstandene Bruchstück ohne Zentromer geht bei der weiteren Teilung der Zelle verloren. Als Konsequenz würde den Tochter-Zellen ein Teil eines bestimmten Chromosoms und damit auch dessen genetische Information fehlen (Strachan and Read, 1996).

Finden dagegen zwei Brüche in einem Chromosom statt, so kann es zu einer Inversion des chromosomalen Bereiches zwischen den beiden Bruchstellen kommen. Sind bei diesem Ereignis Gene oder regulatorische Sequenzen durch die Bruchpunkte in ihrer Einheit zerstört, so kann dieses zu einem pathologischen Phänotyp führen. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, daß das Chromosomenstück verloren geht und die Bruchpunkte innerhalb des betroffenen Chromosoms miteinander fusionieren. Dadurch ginge sämtliche genetische Information, die auf diesem Chromosomenabschnitt lokalisiert war, verloren. In diesem Fall spricht man von einer Deletion (Strachan and Read, 1996).

Finden zwei Brüche an unterschiedlichen Chromosomen statt, kann es zu einem balancierten Austausch von azentrischen Bruchstücken kommen. Alternativ dazu können die DNA-Doppelstrangenden der Bruchpunkte so miteinander verbunden werden, daß ein derivatives Chromosom mit zwei Zentromeren entsteht, während das andere kein Zentromer besitzt. Dieses führt zu erheblichen Schwierigkeiten bei jeder nachfolgenden Teilung, und die Zellen sind nicht überlebensfähig. Darüber hinaus können auch mehr als zwei Brüche in verschiedenen Chromosomen auftreten, welche zu Inversionen beziehungsweise azentrischen Translokationen führen können (Strachan and Read, 1996).

Höchstwahrscheinlich werden diese Anomalien, die durch Brüche der Chromosomen hervorgerufen werden, durch eine fehlerhafte Reparatur der Chromatiden bei dem Prozeß des *Crossing over* während der Prophase I verursacht. In der Prophase I der Meiose findet die Paarung der homologen Chromosomen statt. Während dieser Phase der Reduktionsteilung kommt es zu *Crossing over*-Ereignissen zwischen den homologen Chromosomen. Das *Crossing over*-Ereignis wird durch einen Doppelstrangbruch eingeleitet. Die darauf folgende DNA-Reparatur-Synthese wird unter Zuhilfenahme des homologen

Chromosoms durchgeführt. Dabei kommt es zum reziproken Austausch von genetischem Material zwischen den homologen Chromosomen. Erfolgen diese oben beschriebenen Ereignisse zwischen nicht homologen Chromosomen, kann es zu illegitimen Doppelstrangbruch-Reparaturen kommen, die in Translokationen resultieren. Alternativ dazu können Doppelstrangbrüche bei zwei unterschiedlichen Chromosomen stattfinden, die daraufhin über den sogenannten *Nonhomologous End Joining Pathway* (NHEJ) reziprok verknüpft werden (Pfeiffer et al., 2004). Die meisten Träger von balancierten Chromosomenaberrationen sind phänotypisch unauffällig und nur etwa 6% der Patienten mit balancierten Translokationen zeigen einen pathologischen Phänotyp (Bugge et al., 2000). Dies liegt entweder daran, daß keine Gene oder regulatorischen Elemente unterbrochen beziehungsweise beeinträchtigt werden, oder aber eine funktionelle Redundanz des betroffenen Gens vorliegt. Allerdings leiden die symptomlosen Träger balancierter Translokationen an einer reduzierten Fertilität, denn bei der Reduktionsteilung werden Keimzellen gebildet, die Hybridchromosomen enthalten. Bei der Verschmelzung der mütterlichen Eizelle und des väterlichen Spermiums werden normalerweise zwei haploide Chromosomensätze zu einem diploiden Chromosomensatz vereinigt. Ist einer der beiden Elternteile Träger einer balancierten Translokation, besteht zu 25% die Wahrscheinlichkeit einer partiellen Trisomie oder zu 25% die Wahrscheinlichkeit einer partiellen Monosomie bei der Befruchtung. Die befruchteten Eizellen mit Chromosomenaberrationen sind oftmals nicht überlebensfähig, und deshalb haben Träger einer balancierten Translokation ein 50% höheres Risiko einer Fehlgeburt gegenüber Menschen mit einem normalen Karyotyp (Stern et al., 1999).

Unbalancierte Translokationen kommen durch Verlust oder Gewinn von Chromosomenmaterial zustande, welche in partieller Monosomie bzw. partieller Trisomie resultieren. Solche Strukturabweichungen eines Chromosoms werden oftmals durch eine balancierte Translokation von Chromosomenabschnitten bei einem Elternteil verursacht. Beispiele hierfür sind für alle Chromosomen beschrieben worden. Ein bekanntes Beispiel für eine partielle Monosomie ist das Katzenschrei-Syndrom, welches durch eine Deletion am kurzen Arm des Chromosoms 5 verursacht wird (Lejeune 1963).

Von wissenschaftlich größerem Interesse in Bezug auf die Analyse von Genfunktionen sind balancierte Translokationen, die durch die chromosomale

Umstrukturierung zu einer direkten Unterbrechung eines Gens führen, da bei ihnen ausgeschlossen werden kann, daß der Phänotyp durch Verlust oder Gewinn von Chromosomenmaterial zustande gekommen ist. Anhand dieser balancierten Translokationen kann man krankheitsassoziierte Gene identifizieren und ihre Funktion analysieren (Tommerup, 1993).

Basierend auf der Studie von balancierten Translokationen sind erfolgreiche Genotyp-Phänotyp-Assoziationen für verschiedene Gene aufgezeigt worden. So wurde beispielsweise an Hand von unterschiedlichen X-chromosomalen und autosomalen Translokationen das krankheitsassoziierte Gen auf Xp21 lokalisiert (Greenstein et al., 1977; Verellen et al., 1978 und Canki et al., 1979) und später das Dystrophin Gen, welches in mutierter Form Ursache der Duchenne-Muskeldystrophie identifiziert (Ray et al., 1985).

Dieser Ansatz zur Charakterisierung einer Genfunktion ist am aussagekräftigsten, wenn nur ein Gen auf einem der derivativen Chromosomen unterbrochen ist. Sind auf beiden Chromosomen Gene unterbrochen, ist es wesentlich schwieriger den Funktionsverlust eines Gens oder einer Kopie eines Gens dem jeweiligen Phänotyp eindeutig zuzuordnen. Noch komplexer wird die Analyse, wenn es durch die Translokation zu einem Fusionsgen kommt. Es wird dann äußerst problematisch zu bestimmen, ob das entsprechende Krankheitsbild auf den Funktionsverlust oder die Haploinsuffizienz eines der beiden Gene zurückzuführen ist, oder ob das neue Fusionsgen pathogen ist.

## **1.9 Ziel dieser Arbeit**

Mentale Retardierung ist eine äußerst heterogene Erkrankung, bei der jedoch erst ein geringer Prozentsatz der zu Grunde liegenden genetischen Faktoren bekannt sind. Insgesamt sind ungefähr 2-3% der Bevölkerung von geistiger Behinderung betroffen (Chelly und Mandel, 2001). Demnach ist geistige Behinderung immer noch eines der größten ungelösten Probleme der klinischen Genetik und ein wichtiger Aspekt der Gesundheitsvorsorge.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Strategien angewandt, um Gene zu identifizieren, deren Defekte zu geistiger Behinderung führen. Dies war zum einen die systematische Suche nach Mutationen in Familien

mit X-chromosomal vererbter geistiger Behinderung und zum anderen die Untersuchung einer Patientin mit balancierter Chromosomenaberration.

Zur Zeit sind nur bei 17% der Familien, die von X-chromosomaler geistiger Behinderung betroffen sind, Mutationen in spezifischen Genen beschrieben (Ropers et al., 2003). Da diese Erkrankung äußerst heterogene Ursachen hat und bislang 42 Gene identifiziert worden sind (Ropers et al., 2005), besteht durchaus die Möglichkeit, daß Mutationen in bis zu 100 unterschiedlichen Genen zu X-chromosomaler geistiger Behinderung führen können (Ropers et al., 2003). Aus diesem Grunde wurde eine vergleichende Kopplungsanalyse durchgeführt um Regionen zu auf dem X-Chromosom festzulegen, in denen die Wahrscheinlichkeit groß war bisher nicht beschriebene Gene zu entdecken, die assoziiert sind mit X-chromosomaler geistiger Behinderung (Ropers et al., 2003). An die Ermittlung von Genen mittels Mutationanalyse schloß sich ihre funktionelle Charakterisierung an, um Ursachen und Wirkungsweisen der betreffenden, mutierten Genprodukte nachvollziehen zu können.

Die zytogenetische Untersuchung der DNA einer Patientin mit Rett-Syndrom ergab, daß diese Trägerin einer balancierten Translokation zwischen dem Chromosom 1 und Chromosom 7 ist. Die meisten Rett-Syndrom Patienten sind jedoch Träger von Mutationen im *MECP2* Gen. Allerdings ist diese Genotyp-Phänotyp Korrelation nicht bei allen Rett-Syndrom Patienten nachweisbar. Durch die Analyse der Translokationsbruchpunkte der Patientin und die Untersuchung eventuell unterbrochener Gene bestand somit die Möglichkeit ein autosomales Gen zu identifizieren, das mit dem Rett-Syndrom assoziiert ist.

Diese funktionelle Analysen der ermittelten Gene können letztendlich zu einem besseren Verständnis der Pathogenese genetisch bedingter Krankheiten führen, und ermöglichen einen besseren Einblick in die normale und gestörte Gehirnentwicklung bzw. Gehirnfunktion.