

Aus dem
Experimental and Clinical Research Center (ECRC),
eine Kooperation zwischen der Charité und dem Max-Delbrück Centrum für
Molekulare Medizin
Charité Campus Buch

Direktor: Prof. Dr. med. Friedrich C. Luft

Habilitationsschrift

Das Bilginturan-Syndrom: autosomal-dominante Hypertonie mit Brachydaktylie

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Experimentelle Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. rer. nat. Sylvia Bähring

Eingereicht: März 2013

Dekanin: Prof. Dr. med. Annette Grüters-Kieslich

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Horsthemke / Duisburg-Essen

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Heribert Schunkert / München

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Originalarbeiten	17
2.1	Schwerer, autosomal-dominant vererbter Bluthochdruck und Brachydaktylie in einer türkischen Familie kartiert auf das humane Chromosom 12	17
2.2	Eine Deletion auf 12p in einem japanischen Kind mit Brachydaktylie überlappt mit dem Locus für Brachydaktylie und Hypertonie in einer türkischen Familie	22
2.3	Familien mit autosomal-dominanter Brachydaktylie Typ E, Kleinwuchs und schwerer Hypertonie	27
2.4	Autosomal-dominante Hypertonie mit Brachydaktylie Typ E wird durch ein Rearrangement auf dem kurzen Arm von Chromosom 12 verursacht	33
2.5	Eine Inversionsregion auf Chromosom 12p ist verantwortlich für Hypertonie und Brachydaktylie und zeichnet sich durch multiples Spleißen und nichtkodierende RNA aus	41
2.6	Hypertonie im Kindesalter bei autosomal-dominanter Hypertonie und Brachydaktylie	49
2.7	Ein <i>cis</i> -Regulator ist verantwortlich für die Herunterregulation von <i>PTH1H</i> bei der Translokation t(8;12)(q13;p11.2) und führt zu Brachydaktylie Typ E	58
2.8	Eine deplazierte lncRNA verursacht Brachydaktylie beim Menschen	74
3.	Diskussion	90
4.	Zusammenfassung	101
5.	Literaturverzeichnis aus dem freien Text	102
	Danksagung	108
	Erklärung gemäß der Habilitationsordnung der Charite	110

1. Einleitung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind weltweit die häufigste Todesursache.¹ Als unabhängiger Risikofaktor ist hoher Blutdruck (Hypertonie), global gesehen, für 13% der Todesfälle verantwortlich und damit auf Platz eins der Risikofaktoren für Mortalität.² Die Prävalenz der Hypertonie wird, mit deutlichen länderspezifischen Unterschieden, weltweit gegenwärtig auf 26% geschätzt. Dabei wird bis zum Jahr 2025 mit einem Anstieg der Zahl der erwachsenen Hypertoniker um 60% gerechnet, was voraussichtlich zu einer Gesamtzahl von 1,56 Milliarden Betroffenen führen wird.³ Aufgrund der fatalen Folgeerkrankungen wie Schlaganfall, Herz- oder Niereninsuffizienz, vaskuläre Demenz oder periphere Gefäßkrankheiten stellt die Hypertonie ein entscheidendes gesundheitspolitisches Problem dar. In Deutschland werden für die Versorgung der Patienten mit hypertoniebedingten Erkrankungen vom Gesundheitssystem Kosten in zweistelliger Milliardenhöhe getragen.⁴

Hypertonie liegt entsprechend den Klassifikationen der Hypertoniegesellschaften (WHO/ISH; ESH; Deutsche Hochdruckliga) vor, wenn der systolische Blutdruckwert (SBP) 140 mmHg und mehr sowie der diastolische Wert (DBP) 90 mmHg und mehr betragen. Da im Zentrum der Aufmerksamkeit jedoch vor allem die Vermeidung von hypertonieassoziierten Folgeerkrankungen steht, für die Bluthochdruck nur einer, wenn auch der entscheidende, Risikofaktor ist, definierten die Fachgesellschaften Unterklassifikationen, die für die Indikation einer Therapie unter Einbeziehung zusätzlicher kardiovaskulärer Risikofaktoren von Bedeutung sind (Tabelle 1).^{5, 6}

Bei der großen Mehrheit der Hypertoniker (>90 Prozent) ist eine eindeutige Ursache der Hypertonie nicht erkennbar. Man spricht hier von primärer oder auch essentieller Hypertonie. Die Regulation des Blutdrucks ist ein äußerst komplexes Geschehen, das auf den unterschiedlichsten physiologischen Ebenen beeinflusst wird. Auf das Wesentliche reduziert, ist die Höhe des Blutdrucks direkt proportional zum Herzzeitvolumen und dem peripherem Gefäßwiderstand. Jedoch werden diese Schlüsselparameter der Blutdruckregulation durch eine Vielzahl sich gegenseitig beeinflussender Faktoren und deren direkte und indirekte Interaktionen bestimmt.

Tabelle 1: Definitionen und Klassifikation der Blutdruckwerte (mmHg) ⁶

Kategorie	Systolisch	Diastolisch
Optimal	< 120	< 80
Normal	120-129	80-84
Hoch Normal	130-139	85-89
Grad 1 Hypertonie (leicht)	140-159	90-99
Grad 2 Hypertonie (mittelschwer)	160-179	100-109
Grad 3 Hypertonie (schwer)	≥ 180	≥ 110
Isolierte systolische Hypertonie	≥ 140	<90

Eine Vielzahl von Studien konnte belegen, dass eine blutdrucksenkende Behandlung die Zahl der durch kardiovaskuläre Ursachen bedingten Todesfälle verringert und das Leben verlängern kann.⁷ Die Senkung des Blutdrucks hat sich als erfolgreichste Therapie erwiesen, um den Anstieg von Herz-Kreislauf-Erkrankungen einzuschränken.

Die Suche nach den Ursachen, die zur Ausprägung einer essentiellen Hypertonie führen und, damit verbunden, die Aufklärung der molekularen Mechanismen, die zu einer Blutdruckerhöhung beitragen, sind jedoch bei weitem nicht abgeschlossen.

Mit der Sequenzierung des humanen Genoms und der Identifizierung neuer Gene und Genloci traten in den letzten Jahren insbesondere genetische Faktoren der Blutdruckregulation und, damit verknüpft, die genetische Prädisposition zur Entwicklung einer Hypertonie in den Fokus der Forschung.

Die Erkenntnis, dass Bluthochdruck eine erbliche Komponente hat, ist bereits fast 100 Jahre alt. Wilhelm Weitz war der Erste, der sich grundsätzlich mit der Genetik des hohen Blutdrucks beschäftigte. 1918 zum außerordentlichen Professor der Universität Tübingen berufen, war er dort Leiter der medizinischen Poliklinik. Weitz lernte, Blutdruck zu messen, und machte diese Messungen zur Routine in der ambulanten Praxis. Seine Ambulanz besuchten Patienten mit unterschiedlichsten Krankheitsbildern. Weitz fiel auf, dass Hochdruckpatienten (damals mit >160/110 mmHg definiert) viel häufiger an Herzinfarkten, Schlaganfällen und Großgefäßerkrankungen verstarben als Patienten mit anderen Beschwerden.⁸ Weitz erkannte

Hypertonie als Risikofaktor, ein Wissen, das zunächst auf Deutschland beschränkt blieb und erst später von Franz Volhard verbreitet wurde.⁹ Zusätzlich machte Weitz noch eine andere bahnbrechende Beobachtung. Er stellte fest, dass Verwandte ersten Grades (Geschwister, Eltern, Kinder) zweimal so häufig an Herz-Kreislauf-Erkrankungen verstarben wie entfernte Verwandte oder fremde Personen. Bereits 1914 schlussfolgerte er daher, dass der Risikofaktor Hypertonie vererbt werden könne. Erst im Jahr 1889 hatte u. a. De Vries die Mendelschen Erbgesetze wiederentdeckt und das Wort „Pangen“ als vererbare Einheit definiert.^{10, 11} Wenige Jahre später verwendete Wilhelm Ludvig Johannsen den Begriff Gen.¹² Keiner dieser Wissenschaftler hatte jedoch eine auch nur annähernde Vorstellung davon, was ein Gen sein könnte.

Weitz verfolgte seine Idee der Vererbbarkeit der arteriellen Hypertonie weiter. Er bestellte Familienangehörige seiner Hypertoniepatienten und der Patienten ein, die aus anderen Gründen seine Poliklinik besuchten. Dazu gehörten Geschwister, Eltern, Kinder und weiter entfernte Verwandte. Allen wurde der Blutdruck gemessen. Weitz stellte fest, dass Verwandte von Hypertonikern zweimal so häufig einen Hypertonus aufwiesen wie Verwandte von Normotonikern.⁸ Er schlussfolgerte daraus, dass die Hypertonie einem Mendelschen autosomal-dominanten Erbgang folgt. Weitz bestätigte seine These, indem er Zwillinge in seine Untersuchungen einbezog. Dies waren die ersten Überlegungen zu einer vererbaren Komponente der arteriellen Hypertonie. Weitz's Erkenntnisse waren zur damaligen Zeit außerordentlich: Er erkannte zum einen Hypertonie als Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse. Zum anderen erfasste er die erbliche und folglich genetisch bedingte Komponente des Bluthochdrucks. Er postulierte einen Erbgang und wandte Zwillinge als neues genetisches Modell an, um seine Ideen zu stützen.

Nach dem zweiten Weltkrieg wurden die Ideen von Wilhelm Weitz wieder aktuell, seine Arbeiten wurden wiederentdeckt. Die Erkenntnis, dass Bluthochdruck der bedeutendste Risikofaktor für Herz-Kreislauf-Erkrankungen ist, fand allgemeine Anerkennung. Insbesondere Robert (Baron) Platt (1900-1978), ein britischer Arzt, der Nierenerkrankungen erforschte, begeisterte sich für die Arbeiten von Weitz und war überzeugt, dass der Hypertonus einem autosomal-dominanten Erbgang folgt. Seine These stimmte vollständig mit den Schlussfolgerungen von Wilhelm Weitz überein.¹³ Aus epidemiologischer Sicht hätte dies jedoch bedeutet, dass es zwei voneinander verschiedene Blutdruckverteilungen in der Bevölkerung geben müsste - eine Blutdruckverteilung für Normotoniker und eine zweite Blutdruckverteilung für Hypertoniker. Diese Vorstellung stieß unter den Fachkollegen auf Widerstand.

Sir George Pickering setzte sich 1955 mit der Terminologie der Hypertonie auseinander.¹⁴ Ihm missfiel der Begriff. „Hypertonie ist ein schlecht gewähltes Wort, eine Bastardierung von Griechisch und Latein, das eher auf eine Gefäßüberstreckung hinweist als auf einen zu hohen Blutdruck“, erklärte Pickering. Weiter führte er aus: „Der unglückliche Ausdruck hat dazu geführt, dass man Menschen mit Hypertonus als qualitativ unterschiedlich zum Rest der Bevölkerung einschätzt.“ Dagegen kämpfte er sein Leben lang, obwohl er zweifellos akzeptierte, dass die Hypertonie einem starken genetischen Einfluss unterliegt. Worum ging es Pickering? Anhand von - für die damalige Zeit - großen Kollektiven konnte Pickering mathematisch beweisen, dass bei Normotonikern, Hypertonikern, Eltern von beiden Gruppen, Geschwistern usw. jeweils eine unimodale kontinuierliche Gauß'sche Verteilung der Blutdruckwerte (systolisch, diastolisch, Mittelwerte, Pulsamplitude) vorlag. Dabei überlappten beide Gruppen - Hypertoniker und Normotoniker - stets erheblich.¹⁵ Dies bedeutet jedoch, dass die Definition des Hypertonus zu einer letztlich willkürlichen Trennung von Bevölkerungsgruppen führt. Zu Pickerings Zeiten wurde Hypertonie ab einem Blutdruckwert von 160/110 mm Hg definiert. Heute spricht man dagegen von einer manifesten Hypertonie ab einem Blutdruckwert von 140/90 mm Hg (Tab.1). Aufgrund der kontinuierlichen Verteilung der altersabhängigen Blutdruckwerte benötigt die Einteilung in „hypertensiv“ und „normotensiv“ die Definition eines Schwellenwertes, ab dem das kardiovaskuläre Risiko ansteigt und eine therapeutische Intervention von klinischem Nutzen ist (Tab.1). Pickerings Beobachtungen wiesen ebenfalls darauf hin, dass Bluthochdruck zwar genetisch bedingt ist, aber auf ein komplexes Zusammenspiel multipler genetischer Faktoren zurückzuführen sein sollte und folglich mehrere (oder viele) Gene für eine Blutdruckerhöhung verantwortlich sind. Pickering gewann seinen Streit mit Platt.^{16, 17} Historisch gesehen war diese Auseinandersetzung äußerst fruchtbar. Sie rückte den Fokus der Bluthochdruckforschung auf die Fragen, welche Gene den Blutdruck beeinflussen und welche genetischen Prädispositionen die Entwicklung einer Hypertonie ermöglichen.

Dennoch hatten Weitz und Platt nicht ganz Unrecht, denn in den nächsten Jahren fanden sich Familien mit Hypertonie, in denen der erhöhte Blutdruck einem monogenen Erbgang folgte. Die moderne Molekularbiologie ermöglichte seit den neunziger Jahren des vorigen Jahrhunderts ein tieferes Verständnis der molekulargenetischen Ursachen dieser Syndrome. Alle beschriebenen Krankheitsbilder weisen auf Mechanismen der Salzurückresorption im Sammelrohr der Niere hin, die zu einer gestörten Salz-Wasser-Homöostase und damit zur Ausprägung eines Hypertonus führen. Die auf molekulargenetischem Wege gewonnenen Erkenntnisse unterstützten langjährig gesammelte physiologische Daten, die darauf hinwiesen, dass die diätische Kochsalzzufuhr im Zusammenhang mit der Entwicklung von Bluthochdruck stehen könnte.¹⁸

Eine der monogenen Bluthochdruckformen ist der Glukokortikoid-reagible Aldosteronismus (GRA; *glucocorticoid-remediable aldosteronism*). GRA ist eine autosomal-dominante Erkrankung, die seit den sechziger Jahren des 20. Jahrhunderts bekannt ist. GRA ist durch einen frühzeitigen schweren Hypertonus, erhöhte Aldosteron- und reduzierte Plasmareninwerte charakterisiert. Als Kortikoide therapeutisch eingeführt wurden, fiel auf, dass bei betroffenen Patienten nach Verabreichung minimaler Substitutionsdosen von Kortison der Blutdruck abfiel.¹⁹⁻²² Die kodierenden Gene für zwei Schlüsselenzyme der adrenalen Steroidbiosynthese zur Bildung von Kortison (*CYP11B1*) und Aldosteron (*CYP11B2*) liegen auf dem langen Arm von Chromosom 8 unmittelbar nebeneinander und weisen eine hohe Sequenzhomologie auf. Die Gruppe um Richard P. Lifton konnte nachweisen, dass GRA-Patienten über ein zusätzliches, durch Duplikation und ungleiches Crossing-over entstandenes chimäres Gen verfügen. Dieses Gen besteht aus dem regulierenden Teil des Steroid-11-beta-Hydroxylase-Gens (*CYP11B1*) und dem kodierendem Teil des Aldosteronsynthase-Gens (*CYP11B2*).²³ Dieser Befund erklärte auch, warum Betroffene nach Gabe von 5 mg Prednison einen Blutdruckabfall aufwiesen. Die Expression des Enzyms Steroid-11-beta-Hydroxylase wird durch das Adrenokortikotrope Hormon (ACTH) reguliert. Nach Verabreichung von Kortikoiden bei GRA-Patienten wurde die Wirkung von ACTH unterdrückt, und der treibende Mechanismus, der zur überschüssigen Aldosteronproduktion und damit zum Hypertonus führte, wurde ausgeschaltet, was den Blutdruck normalisierte.

Auf diesen Befund aufbauend konnten weitere monogene Hypertonieformen insbesondere durch die Gruppe um Lifton aufgeklärt werden. Ein gestörter Abbau von Kortisol zu Kortison, verursacht durch Mutationen im Gen der 11- β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-2 (*HSD11B2*), führt zu augenscheinlichem Mineralokortikoidexzess (AME; *Apparent Mineralocorticoid Excess*), einer autosomal-rezessiven Erkrankung.²⁴ Kortisol und Aldosteron weisen die gleiche Affinität zum Mineralokortikoidrezeptor auf, wohingegen Kortisol nicht mit diesem interagiert. In AME-Patienten verursacht die Aktivierung des Rezeptors durch das im Überschuss verfügbare Kortisol einen Hypertonus, der durch eine erhöhte Aktivität des epithelialen Natriumkanals (ENaC) vermittelt wird. Auch aktivierende Mutationen im Mineralokortikoidrezeptor selbst führen zu Hypertonie – in besonders ausgeprägter Form bei schwangeren Frauen (*Hypertension exacerbated by pregnancy*).²⁵ Mutationen in der beta- (*SCNN1B*-) bzw. gamma- (*SCNN1G*-) Untereinheit des Schlüsselionenkanals ENaC im distalen Nephron, die zu einer erhöhten ENaC-Aktivität führen, sind Ursache des autosomal-dominant vererbten Liddle-Syndroms.²⁶⁻³⁰ Kopplungsanalysen in Familien mit Pseudohypoaldosteronismus Typ II führten zum Nachweis von Mutationen in den Genen der beiden wichtigen Kinasen *WNK1* und *WNK4* (*with no Lysin=K kinase*), die in der Signaltransduktion des Sammelrohrs eine bedeutende Rolle spielen.³¹ Diese Kinasen sind

entscheidend an der Regulation des Natrium-Chlorid-Cotransporters (NCC) und des Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporters (NKCC) und damit am renalen Ionentransport beteiligt.^{32, 33} Zusätzlich wurde eine Reihe von Genen gefunden, deren Mutationen als monogener Erbgang mit erniedrigten Blutdruckwerten und Salzverlust assoziiert sind.^{18, 34} Mehrere dieser wichtigen genetischen Erkrankungen sind gleichzeitig aufgeklärt worden und betreffen essentielle physiologische Prozesse der Salz-Wasser-Regulation der Niere, so dass anhand dieser pathologischen Vorgänge letztlich ein detaillierteres Bild der Funktion des Sammelrohres und der Blutdruckregulation gewonnen werden konnte (Abb. 1).

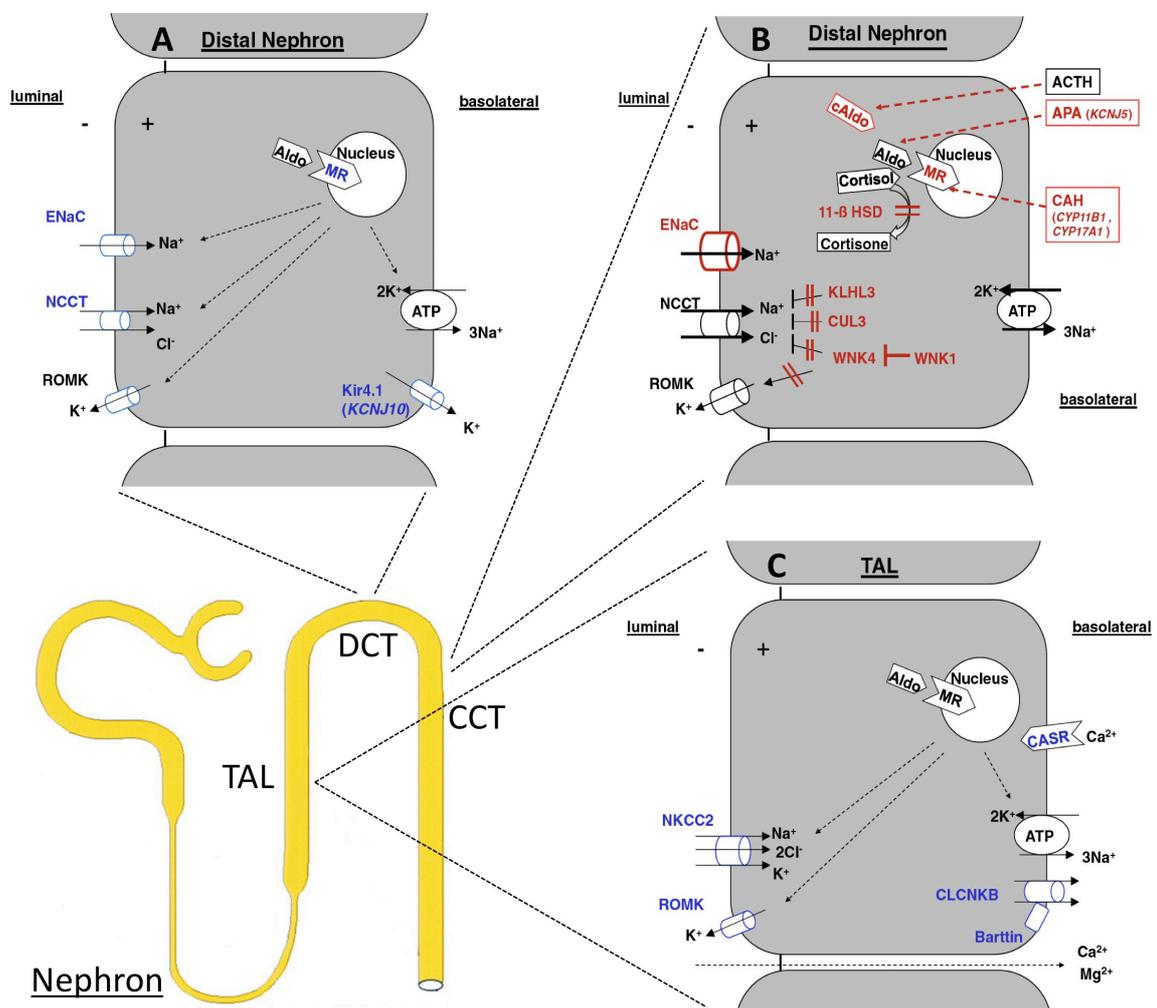


Abb. 1: Mutationen in Genen, die zu einer veränderten Blutdruckregulation führen.

Schematisch ist ein Nephron, die Filtereinheit der Niere, dargestellt. **A.** Mutationen in Genen (blau), die im Epithel des distalen Konvoluts (DCT, *distal convoluted tubule*) exprimiert werden, führen zu Salzverlust, Elektrolytabnormalitäten und erniedrigtem Blutdruck. **B.** Mutationen in Genen (rot) des

kortikalen Tubulus (CCT, *cortical collecting tubule*) führen zu Salzretention und erhöhtem Blutdruck. **C.** Mutationen von Genen, die im Epithel der dicken aufsteigenden Henle-Schleife (TAL, *thick ascending limb*) exprimiert werden, verursachen das Bartter-Syndrom. Mutationen in den blau dargestellten Genen führen zu Salzverlust. *ENaC*, Epithelialer Natriumkanal; *Kir4.1*, Kaliumkanal (*inwardly rectifying, subfamily J, member 10*); *Aldo*, Aldosteron; *cAldo*, chimäres Aldosteron; *MR*, Mineralokortikoidrezeptor; *APA*, Aldosteron-produzierendes adrenales Adenom; *CAH*, kongenitale adrenale Hyperplasie; *ACTH*, Adrenokortikotropes Hormon; *DOC*, Deoxykortikosteron; *Cul3*, Cullin 3; *KLHL3*, Kelch-like 3; *11-β-HSD*, 11-β-Hydroxysteroiddehydrogenase; *NCCT*, NaCl-Cotransporter; *ROMK*, Kaliumkanal (*renal outer medullary*); *CASR*, *Calcium sensing receptor*; *NKCC2*, Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporter; *CLCNKB*, Chloridkanal kb. Adaptiert von³⁵.

Unsere Arbeitsgruppe engagiert sich seit 1993 auf dem Gebiet der Genetik des Bluthochdrucks. Prof. Dr. med. Friedrich C. Luft wurde an die dem Max-Delbrück Centrum für Molekulare Medizin Berlin-Buch (MDC) angeschlossene Franz-Volhard-Klinik (jetzt ECRC: Experimental and Clinical Research Center der Charité Berlin) berufen. Eine seiner Aufgaben war es, im Rahmen der Herz-Kreislauf-Forschung am MDC das Forschungsthema „Genetik der Hypertonie“ zu etablieren. In der von Friedrich Luft begründeten Arbeitsgruppe waren ab 1994 der PD Dr.med. Herbert Schuster, der genetische Epidemiologe PD Dr.med. Thomas Wienker und ich als Molekularbiologin tätig. Thomas Wienker machte nach umfangreicher Literaturrecherche auf eine Publikation des türkischen Arztes Nihat Bilginturan aus dem Jahr 1973 aufmerksam, der eine große türkische Familie mit vererbter Brachydaktylie (Kurzfingerigkeit) und assoziiertem Hypertonus beschrieben hatte.³⁶ Stammbaum und autosomal-dominanter Erbgang wiesen auf eine der seltenen monogenen Hypertonieformen hin. Für an genetischen Fragestellungen interessierte Wissenschaftler sind diese Familien außerordentlich interessant und wertvoll, da ihre Analyse die Möglichkeit eröffnet, einzelne Gene aus einem komplexen pathogenetischen Geschehen herauszufiltern und somit einen Einblick in den physiologischen Zusammenhang des Gesamtgeschehens gewinnen zu können. Das Interesse unserer neu etablierten Arbeitsgruppe, diese Familie zu untersuchen, war außerordentlich groß und richtete sich vor allem auf die Frage, ob die molekularen Ursachen dieses Hypertonus mittels genetischer Kopplungsanalysen aufgeklärt werden könnten. Hakan Toka, ein in der klinischen Abteilung tätiger türkisch-stämmiger Doktorand stellte den Kontakt zu Nihat Bilginturan her, der vor seiner Emeritierung als Professor für pädiatrische Endokrinologie an der Universität Ankara tätig gewesen war. Nihat Bilginturan vermittelte den Kontakt zur betroffenen Familie und holte deren Einwilligung zu weitergehenden genetischen Analysen ein.

Im Rahmen der hier durchzuführenden genetischen Feldarbeit (*genetic fieldworking*) war neben der exakten Erfassung der Verwandtschaftsverhältnisse sowohl eine eindeutige Beschreibung der phänotypischen Merkmale, um den Betroffenenstatus eindeutig definieren zu können, als auch eine dem Datenschutz gerecht werdende Verschlüsselung der Personendaten erforderlich. Für eine erfolgreiche Kopplungsanalyse war die korrekte Erfassung des Familienstammbaums eine essentielle Voraussetzung. Insgesamt wurden drei Forschungsreisen in die Türkei durchgeführt (1994, 1997 und 2009). Im Rahmen der ersten Reise wurden etwa 60 Familienmitglieder untersucht, die aus allen Teilen der Türkei in ihrem Heimatdorf eintrafen. Es wurden oszillometrische Blutdruckmessungen durchgeführt, die Körpermorphometrie bestimmt und präzise Aufnahmen von Händen und Füßen erstellt. Betroffene Familienangehörige, die älter als 10 Jahre waren, konnten bereits anhand dieser Parameter von nichtbetroffenen eindeutig unterschieden werden. Sie zeichneten sich durch einen schweren Hypertonus aus, waren im Durchschnitt zehn Zentimeter kleiner und zeigten Hand- und Fußfehlbildungen in Form von verkürzten Mittelhand- und Mittelfußknochen. Die Beobachtung von Bilgituren, dass Hypertonus und Brachydaktylie ausnahmslos gemeinsam auftraten, konnte bestätigt werden. Mit Hilfe von Röntgenbildern wurde die Brachydaktylieform als Typ E (BDE) mit Zapfenepiphysen klassifiziert (Abb. 2). Brachydaktylien (brachy=kurz; dactylos=Finger) sind infolge einer Störung der Extremitätenentwicklung in der frühen Embryogenese angeborene Hand- und Fußfehlbildungen. Sie sind charakterisiert durch die Verkürzung von Fingern und/oder Zehen, der Veränderungen an den Phalangeal- oder Metacarpal-/Metatarsalknochen zugrunde liegen. Klinisch werden Brachydaktylien in die fünf Typen A bis E klassifiziert.³⁷ Sie treten isoliert oder als Bestandteil eines komplexen Syndroms auf. BDE ist gekennzeichnet durch eine Verkürzung der Metacarpalia und Metatarsalia. Thomas Wienker konnte anhand des über sechs Generationen reichenden Stammbaums eine erfolgversprechende Wahrscheinlichkeit für die geplante Kopplungsanalyse berechnen. Der Weg für die molekulargenetische Aufarbeitung der Phänotypen Hypertonie und Brachydaktylie Typ E war geebnet. Neben unseren wissenschaftlichen Zielen war es unser wichtigstes Anliegen, mit der betroffenen türkischen Familie ein Vertrauensverhältnis aufzubauen und Mittel für deren medizinische Versorgung bereitzustellen.

Ab Herbst 1994 wurden die in der Türkei gewonnenen Blut- und Gewebeproben umfangreichen molekulargenetischen Analysen unterzogen. Sämtliche molekularen Untersuchungen fallen seit dem in meinen Verantwortungsbereich. Kopplungsanalysen durch aufwendige RFLPs (Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen) und Southernblots wurden zu dieser Zeit durch Mikrosatelliten-Marker ersetzt. Diese polymorphen genetischen Marker zeichnen sich durch sich wiederholende Di-, Tri- und Tetranukleotide aus. Die erste Karte mit genetischen Abständen der Mikrosatellitenmarker zueinander war für das gesamte humane

Genom durch das von Jean Dausset 1984 in Paris gegründete Institut *Centre d'Etude du Polymorphisme Humain* (CEPH) der wissenschaftlichen Gemeinschaft zur Verfügung gestellt worden.^{38, 39} Die damals übliche Vorgehensweise, diese über PCR von Probanden-DNA amplifizierten Polymorphismen radioaktiv zu markieren, wurde durch eine von der Firma Applied Biosystems Inc. (ABI) entwickelte Vorgehensweise ersetzt, die auf fluoreszenzmarkierten Mikrosatellitenmarkern und deren Auftrennung auf Lasersequenzierautomaten beruht. Die Kopplungsanalyse mit dem derzeit zur Verfügung stehenden Markersset ergab, dass der Kopplungsbereich für autosomal-dominante Hypertonie mit Brachydaktylie Typ E auf den kurzen Arm von Chromosom 12 in einem Intervall von 24 centiMorgan (cM) kartiert werden konnte.⁴⁰

Um einen Einblick in die pathologischen Vorgänge zu erhalten, die zu dieser schweren Hypertonie führen, wurden betroffene und nichtbetroffene Familienmitglieder in Berlin umfangreichen physiologischen Untersuchungen unterzogen. Sekundäre Hypertonieformen wurden durch Doppler-Sonographie der Nierenarterien sowie durch die Bestimmung der Reninaktivität, des Aldosteronspiegels und der Konzentration der Katecholamine ausgeschlossen. Unter Salzbelastung bzw. Salzzug wurden Volumenexpansions- und Volumenkontraktionsstudien durchgeführt.⁴¹ Diese Untersuchungen zeigten, dass der Hypertonus nicht kochsalzbedingt ist, was das Syndrom komplett von den vorher beschriebenen monogenen Hypertonieformen abgrenzt. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron Regelsystem war bei allen untersuchten hypertensiven Familienangehörigen völlig normal. Unauffällige Renin-, Angiotensin- und Aldosteronwerte sind für Patienten mit primärer Hypertonie ebenfalls charakteristisch. Zusätzlich stellte sich heraus, dass Endorganschäden begrenzt waren. Arteriosklerose, Nephrosklerose, Augenhintergrundveränderungen lagen nicht vor.⁴² Gefäßschädigungen waren trotz des schweren Hypertonus, der bei den Betroffenen zu einem Schlaganfall vor dem 50. Lebensjahr führt, minimal (Abb. 2). Das einzige hypertonieassoziierte Merkmal war ein erhöhter peripherer Gefäßwiderstand.

Die sich anschließenden molekulargenetischen Analysen waren darauf ausgerichtet, das Kopplungsintervall von 24 cM weiter einzugrenzen. Voraussetzung dafür war allerdings der Zugang zu weiteren informativen Familienmitgliedern aus der betroffenen türkischen Familie. Dieses Potential war jedoch bereits ausgeschöpft. Als Alternativen waren der Einschluss anderer Familien mit dem gleichen Syndrom oder aber die Analyse von DNA aus Patienten mit nachgewiesenen chromosomalen Aberrationen, die den gleichen Phänotyp aufweisen, möglich. Japanische Wissenschaftler berichteten zu dieser Zeit über ein Kind mit einer großen zytogenetisch auffälligen *de novo*-Deletion auf dem kurzen Arm von Chromosom 12.⁴³ Dieses Kind war außer von einer Reihe schwerer Anomalien auch von einer Brachydaktylie Typ E mit Zapfenepiphysen betroffen. Der Blutdruck des damals fünfjährigen Jungen war für sein Alter

grenzwertig hypertensiv. Durch Analyse der DNA von diesem Kind, seinen Eltern und Geschwistern konnten wir mittels Mikrosatellitenmarkern eine Überlappung der Deletion mit dem bereits bekannten Kopplungsintervall nachweisen.⁴⁴ Da beide Brachydaktylien völlig identisch waren, konnte nunmehr davon ausgegangen werden, dass das betroffene Gen zumindest für den Phänotyp Brachydaktylie das gleiche sein sollte. Kollegen aus Kanada, Frankreich, den USA und Südafrika stellten uns DNAs von weiteren, nicht-türkischen, Familien mit beiden Phänotypen zur Verfügung, die in die Kopplungsanalysen eingeschlossen wurden.⁴⁵⁻⁴⁷ Hakan Toka untersuchte während eines Aufenthaltes am Massachusetts General Hospital in Boston eine Familie, die bereits 1974 als typische BDE-Familie beschrieben worden war und durch kurzgliedrigen Kleinwuchs, kurze Mittelhand- und Mittelfußknochen, Zapfenepiphysen und einen autosomal-dominanten Erbgang charakterisiert war.^{46, 47} Auch in dieser Familie war eine vollständige Assoziation von BDE und Hypertonie nachweisbar, wobei der Bluthochdruck in der Zeit der Erstbeschreibung allerdings übersehen worden war. Nach der Genotypisierung der zusätzlichen Familien mittels Mikrosatellitenmarkern konnten wir durch die Konstruktion von Haplotypen das Kopplungsintervall auf dem kurzen Arm von Chromosom 12 um die Hälfte reduzieren.⁴⁸

Parallel zu den molekulargenetischen Analysen wurden weitere klinisch-pharmakologische Untersuchungen an 13 betroffenen Mitgliedern der eingangs erwähnten türkischen Familie vorgenommen, um die Pathophysiologie des Bluthochdrucks besser zu verstehen. Diese Untersuchungen wurden von Okan Toka in der Türkei durchgeführt. Dabei wurden die sechs von der WHO/ISH für die Behandlung von Bluthochdruck empfohlenen Medikamentenklassen in einer randomisierten Doppelblind-Cross-Over-Studie bezüglich ihrer Wirksamkeit getestet. Zum Einsatz kamen ein Beta-Blocker, ein Alpha-Blocker, ein Kalziumkanalblocker, ein ACE-Hemmer, ein Thiaziddiuretikum und der Imidazolinrezeptoragonist Moxonidin. Beta-Blocker, Alpha-Blocker, Kalziumkanalblocker und ACE-Hemmer senkten den Blutdruck im gleichen Maß um 6-10 mmHg, während das Diuretikum und Moxonidin keinen Effekt zeigten, was das Ergebnis der ersten physiologischen Untersuchungen bestätigte. Die vorliegende monogene Form der Hypertonie ist salzunabhängig und entspricht der primären Hypertonie.⁴⁹ Um bei Betroffenen Blutdruckwerte im Normbereich zu erhalten, war die Kombination von drei Medikamentenklassen notwendig. Auch dieser Befund grenzte das hier vorliegende Syndrom von den anderen monogenen Hypertonieformen ab. Die Hoffnung, dass eine einzelne Medikamentenklasse Hinweise auf den Wirkmechanismus des vorliegenden Gendefektes auf molekularer Ebene geben würde, erfüllte sich nicht.

Die rostrale ventrolaterale Medulla oblongata (RVLM) des Hirnstamms spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Blutdrucks. Bereits 1901 veröffentlichte Harvey Cushing, einer der größten Neurochirurgen des 20. Jahrhunderts, dass eine Kompression des

Hirnstamms zu einem Blutdruckanstieg führen kann.⁵⁰ Im Bereich der RVLM Hirnstammregion liegen die Wurzeleingangszonen des 9. und 10. Hirnnervs, die Signale der kardiovaskulären Barorezeptoren aus dem Karotissinus und aus dem Aortenbogen zum Hirnstamm leiten. Aberrierende Schlingenbildung arterieller Gefäße in dieser Region kann zu einem Gefäß-Nerven-Kontakt führen. Durch den permanenten pulsatilen Kontakt kommt es zu funktionellen Irritationen dieser sensiblen Nerven. Gut bekannt sind diese sogenannten neurovaskulären Kontaktsyndrome aus der Neurologie. Ein Beispiel ist die Trigeminusneuralgie. Hier pulsiert die *Arteria cerebelli anterior* gegen das *Ganglion Gasserii* am Hirnstamm, was paroxysmale Schmerzen auslösen kann. Ein neurovaskuläres Kontaktsyndrom ist ebenfalls für die *Arteria cerebelli inferior posterior* bekannt, die im Bereich der rostralen ventrolateralen Medulla den Hirnstamm berührt. Im Primatenmodell führte diese Manipulation zur Fehlregulation des Barorezeptorreflexes und zu Hypertonie⁵¹. Operative mikrovaskuläre Dekompressionen in Patienten mit essentieller Hypertonie führten bei einer nicht unwesentlichen Anzahl von Patienten zu einer Normalisierung der Blutdruckwerte.^{52, 53} Bilginturan berichtete von seinem angiographischen Befund über die Präsenz geschlängelter Intrakranialgefäße in einem betroffenen Patienten der türkischen Hypertonie/BDE-Familie. Des Weiteren ließen die bislang durchgeführten physiologischen Untersuchungen einen gestörten Barorezeptorreflex vermuten. Um die Hypothese zu überprüfen, dass neurovaskuläre Gefäßanomalien ein neurovaskuläres Kontaktsyndrom bedingen und über eine gestörte Barorezeptorfunktion für den schweren Hochdruck verantwortlich sind, wurden in der Türkei Magnetresonanztomographien des Hirnstamms an 15 hypertensiven und 12 normotensiven Mitgliedern der türkischen Familie durchgeführt. Die Befunde wiesen daraufhin, dass sämtliche Betroffene ein neurovaskuläres Kontaktsyndrom mit linksseitigen Schlingen der *Arteria cerebelli inferior posterior* (PICA) aufwiesen, wohingegen Nichtbetroffene keine abnormalen Gefäßschlingen zeigten (Abb. 2).⁵⁴ Spätere detaillierte Untersuchungen in der Franz-Volhard-Klinik belegten sehr überzeugend, dass die Kapazität des Baroreflexes, Blutdruckerhöhungen abzapfen, bei den Betroffenen nahezu nicht vorhanden war.^{55, 56}

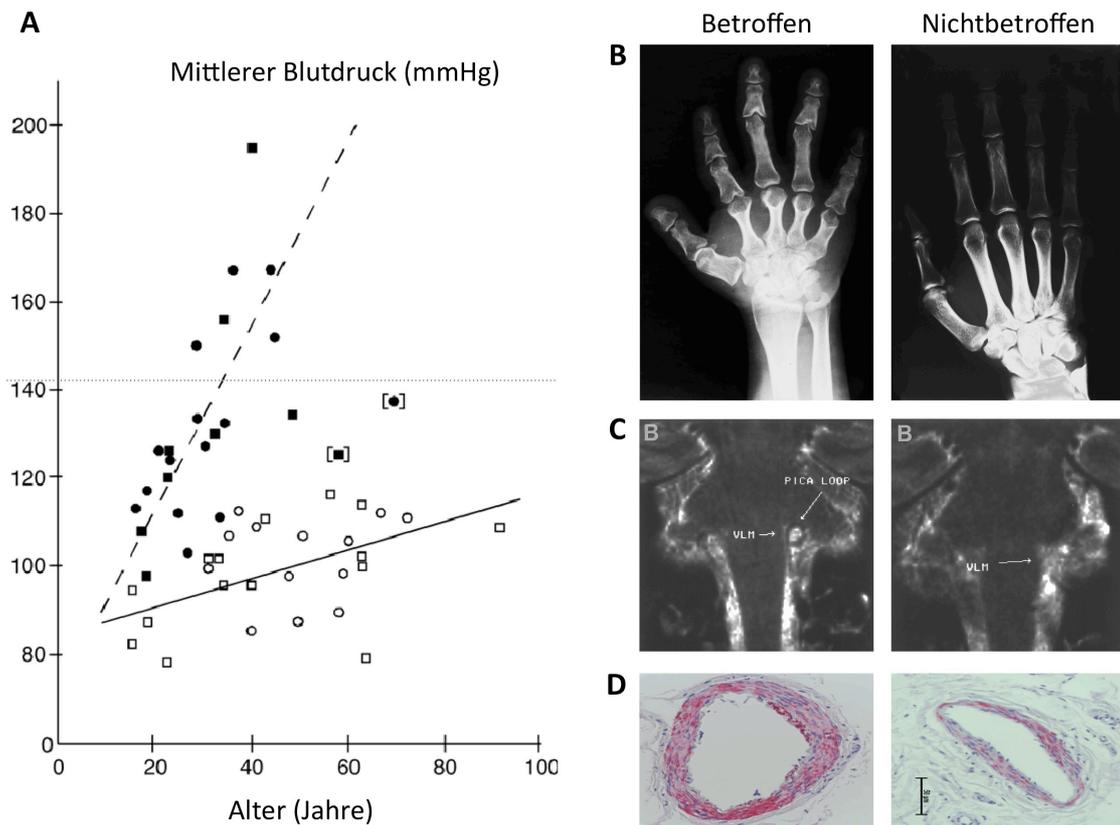


Abb. 2: Phänotypen des Bilguturan-Syndroms.

A. Gezeigt sind die Unterschiede im mittleren arteriellen Blutdruck zwischen betroffenen (ausgefüllte Symbole) und nichtbetroffenen (offene Symbole) Mitgliedern der türkischen Hypertonie/BDE Familie. Die in Klammern stehenden Symbole verweisen auf Patienten, die zum Zeitpunkt der Messungen bereits auf eine antihypertensive Therapie eingestellt waren. **B.** Das Handröntgenbild eines betroffenen Familienmitgliedes (links) demonstriert die typischen Charakteristika einer Typ-E-Brachydaktylie. **C.** In der Magnetresonanztomographie des Hirnstamms eines Betroffenen ist ein neurovaskuläres Kontaktsyndrom mit linksseitigen Schlingen der *Arteria cerebelli inferior posterior* (PICA) nachweisbar, die die ventrolaterale Medulla (VLM) berührt (links). **D.** Die Tunica media der peripheren Arterien von Betroffenen ist durch eine Hyperplasie der glatten Gefäßmuskulatur gekennzeichnet (links).

Die klinischen Befunde von Patienten mit Hypertonie/BDE legen den Bezug zu essentieller Hypertonie nahe. Bestärkend für eine allgemeine Relevanz des zugrundeliegenden genetischen Mechanismus wäre der Kopplungsnachweis für Hypertonie der gleichen Region auf Chromosom 12 in einem Patientenkollektiv essentieller Hypertoniker. Isolierte Populationen sind für die Erforschung komplexer genetischer Erkrankungen wie der Hypertonie ein wertvolles Ausgangsmaterial, da sie auf wenige Populationsgründer zurückzuführen sind und der Austausch genetischen Materials durch die isolierten Lebensumstände limitiert ist. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Norbert Hübner gelang es, den Genort für essentielle

Hypertonie (ohne Brachydaktylie) in einer großen chinesischen Familie und einer Vielzahl von Kernfamilien aus einer isolierten ländlichen Gegend in China auf dem kurzen Arm von Chromosom 12 nachzuweisen. Beide Kopplungsintervalle überlappten sich nahezu vollständig.⁵⁷

Bis zur Veröffentlichung des humanen Genoms im Jahr 2001 hatten wir auf der Basis von YACs (*Yeast Artificial Chromosomes*), BACs (*Bacterial Artificial Chromosomes*) und PACs (*P1-derived Artificial Chromosomes*) eine physikalische Karte der Kopplungsregion von Chromosom 12 erstellt, mit deren Hilfe potentielle Kandidatengene auf deren Lokalisation hin überprüft werden konnten. Von den wichtigsten Genen klärten wir die Exon-Intron-Struktur auf, um Mutationsanalysen anschließen zu können. Dazu gehörten unter anderen das Gen des humanen Sulfonylharnstoffrezeptors 2 (*SUR2* alias *ABCC9*, *ATP-binding cassette sub-family C member 9*) und das Gen der chondrogenen Variante von *SOX5* (*L-SOX5*; *SRY sex determining region Y-box 5*). Nach der Sequenzierung des menschlichen Genoms waren 18 Gene im Kopplungsintervall annotiert.^{58, 59} Die Überprüfung von mehr als 200 Exonen der potentiellen Kandidatengene von betroffenen Familienmitgliedern erbrachte keinen Hinweis auf das Vorliegen von Mutationen in diesen Genen.

Chromosomale Umbauten (Rearrangements) können durch die Veränderung der chromosomalen Architektur die Expression und Regulation von Genen wesentlich beeinflussen, was seit der Entdeckung des Positionseffektes in *Drosophila melanogaster* 1930 durch Herrmann Muller bekannt ist.⁶⁰ Der Umstand, dass in keinem der positionellen Gene eine funktionelle Mutation nachgewiesen werden konnte, ließ uns die Möglichkeit einer chromosomalen Aberration in Erwägung ziehen. Größere chromosomale Umbauten waren nach G-Bänderung der Metaphase-Chromosomen ausgeschlossen worden. Die Hypertonie/BDE-Patienten zeigten einen in dieser Auflösung unauffälligen Karyotyp. Dies führte uns zu der Hypothese, dass eine mögliche Inversion zwischen phänotyprelevanten Kandidatengenen innerhalb der Kopplungsregion deren Genregulation, ähnlich wie bei einem Positionseffekt, beeinflussen könnte. Der Nachweis von mittelgroßen Inversionen, die in der Metaphase durch Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) nicht auflösbar waren, war durch die Kombination von drei Fluoreszenzfarben im Interphasekern 2001 zum ersten Mal gezeigt worden.⁶¹ Auf der Grundlage der physikalischen Karte der Kopplungsregion wurden fünf BACs bzw. PACs ausgewählt, die in genomischer Nähe zu vier Kandidatengenen kartiert waren, diese aber nicht überspannten. Anita Rauch vom Humangenetischen Institut in Erlangen setzte die fünf BACs in fünf verschiedenen Kombinationen, markiert mit jeweils drei Fluoreszenzfarben, für eine FISH-Analyse an Interphasekernen (i-FISH) von betroffenen und nichtbetroffenen Mitgliedern der türkischen Familie ein. Tatsächlich wiesen die Ergebnisse darauf hin, dass chromosomale Rearrangements mit Deletionen, Reinsertionen und Inversionen innerhalb des

Kopplungsintervalls ausschließlich in Betroffenen vorliegen.⁶² Um die Ausdehnung der einzelnen Rearrangements besser eingrenzen und untersuchen zu können, ob chromosomale Rearrangements in jedem Fall ein Charakteristikum des Syndroms sind, wurde die Anzahl der BACs auf zwanzig und die Anzahl der Kombinationen auf mehr als 60 erweitert und die i-FISH-Experimente nunmehr an Patienten aus fünf unterschiedlichen Familien durchgeführt. Von den untersuchten Patienten wiesen alle vom Syndrom Betroffenen Rearrangements auf, die für jede Familie verschieden waren, jedoch ausnahmslos einen invertierten chromosomalen Abschnitt als Gemeinsamkeit aufwiesen. Die Abfrage von Datenbanken ergab keinen Anhaltspunkt für die Präsenz bekannter proteinkodierender Gene in diesem Bereich, jedoch Hinweise auf vier ESTs (Expressed Sequenced Tags), partielle Transkripte aus cDNA-Bibliotheken. Wir versuchten aus RNA unterschiedlicher humaner Gewebe, basierend auf den bekannten EST-Sequenzen, die vollständigen Transkripte aufzuklären. Dabei wurde eine genähnliche Struktur nachgewiesen, die aus 32 Exonen besteht und die in unterschiedlichen Geweben in unterschiedlichem Maße transkribiert und verschieden gespleißt wird. Die Transkripte schienen keinen offenen Leserahmen zu kodieren. Dieser Befund legte nahe, dass diese genähnliche Struktur nicht für ein Protein kodiert, sondern dass es sich bei den „Genprodukten“ aller Wahrscheinlichkeit nach um nichtkodierende RNAs (*non-coding RNAs*; ncRNAs) handeln sollte. Eines der Exone (Exon 22) wurde in kultivierten primären Fibroblasten von betroffenen Patienten nicht exprimiert. Die Ergebnisse von *In-silico*-Analysen zeigten, dass die RNA-Sekundärstruktur der Exon22-Sequenz der einer microRNA ähnelte.⁶³

Im Jahr 2009 besuchten wir erneut die türkische Familie an der Schwarzmeerküste. Unsere Besuche sind einerseits von wissenschaftlich-medizinischem Interesse bestimmt, andererseits geprägt von einem persönlichen Verantwortungsgefühl gegenüber den Patienten. Die Versorgung der meisten Patienten mit Antihypertensiva erfolgt nach wie vor von Deutschland aus. Okan Toka, jetzt Kinderkardiologe an der Universität Erlangen, untersuchte im Rahmen dieser Reise den Hochdruck bei Kleinkindern genauer, was bei der Ersterfassung der Familie ca. 15 Jahre zuvor nicht in dieser Qualität möglich war. In die ersten Kopplungsanalysen waren entsprechend nur Kinder eingeschlossen worden, die zum Zeitpunkt der Untersuchung älter als 10 Jahre waren. Interessanterweise ergaben die nun erhobenen Daten von 30 Kindern, dass die Messung des Blutdrucks ein zuverlässigerer Prädiktor als BDE für die Diagnose des Syndroms ist.⁶⁴

Außer auf die direkte Untersuchung des Hypertonie/BDE-Syndroms war unser Interesse auch auf isolierte BDE-Familien gerichtet, um möglicherweise eine gemeinsame molekulare Basis der Typ-E-Brachydaktylie zu finden. Die genetischen Ursachen der meisten der Brachydaktylietypen wurden in den letzten Jahren aufgeklärt.⁶⁵ Für die Brachydaktylietypen D und E waren bis zu diesem Zeitpunkt in einzelnen Individuen Mutationen in *HOXD13*

beschrieben.⁶⁶ Das Gen *HOXD13* ist auf Chromosom 2 lokalisiert und konnte somit als Ursache für die hier vorliegende BDE ausgeschlossen werden. Philipp Maass nahm im Rahmen seiner Promotionsarbeit die molekulare Charakterisierung einer BDE-assoziierten balancierten Translokation t(8;12)(q13;p11.2) vor. Dabei wurden die Translokationsbruchpunkte, von denen einer auf dem kurzen Arm von Chromosom 12 lokalisiert war, jedoch ca. 4,6 Millionen Basenpaare vom Kopplungsintervall für Hypertonie/BDE entfernt, kloniert und sequenziert. Innerhalb der Bruchpunktsequenz konnten zwei Transkriptionsfaktorbindungsmotive nachgewiesen werden, ein AP-1-Motiv auf Chromosom 12p11.2 und ein C-ets-1-Motiv, transloziert von Chromosom 8q13. In chondrogen differenzierten Fibroblasten der Translokationspatienten war die Expression des benachbarten Gens *PTH LH* (*Parathyroid Hormone Like Hormone*) aufgrund der translokationsbedingt veränderten epigenetischen Situation 86 Kilobasen vor seinem Promotor vermindert.⁶⁷ Etwa zeitgleich publizierte die Arbeitsgruppe um Stefan Mundlos (Charité, MPI für Molekulare Genetik, Berlin) Mutationen in isolierten kleinwüchsigen BDE-Familien direkt im *PTH LH*-Gen, die zu einem Funktionsverlust des Gens führten.⁶⁸ *PTH LH* war damit neben *HOXD13* das einzige bekannte mit Kleinwuchs assoziierte BDE-Gen. *PTH LH* kodiert für das dem Parathormon ähnliche *Parathyroid hormone-related protein* (PTHrP). PTHrP wurde 1987 als ursächlich für die humorale Hyperkalzämie von Malignomen (*humoral hypercalcemia of malignancy*, HHM) entdeckt und seine cDNA kloniert.⁶⁹⁻⁷¹ PTHrP wird in einer Vielzahl von Zelltypen und Gewebearten synthetisiert und agiert über autokrine, parakrine, endokrine und intrakrine Wirkmechanismen. Trotz der Tatsache, dass PTHrP seit nunmehr 25 Jahren im Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen steht, ist seine komplexe Funktionsweise weiterhin nur unvollständig aufgeklärt.⁷² Sowohl *PTH LH*-Knockout-Mäuse als auch transgene Mäuse, in denen das Gen in Chondrozyten überexprimiert wird, zeigten schwere Skelettanomalien.^{73, 74} Spätere Arbeiten untermauerten seine zentrale Bedeutung in der Skelettentwicklung.⁷⁵ *PTH LH* war durch seine zytogenetische Kartierung auf den kurzen Arm von Chromosom 12 unser erstes prominentes Kandidatengen für Hypertonie/BDE. Dafür sprach zum einen seine Beteiligung an der Ausbildung des Skeletts, zum anderen, seine Expression in Gefäßen und die vasorelaxierenden Eigenschaften von PTHrP in Ratten, was *PTH LH* als ein potentiell hypertonieassoziiertes Gen attraktiv erscheinen ließ.⁷⁶ Jedoch bereits 1995 schlossen wir *PTH LH* durch einen verfügbaren intragenischen Polymorphismus mittels Kopplungsanalyse aus dem Kopplungsintervall für Hypertonie/BDE aus.⁴⁰

Die chondrogene Regulation von *PTH LH* war für uns weiterhin von großem Interesse, auch unter dem Aspekt, dass die Inversionsregion des Hypertonie/BDE-Syndroms möglicherweise regulativ auf die Expression von *PTH LH* Einfluss haben könnte. Bisher waren trotz der vielfältigen gewebespezifischen Funktionen von *PTH LH* keine *cis*-regulatorischen

Elemente für dieses Gen bekannt. Philipp Maass identifizierte u. a. ein an der Gliedmaßenentwicklung beteiligtes regulatives DNA-Element auf dem langen Arm von Chromosom 12 (*CISTR-ACT*), das sowohl *in cis* mit *PTHLH* als auch *in trans* mit dem Gen des chondrogenen Transkriptionsfaktors *SOX9* auf Chromosom 17 interagiert. In diesen Regulationsmechanismus greift zusätzlich eine lange nichtkodierende RNA (lncRNA) ein. Wir konnten anhand zweier Translokationsfamilien mit BDE zeigen, dass die translokationsbedingte Störung der komplexen Interaktion zum Phänotyp BDE führt.⁷⁷

Trotz intensiver arbeits-, zeit- und materialaufwendiger Anstrengungen, die komplexen chromosomalen Rearrangements in den Familien mit Hypertonie/BDE mittels konventioneller Methoden wie *Southernblotting* und Klonierung aufzuklären, entzogen sich die Bruchpunkte bisher ihrer Identifikation. Die neuen technologischen Möglichkeiten der *Next-Generation-Sequenzierung* erlauben aber seit kurzem die basengenaue Aufklärung des gesamten individuellen Genoms. Die Sequenzierung der Genome von betroffenen und nichtbetroffenen Familienangehörigen von drei Familien wurden von uns in Auftrag gegeben. Die Daten nehmen mehrere Terabyte auf Festplatten ein und werden gegenwärtig von uns analysiert. Wir erwarten einen weiteren Einblick in die chromosomale Architektur des Kopplungsintervalls auf Chromosom 12. Unser Labor hat sich inzwischen auch auf zellbiologischer Ebene erheblich weiter entwickelt. Es ist uns gelungen, mesenchymale Stammzellen von Patienten zu gewinnen, zu kultivieren und zu differenzieren. Das MDC und unsere nationalen und internationalen Kooperationen bieten uns die Möglichkeit, dieses Syndrom aufzuklären. Wir hoffen, mit unserem Beitrag Patienten mit primärer Hypertonie in Zukunft besser helfen zu können. Dieses Projekt ist nicht nur für uns alle eine persönliche Herausforderung, sondern beschreibt auch sehr anschaulich die enormen wissenschaftlichen Entwicklungen der letzten Jahre auf dem Gebiet der Humangenetik.

2. Originalarbeiten

2.1 Schwerer, autosomal-dominant vererbter Bluthochdruck und Brachydaktylie in einer türkischen Familie kartiert auf das humane Chromosom 12

Schuster H*, Wienker TE*, **Bähring S**, Bilginturan N, Toka HR, Neitzel H, Jeschke E, Toka O, Gilbert D, Lowe A, Ott J, Haller H, Luft FC. *Severe autosomal dominant hypertension and brachydactyly in a unique Turkish kindred maps to human chromosome 12*. Nature Genetics, 1996. 13(1): p. 98-100. (* geteilte Erstautorschaft)

Familien, in denen der pathologisch und genetisch komplexe Phänotyp Hypertonie als monogener Erbgang auftritt, sind selten. Sie bieten die einzigartige Möglichkeit, mittels klassischer Kopplungsanalyse den für die Erkrankung relevanten genetischen Defekt chromosomal zu lokalisieren und molekulargenetisch aufzuklären. Für das Verständnis der multifaktoriell bedingten Pathophysiologie der essentiellen Hypertonie können auf diesem Weg Gene und deren Proteine als Hauptakteure entschlüsselt werden.

Die von Bilginturan et al. 1973 beschriebene Familie mit autosomal-dominant vererbter Brachydaktylie und schwerem Hypertonus wurde von uns im Rahmen einer genetischen Feldstudie reanalysiert.³⁶ Blutdruck und Herzfrequenz wurden oszillometrisch im Stehen und Liegen über 20 Minuten aufgezeichnet, Größe und Gewicht gemessen und Hand- und Fußphotographien aufgenommen. 60 Familienmitglieder waren in die Studie eingeschlossen.

Der autosomal-dominante Erbgang beider kosegregierender Merkmale wurde bestätigt. Alle betroffenen Personen zeigten Brachydaktylie, die mit individuell variierenden Ausprägungen hauptsächlich die Metakarpalien betraf. Der Anstieg des altersabhängigen mittleren Blutdrucks verlief in der Gruppe der betroffenen Familienangehörigen deutlich steiler. Haupttodesursache unter den Betroffenen war Schlaganfall vor Vollendung des 50. Lebensjahrs. Die Verkürzung insbesondere des vierten und fünften Mittelhandknochens ähnelte den Handanomalien in *Albright's hereditary osteodystrophy* (OMIM: 103580), jedoch waren die von uns untersuchten Patienten weder mental retardiert noch adipös.^{78, 79}

Nachdem die zytogenetische Analyse keine nachweisbaren chromosomalen Aberrationen lieferte, führten wir eine genomweite Kopplungsanalyse mittels fluoreszenzmarkierter Mikrosatellitenmarker mit einem durchschnittlichen genetischen Abstand von 10 cM durch. Kinder unter 10 Jahren waren aufgrund des noch nicht sicher definierbaren Phänotyps aus dieser ausgeschlossen. Als altersunabhängiges und damit verlässliches Merkmal wurde die Brachydaktylie gewählt. Wir kartierten den Krankheitslocus auf den kurzen Arm von

Chromosom 12 in ein 24 cM Intervall zwischen die Marker D12S364 und D12S87. In der Mehrpunktanalyse wurde ein maximaler Lodscore von 9,29 am Markerlocus D12S310 erreicht.

Wir postulierten, dass beide Phänotypen entweder durch ein einzelnes pleiotropes Gen oder zwei im Kopplungsintervall lokalisierte Gene verursacht werden sollten. Das zu dieser Zeit auf Chromosom 12p11 zytogenetisch kartierte, hinsichtlich seiner vasorelaxierenden Wirkung vielversprechende Kandidatengen *PTHLH* wurde mittels eines VNTR- Polymorphismus (*Variable Number Tandem Repeat polymorphism*) aus der Kopplungsregion ausgeschlossen.⁸⁰

Wir schlussfolgerten, dass ein Gendefekt, der im Alter von 50 Jahren einen Blutdruckunterschied von 50 mmHg verursacht, auf einen bedeutsamen Mechanismus in der Blutdruckregulation hinweisen und somit das (die) betroffene(n) Gen(e) ebenfalls in der essentiellen Hypertonie eine ursächliche Rolle spielen könnte.

Seite 19 - 21 Originalarbeit

Schuster H, Wienker TE, Bähring S, Bilginturan N, Toka HR, Neitzel H, Jeschke E, Toka O, Gilbert D, Lowe A, Ott J, Haller H, Luft FC. *Severe autosomal dominant hypertension and brachydactyly in a unique Turkish kindred maps to human chromosome 12*. Nature Genetics, 1996. 13(1): p. 98-100. doi:10.1038/ng0596-98

<http://www.nature.com/ng/journal/v13/n1/abs/ng0596-98.html>

2.2 Eine Deletion auf 12p in einem japanischen Kind mit Brachydaktylie überlappt mit dem Locus für Brachydaktylie und Hypertonie in einer türkischen Familie

Bähring S, Nagai T, Toka HR, Nitz I, Toka O, Aydin A, Mühl A, Wienker TF, Schuster H, Luft FC. *Deletion at 12p in a Japanese child with brachydactyly overlaps the assigned locus of brachydactyly with hypertension in a Turkish family*. American journal of human genetics, 1997. 60(3): p. 732-5.

Chromosomale Aberrationen können die positionelle Klonierung krankheitsrelevanter Gene unter Umständen erleichtern. Unsere Literaturrecherche zu zytogenetisch kartierten chromosomalen Rearrangements, die den kurzen Arm von Chromosom 12 einschlossen und mit einem Skelettphänotyp bzw. Bluthochdruck assoziiert waren, ließ uns auf die Beschreibung eines 5 Jahre alten Jungen mit einem chondroektodermaldysplasieähnlichen Syndrom stoßen. Nagai et al. beschrieb 1995 diesen japanischen Jungen, der neben einer Thoraxdystrophie, einer milden mentalen Retardierung, Kleinwuchs, hypoplastischer Haut, Haar und Oligodontie eine Brachydaktylie mit Zapfenepiphysen aufwies.⁴³ Sein Karyogramm zeigte eine *de novo*-Deletion Del(12)(p11.21p12.2).

Der Vergleich der Brachydaktylie mit der eines in etwa gleichaltrigen Jungen einer türkischen Familie mit Hypertonie/BDE ergab eine ausgeprägte Ähnlichkeit. Beide zeigten Zapfenepiphysen des Typs 16 nach Giedion an den interphalangealen Gelenken.⁸¹ Die Hände wiesen jeweils eine Brachyphalangie der zweiten bis vierten Finger und eine Brachymesophalangie der Finger vier und fünf auf. Der Blutdruck des Deletionspatienten war altersentsprechend an der Grenze zum Hochdruck. Dagegen waren gleichaltrige Kinder der türkischen Hypertonie/BDE-Familie deutlich hypertensiv.

Wir fanden eine Überlappung zwischen dem Kopplungsintervall für Hypertonie/BDE und der Del(12)(p11.21p12.2) mit Hilfe der Genotypisierung von Mikrosatellitenmarkern des Deletionspatienten und seiner phänotypisch unauffälligen Eltern und Geschwister. Wir schlussfolgerten, dass es sich in beiden Fällen um das gleiche BDE-relevante Gen handeln sollte. Der Genlocus wurde durch die beiden Marker D12S1682 und D12S1057 definiert. Aufgrund der durch Haploinsuffizienz verursachten BDE des japanischen Jungen postulierten wir einen Funktionsverlust des Brachydaktyliegens im Hypertonie/BDE-Syndrom.

Seite 23 - 26 Originalarbeit

Bähring S, Nagai T, Toka HR, Nitz I, Toka O, Aydin A, Mühl A, Wienker TF, Schuster H, Luft FC. *Deletion at 12p in a Japanese child with brachydactyly overlaps the assigned locus of brachydactyly with hypertension in a Turkish family.* American journal of human genetics, 1997. 60(3): p. 732-5.
PMCID: PMC1712511

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1712511>

2.3 Familien mit autosomal-dominanter Brachydaktylie Typ E, Kleinwuchs und schwerer Hypertonie

Toka, HR, **Bähring S**, Chitayat D, Melby JC, Whitehead R, Jeschke E, Wienker TF, Toka O, Schuster H, Luft FC. *Families with autosomal dominant brachydactyly type E, short stature, and severe hypertension*. *Annals of internal medicine*, 1998. 129(3): p. 204-8.

In dieser Arbeit beschreiben wir zwei weitere Familien mit autosomal-dominantem Hypertonie/BDE-Syndrom und die Kartierung des Krankheitslocus. Ziel der Arbeit war es, zum einen zu verifizieren, ob Hypertonie/BDE in diesen Familien auf den kurzen Arm von Chromosom 12 beschränkt bleibt, und zum anderen zu überprüfen, ob durch zusätzliche Familien der Krankheitslocus weiter eingeschränkt werden kann.

Beide Familien waren englischer Abstammung. DNA von einer aus 11 Mitgliedern bestehenden Familie aus Kanada wurde uns von David Chitayat zur Verfügung gestellt. Sechs der Familienmitglieder waren vom Syndrom betroffen.⁴⁵ Die zweite, eine siebenköpfige Familie mit vier betroffenen Personen, wurde von Hakan Toka in den USA rekrutiert. Hinsichtlich des Phänotyps BDE war diese bereits publiziert worden.^{46, 47} Die assoziierte Hypertonie war jedoch nicht zur Kenntnis genommen worden. Die betroffenen Mitglieder dieser Familien zeigten alle charakteristischen Phänotypen für das Syndrom wie Hypertonie, BDE mit Zapfenepiphysen, Kleinwuchs und Schlaganfall.

Die Genotypisierung aller verfügbaren Familienmitglieder und die vergleichende Haplotypanalyse erlaubte die Zuordnung des ursächlichen Krankheitslocus beider Familien auf Chromosom 12p und eine drastische Reduzierung des Kopplungsintervalls für das Hypertonie/BDE-Syndrom auf einen genetischen Abstand von 6 cM zwischen die Marker D12S1650 und D12S1057.

Damit konnten wir zeigen, dass autosomal-dominante Hypertonie/BDE nicht auf einen türkischen genetischen Hintergrund begrenzt ist. Unsere Vermutung war, dass das Syndrom häufiger auftritt, als es als solches erkannt wird.

Seite 28 - 32 Originalarbeit

Toka, HR, Bähring S, Chitayat D, Melby JC, Whitehead R, Jeschke E, Wienker TF, Toka O, Schuster H, Luft FC. *Families with autosomal dominant brachydactyly type E, short stature, and severe hypertension*. Annals of internal medicine, 1998. 129(3): p. 204-8. doi:10.7326/0003-4819-129-3-199808010-00008

<http://annals.org/article.aspx?articleid=711593>

2.4 Autosomal-dominante Hypertonie mit Brachydaktylie Typ E wird durch ein Rearrangement auf dem kurzen Arm von Chromosom 12 verursacht

Bähring S, Rauch A, Toka O, Schroeder C, Hesse C, Siedler H, Fesüs G, Haefeli WE, Busjahn A, Aydin A, Neuenfeld Y, Mühl A, Toka HR, Gollasch M, Jordan J, Luft FC. *Autosomal-dominant hypertension with type E brachydactyly is caused by rearrangement on the short arm of chromosome 12*. Hypertension, 2004. 43(2): p. 471-6.

Die minimale Kopplungsregion für Hypertonie/BDE enthielt drei Gene, deren funktionelle Beteiligung an der Regulation des Blutdrucks plausibel erschien. Es handelte sich dabei um den ATP-abhängigen Kaliumkanal Kir6.1 (Gen: *KCNJ8*; *potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 8*) und dessen regulatorische Untereinheit SUR2 (*ABCC9*). Wie in den bereits etablierten Mausmodellen könnte ein Funktionsverlust des ATP-abhängigen Kaliumkanals auch beim Menschen zu einer erhöhten Kontraktion der Gefäßmuskulatur führen.^{82, 83} Ein weiteres Gen war *PDE3A* (*Phosphodiesterase 3A, cGMP-inhibited*). *PDE3A* hydrolisiert cAMP und cGMP mit hoher Affinität und wechselseitig kompetitiv⁸⁴. Ein Funktionszugewinn (*gain-of-function*) von *PDE3A* könnte durch eine gesteigerte cAMP-Hydrolyse zu unzureichenden cAMP-Konzentrationen führen, was wiederum eine reduzierte Aktivierung von cAMP-abhängigen Proteinkinasen und damit einen erhöhten Gefäßwiderstand bedingen würde.⁸⁵ Unmittelbar proximal zum Kopplungsintervall, jedoch über SNPs als für Hypertonie/BDE ursächlich ausgeschlossen, war das für die Chondrogenese essentielle Gen *L-SOX5* lokalisiert.^{86, 87} Mutationsanalysen der Exone dieser vier Gene mittels Sanger-Sequenzierung waren negativ.

Hinsichtlich der überzeugenden Phänotyprelevanz dieser Gene prüften wir die Hypothese, dass durch eine Inversion zwischen dem potentiellen BDE-Gen *SOX5* und einem (oder mehreren) der drei möglichen hypertonierelevanten Gene wichtige regulatorische Elemente abkoppelt sein könnten, was zu einer Fehlregulation der betroffenen Gene führen sollte.

Mit fünf BACs bzw. PACs, die in unmittelbarer Nähe zu den Kandidatengenen positioniert waren, diese aber nicht überspannten, führten wir FISH an Interphasekernen von betroffenen und nichtbetroffenen türkischen Familienmitgliedern durch. Wir identifizierten ein komplexes Rearrangement mit einer Deletion distal zu *PDE3A* und Reinsertion innerhalb des Kopplungsintervalls und einer zusätzlichen Inversion distal zu *SOX5*. Die *Kir6.1/SUR2* flankierenden BACs/PACs waren in die chromosomalen Umbauten nicht involviert.

Den Einfluss der Rearrangements auf die Funktionalität der Kandidatengene studierten wir an sechs betroffenen und vier nicht betroffenen Mitgliedern der türkischen Familie. Kleine Arterien

wurden aus Gesäßbiopsien präpariert. Ihre Kontraktibilität wurde unter Zugabe von KCl und Norepinephrin und die Relaxation nach Exposition von Cromakalim (ATP-abhängiger Kaliumkanalöffner), Glibenclamid (ATP-abhängiger Kaliumkanalinhibitor) und Milrinon (PDE3-Inhibitor) im Myographen gemessen. Milrinon führte zu einer erhöhten Relaxation in zwei Patienten. Mittels qRT-PCR wurde die Expression der vier Kandidatengene verifiziert. *PDE3A* wurde in den älteren Betroffenen höher exprimiert als in jüngeren und Nichtbetroffenen. Die Änderung des Unterarm-Blutflusses wurde nach Infusionen von Diazoxid (ATP-abhängiger Kaliumkanalöffner), Isoproterenol (beta-Adrenorezeptor-Agonist) und Milrinon bestimmt. Sie war jedoch nicht signifikant unterschiedlich zwischen den beiden Gruppen. Systemisch zeigten Betroffene eine deutlichere Reaktion des Blutdrucks auf Diazoxid und Nitroprussid (Vasorelaxanz) und eine stärkere Reaktion der Herzfrequenz auf Isoproterenol als Nichtbetroffene.

Die wichtigste Erkenntnis dieser Arbeit war, dass Hypertonie/BDE ein Rearrangement-Syndrom ist. Ob die untersuchten Kandidatengene in ihrer Funktionalität aufgrund der chromosomalen Umbauten beeinflusst sind, konnte nicht hinreichend geklärt werden. *PDE3A* war in Abhängigkeit vom Alter der Betroffenen in kleinen Arterien höher exprimiert. Arterienringe der Betroffenen relaxierten stärker nach PDE3-Inhibition, was jedoch auch bei niedriger Expression bei einem der Studienteilnehmer der Fall war. Diese Diskrepanz blieb ungeklärt. Wir vermuteten, dass eine höhere vaskuläre *PDE3A*-Expression möglicherweise nicht die Ursache der Hypertonie sondern die Folge des erheblichen Blutdruckanstiegs im Alter ist.

Bähring S, Rauch A, Toka O, Schroeder C, Hesse C, Siedler H, Fesüs G, Haefeli WE, Busjahn A, Aydin A, Neuenfeld Y, Mühl A, Toka HR, Gollasch M, Jordan J, Luft FC. *Autosomal-dominant hypertension with type E brachydactyly is caused by rearrangement on the short arm of chromosome 12*. Hypertension, 2004. 43(2): p. 471-6. doi: 10.1161/01.HYP.0000111808.08715.ec

<http://hyper.ahajournals.org/content/43/2/471>

2.5 Eine Inversionsregion auf Chromosom 12p ist verantwortlich für Hypertonie und Brachydaktylie und zeichnet sich durch multiples Spleißen und nichtkodierende RNA aus

Bähring S, Kann M, Neuenfeld Y, Gong M, Chitayat D, Toka HR, Toka O, Plessis G, Maass P, Rauch A, Aydin A, Luft FC. *Inversion region for hypertension and brachydactyly on chromosome 12p features multiple splicing and noncoding RNA*. Hypertension, 2008. 51(2): p. 426-31.

Unsere intensiven klinischen Untersuchungen der türkischen Familie mit Hypertonie/BDE-Syndrom belegten, dass neben den Hauptphänotypen schwerer Bluthochdruck, Brachydaktylie Typ E und Kleinwuchs eine Reihe weiterer intermediärer Phänotypen das Syndrom charakterisieren. Die Hypertonie ist nicht salzsensitiv und es bedarf unterschiedlicher Medikamentenklassen, um den Blutdruck effektiv zu senken.^{41, 49} Betroffene Familienangehörige zeigen eine gestörte Barorezeptorfunktion und weisen ein neurovaskuläres Kontaktsyndrom mit linksseitigen Schlingen der *Arteria cerebelli inferior posterior* (PICA) auf.⁵⁴⁻⁵⁶ Kultivierte Hautfibroblasten Betroffener haben im Vergleich mit Fibroblasten Nichtbetroffener eine höhere Proliferationsrate.⁴¹ Die arterielle Gefäßwand der Patienten ist aufgrund einer Hyperplasie der Tunica media verdickt. Als molekulare Ursache des Syndroms waren komplexe chromosomale Umbauten innerhalb der Kopplungsregion in der türkischen Familie nachgewiesen worden.⁶²

In dieser Arbeit wurde anhand von FISH-Analysen von Interphasekernen in fünf unterschiedlichen Familien gezeigt, dass chromosomale Rearrangements mit Hypertonie/BDE assoziiert sind. Experimentell wurden 20 verschiedenfarbig fluoreszenzmarkierte BACs/PACs in 64 unterschiedlichen Dreierkombinationen auf Interphasekerne von jeweils mindestens zwei Betroffenen und einem Nichtbetroffenen jeder Familie hybridisiert. Die nachgewiesenen Rearrangements waren für jede der Familien spezifisch, beinhalteten jedoch alle eine Inversion mit einem überlappenden minimalen Intervall. Datenbankanalysen wiesen dieses als eine genfreie Region aus, in der vier kartierte ESTs vorlagen. Um vollständige cDNAs zu generieren und gegebenenfalls einen offenen Leserahmen (ORF) zu identifizieren, wurden von den ESTs ausgehend 5'- bzw. 3'-RACE-(*rapid amplification of cDNA ends*) PCRs mit RNA phänotyprelevanter fetaler Gewebe (Aorta, Gehirn, Knorpel) durchgeführt. Insgesamt wurden zusätzlich zu den bekannten ESTs 16 unterschiedlich gespleißte partielle Transkripte und 12 RT-PCR Produkte mit in Abhängigkeit vom Ausgangsgewebe unterschiedlicher Exon-Nutzung gefunden. Keines der Transkripte verfügte über einen ORF, der größer als 89 Aminosäuren war und eine vorhersagbare Kozak-Sequenz zur Translationsinitiation aufwies. Wir identifizierten eine genähnliche Struktur von 32 Exons sowohl in *sense*- als auch *antisense*-Orientierung.

Um zu überprüfen, ob aufgrund der Inversion und der damit einhergehenden veränderten chromosomalen Umgebung die regelrechte Expression der verschiedenartig gespleißten Transkripte beeinträchtigt ist, wurden alle Spleißvarianten mittels qRT-PCRs in Fibroblasten betroffener und nichtbetroffener Familienmitglieder der türkischen Familie getestet. Während zehn Varianten keine differentielle Expression zeigten, wurden zwei der zwölf Transkripte ausschließlich in Fibroblasten nichtbetroffener Personen exprimiert. Beide RT-Amplikons trugen das gemeinsame Exon22. Exon 22 war auf genomischer Ebene in den Betroffenen nicht deletiert, wurde jedoch nicht transkribiert.

Eine *In-silico*-Analyse mit dem microRNA-Vorhersageprogramm MiRscan ergab Hinweise auf das Vorliegen einer für microRNAs typischen Haarnadelstruktur. microRNAs sind kleine nichtkodierende RNAs von ca. 21-23 Nukleotiden Länge, die über eine unvollständig komplementäre Bindung bevorzugt in der 3'UTR von Transkripten zu translationaler Repression und mRNA-Destabilisierung führen.^{88, 89} Der Nachweis der vorhergesagten microRNA gelang exemplarisch in der Fraktion kleiner Fibroblasten-RNAs eines Nichtbetroffenen, jedoch nicht eines Betroffenen.

Das Hypertonie/BDE-Syndrom zeichnet sich durch multiple Phänotypen aus. Unsere Daten legten nahe, dass es sich bei dem zugrundeliegenden genetischen Defekt um eine Inversion handelt. Fehlregulierte nichtkodierende RNAs, die eine Vielzahl von Zielgenen regulativ beeinflussen, könnten an der Ausprägung des phänotypischen Spektrums beteiligt sein.

Seite 43 - 48 Originalarbeit

Bähring S, Kann M, Neuenfeld Y, Gong M, Chitayat D, Toka HR, Toka O, Plessis G, Maass P, Rauch A, Aydin A, Luft FC. *Inversion region for hypertension and brachydactyly on chromosome 12p features multiple splicing and noncoding RNA*. Hypertension, 2008. 51(2): p. 426-31.
doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.101774

<http://hyper.ahajournals.org/content/51/2/426>

2.6 Hypertonie im Kindesalter bei autosomal-dominanter Hypertonie und Brachydaktylie

Toka O, Maass PG, Aydin A, Toka H, Hübner N, Rüschenndorf F, Gong M, Luft FC, **Bähring S.** *Childhood hypertension in autosomal-dominant hypertension with brachydactyly.* Hypertension, 2010. 56(5): p. 988-94.

Die bisherigen phänotypischen Beschreibungen des Hypertonie/BDE-Syndroms bezogen sich auf aus erwachsenen Betroffenen gewonnene Daten und Erkenntnisse. Die nunmehr durchgeführte Studie hatte zum Ziel, Kriterien zur Diagnostik des Syndroms und der Behandlung des Hochdrucks im Kindesalter zu erstellen. In diesem Zusammenhang sollten insbesondere das erste Auftreten dokumentiert und die altersabhängige Entwicklung des Hypertonus und der Brachydaktylie verfolgt werden.

Ein erneuter Besuch der Familie in der Türkei im Jahr 2009 ermöglichte es, 30 Kinder im Alter von 1 bis 17 Jahren genauer zu untersuchen, von denen 12 vom Syndrom betroffen und 18 nicht betroffen waren. Verglichen wurden das Geburtsgewicht, Größe und Gewicht unter der Benutzung türkischer Perzentilen, die Längen der Metakarpalien, Basophalangen, Mesophalangen und Telephalangen, systolischer, diastolischer und mittlerer Blutdruck nach oszillometrischer Messung im Sitzen und Liegen.^{90, 91} Für die Analyse wurden beide Gruppen jeweils in die Altersgruppen vor und nach dem präpubertären Wachstumsschub unterteilt (1 bis 9 Jahre bzw. 10-17 Jahre).

Betroffene Kinder zeigten schon zur Geburt ein signifikant geringeres Geburtsgewicht. Adipositas im Kindesalter gehörte nicht zum Phänotyp. Brachydaktylie und Kleinwuchs waren mit Sicherheit erst nach dem präpubertären Wachstumsschub diagnostizierbar. Dagegen lagen die Blutdruckwerte aller betroffenen Kinder über der 99. altersabhängigen Perzentile. Damit konnten bereits Kinder ab dem dritten Lebensjahr eindeutig als hypertensiv klassifiziert werden.

Zusätzlich bestätigten wir in dieser Arbeit den Locus der Kopplungsregion des Syndroms ausschließlich auf Chromosom 12p mit dem hochauflösenden genomweiten SNP-Array 6.0 von Affymetrix. Aufgrund der im Vergleich zur initialen Mikrosatellitenmarkeranalyse höheren Markerdichte konnte das Kopplungsintervall distal um 280 kb reduziert werden. Besonderes Augenmerk wurde auf die Analyse von Kopienummervariationen (CNVs, *Copy number variations*) gelegt. Es konnten keine mit dem Phänotyp gekoppelten größeren Deletionen bzw. Duplikationen nachgewiesen werden.

Der wichtigste Befund dieser Studie war, dass ein systolischer Blutdruck, der über der 99. altersabhängigen Perzentile liegt, das entscheidende Kriterium zur Diagnosestellung in den jüngsten Patienten war. Betroffene Kinder waren bereits vor dem präpubertären Wachstumsschub hypertensiv. Daraus folgend war unsere Empfehlung, Bluthochdruck als das leitende Diagnostikkriterium für Hypertonie/BDE-Syndrom im Kindesalter festzulegen. Aufgrund der hohen Morbidität und Mortalität des Syndroms empfehlen wir, bereits in der frühen Kindheit mit einer antihypertensiven Therapie nach den entsprechenden Richtlinien zu beginnen.^{92, 93}

Seite 51 - 57 Originalarbeit

Toka O, Maass PG, Aydin A, Toka H, Hübner N, Rüschenndorf F, Gong M, Luft FC, Bähring S.
Childhood hypertension in autosomal-dominant hypertension with brachydactyly. Hypertension, 2010.
56(5): p. 988-94. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.156620

<http://hyper.ahajournals.org/content/56/5/988>

2.7 Ein *cis*-Regulator ist verantwortlich für die Herunterregulation von *PTH1H* bei der Translokation t(8;12)(q13;p11.2) und führt zu Brachydaktylie Typ E

Maass PG, Wirth J, Aydin A, Rump A, Stricker S, Tinschert S, Otero M, Tsuchimochi K, Goldring MB, Luft FC, **Bähring S**. *A cis-regulatory site downregulates PTH1H in translocation t(8;12)(q13;p11.2) and leads to Brachydactyly Type E*. Human molecular genetics, 2010. 19(5): p. 848-60.

Translokationen sind chromosomale Strukturaberrationen, die direkt durch die initialen Chromosomenbrüche innerhalb von Genen oder durch Änderung der Chromosomenarchitektur krankheitsassoziiert auftreten und weitervererbt werden können.

Sigrid Tinschert rekrutierte am Humangenetischen Institut der Charité eine Familie mit einer über vier Generationen segregierenden BDE. Der Erbgang war autosomal-dominant. Die betroffenen Familienmitglieder waren jedoch nicht hypertensiv. Im Indexpatienten war karyotypisch eine Translokation t(8;12)(q13;p11.2) nachgewiesen worden, die mit dem Phänotyp BDE generationenübergreifend assoziiert war. Die Familie war für uns von großem Interesse, da einer der Bruchpunkte nach G-Bänderung zur chromosomalen Bande 12p12.1-p11.2 des Kopplungsintervalls für Hypertonie/BDE zugeordnet werden konnte. Gegebenenfalls wäre das gleiche Gen verantwortlich für die Ausprägung der BDE beim Hypertonie/BDE-Syndrom.

Initial wurden im Metaphase-FISH die Bruchpunkte unter Nutzung von fluoreszenzmarkierten YACs und BACs kartiert. Der Bruchpunkt 12p11.2 befand sich proximal zur Hypertonie/BDE-gekoppelten Region. Die anschließende Feinkartierung erfolgte über *Pulse-Field-Elektrophoresen* und *Southernblotting*. Im Anschluss daran wurden die Bruchpunkte mittels PCR amplifiziert und sequenziert. Der Bruchpunkt auf dem derivativen Chromosom 8 [der(8)] wurde ca. 86 kb entfernt zum Exon 1 von *PTH1H* (Chromosom 12p11.2) lokalisiert. Der Bruchpunkt auf dem derivativen Chromosom 12 [der(12)] wurde im Intron 2 des Gens *KCNB2* (Chromosom 8q13) identifiziert. *KCNB2* wurde als chondrogenes Entwicklungsgen u. a. anhand von *In-situ*-Hybridisierungen in verschiedenen fetalen Mausstadien ausgeschlossen. *PTH1H* und sein Genprodukt PTHrP spielen in der Skelettentwicklung eine essentielle Rolle.⁷⁵ Die Charakterisierung der Bruchpunkte zeigte für der(8) hochkonservierte Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor AP-1 (*Activator protein 1*) auf 12p11.2 sowie ein Bindungsmotiv für C-ets-1, das infolge der Translokation von 8q13 auf der(8) verlagert wurde. Der der(12)-Bruchpunkt hingegen war nicht konserviert. Im EMSA (*electrophoretic mobility shift assays*) banden sowohl AP-1 (c-Jun) als auch C-ets-1 an den der(8)-Bruchpunkt. In ChIP (*chromatin*

immunoprecipitation)-Experimenten mit AP-1- bzw. C-ets-Antikörpern und Chromatin von chondrogen differenzierten Fibroblasten von einem BDE-Patienten konnten wir eine Anreicherung des der(8)-Bruchpunktes für beide Transkriptionsfaktoren nachweisen. Dagegen war am Wildtypallel des Chromosoms 12 die AP-1 Bindung reduziert und C-ets-1 nicht angereichert. Basierend auf diesen Daten und den zusätzlich nachgewiesenen euchromatischen Histonmodifikationen H3K4me1 und H3K4me3 postulierten wir für den der(8)-Bruchpunkt die Funktion eines *cis*-regulatorischen Elements. Wir folgerten, dass eine Dysregulation von *PTH LH* (infolge der Translokation zu einer gestörten chondrogenen Differenzierung und damit zur Ausprägung der BDE führt. Ursächlich dafür sollte entweder der direkte epigenetische Einfluss des der(8)-Bruchpunktes oder die translokationsbedingte Abkopplung gewebespezifischer *cis*-regulatorischer Elemente sein. Unsere Daten favorisierten die erstgenannte Möglichkeit.

Die chondrogene Differenzierung von Patienten- und Kontrollfibroblasten erlaubte den direkten Nachweis der spezifischen chondrogenen *PTH LH*-Expression am BDE-Phänotyp. *PTH LH* wurde nach chondrogener Induktion in nichtbetroffenen Individuen verstärkt exprimiert, wohingegen die Expression des Gens im BDE-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen gering war. Der gleiche Effekt auf die Expression konnte bei den direkten chondrogenen *PTH LH*-Zielgenen *ADAMTS-7* und *ADAMTS-12* nachgewiesen werden.^{94, 95}

Für eine weitere funktionelle Analyse des Regulationspotentials des der(8)-Bruchpunktes auf den *PTH LH*-Promotor wurden *in vitro* Reporterassays in einer murinen und einer humanen Chondrozytenzelllinie durchgeführt. Eine *consensus* C-ets-1 (EBS)-Sequenz, die Wildtypallel-Sequenz des Bruchpunkts auf Chromosom 12 wt(12) und der der(8)-Bruchpunkt wurden vor den *PTH LH*-Gesamtpromotor kloniert. Während AP-1 allein [wt(12)] die Aktivität des Promotors stark aktivierte, verhinderte die Präsenz der EBS-Bindungsstelle am der(8)-Bruchpunkt diesen Effekt. Wir schlussfolgerten, dass AP-1 einen positiven transaktivierenden Effekt auf den *PTH LH*-Promotor hat, während C-ets-1 als Folge der Translokation die von AP-1 vermittelte *PTH LH*-Expression negativ moduliert.

Die wichtigste Aussage dieser Studie war, dass eine translokationsbedingte Verminderung der Expression von *PTH LH* in der Chondrogenese ursächlich für BDE ist. Eine Verbindung dieses seit langem wissenschaftlich untersuchten Gens (3686 PubMed Einträge) zu einer humangenetischen Erkrankung war bis zu dieser Arbeit nicht bekannt. Kurze Zeit später veröffentlichten Klopocki et al., dass eine Deletion von und heterozygote Funktionsverlustmutationen in *PTH LH* ursächlich für isolierte BDE mit Kleinwuchs sind.⁶⁸

Zusätzlich zeigt unsere Arbeit die translokationsbedingte epigenetische Dysregulation des *PTHLH*-Gens durch die Transkriptionsfaktoren AP-1 und C-ets-1 am Bruchpunkt der(8).

Seite 61 - 73 Originalarbeit

Maass PG, Wirth J, Aydin A, Rump A, Stricker S, Tinschert S, Otero M, Tsuchimochi K, Goldring MB, Luft FC, Bähring S. *A cis-regulatory site downregulates PTHLH in translocation t(8;12)(q13;p11.2) and leads to Brachydactyly Type E*. Human molecular genetics, 2010. 19(5): p. 848-60.
doi:10.1093/hmg/ddp553

<http://hmg.oxfordjournals.org/content/19/5/848>

2.8 Eine deplazierte lncRNA verursacht Brachydaktylie beim Menschen

Maass PG, Rump A, Schulz H, Stricker S, Schulze L, Platzer K, Aydin A, Tinschert S, Goldring MB, Luft FC, **Bähring S**. *A misplaced lncRNA causes brachydactyly in humans*. The Journal of Clinical Investigation, 2012. 122(11): p. 3990-4002.

Primäres Ziel der Arbeit war die Detektion der *cis*-regulatorischen Elemente (CREs) von *PTH LH* während der Chondrogenese und die Aufklärung des Mechanismus ihrer aufgrund translokationsbedingter Positionseffekte veränderten Interaktion mit dem Zielgen, die im Fall zweier Translokationsfamilien zu BDE führten.

Wir untersuchten eine zweite Familie mit autosomal-dominanter BDE und einer balancierten Translokation t(4;12)(q13.2-13.3;p11.2). Der Bruchpunkt des derivativen Chromosoms 4 [der(4)] befand sich in einer Distanz von ca. 145 kb zu *PTH LH* und lag damit ca. 45 kb vom der(8)-Bruchpunkt der ersten Translokationsfamilie zentromerwärts gerichtet entfernt. Die Expression von *PTH LH* und seinen Zielgenen *ADAMTS-7* und *ADAMTS-12* war in chondrogen differenzierten Fibroblasten der BDE-Patienten stark reduziert und mit BDE in betroffenen Familienmitgliedern korreliert. Hypothetisch war in beiden BDE-Familien von einer translokationsbedingten Trennung *cis*-aktiver Regulatoren auszugehen, deren chromosomale Abkopplung die *PTH LH*-Dysregulation und die damit einhergehende BDE bedingten.

Um die nativen *PTH LH* CREs zu identifizieren, wurden an sonifiziertem Chromatin der humanen Chondrozytenzelllinie C28/I2 Chromatin-Immunopräzipitationen (ChIP) mit Antikörpern gegen RNA-Polymerase II und gegen die Histonmodifikation H3K4me1 durchgeführt und das isolierte Chromatin im Anschluss zirkularisiert (*chromosome conformation capture with ChIP, circularization and cloning* - 6C). Über inverse Ring-PCR mit Primersequenzen des *PTH LH*-Promotors wurden die im Chromatinkomplex gebundenen unbekanntes CREs amplifiziert und sequenziert. Der Promotor des chondrogenen Transkriptionsfaktors SOX9, dessen Regulation über gewebespezifische CREs bereits bekannt war, diente als Positivkontrolle. Für *PTH LH* wurden neun CREs auf Chromosom 12 und für *SOX9* vier CREs auf Chromosom 17 identifiziert. Überraschenderweise wurde eines der CREs im Abstand von mehr als 24,4 Mb zum *PTH LH*-Promotor auf Chromosom 12q ebenfalls *in trans* in Verbindung mit dem *SOX9*-Promotor nachgewiesen. Aufgrund der *cis*- und *trans*-chromosomalen Interaktion nannten wir dieses regulatorische Element *CISTR-ACT* (*cis and trans acting*).

Das regulatorische Potential auf den assoziierten Promotor von drei ausgewählten CREs mit dem höchsten Konservierungsgrad wurde mittels Reporterassays verifiziert.

Voraussetzung für eine funktionale räumliche Interaktion zwischen einem entfernt lokalisierten CRE und dem zugehörigen Promotor ist die Bildung einer Chromatinschleife (*chromatin loop*). Auch *trans*-Interaktionen sollten sich durch geringe nukleäre Distanzen physikalisch nachweisen lassen. In Kolokalisations-FISH-Experimenten an C28/I2-Interphasekernen wurden die Distanzen zwischen jeweils einem CRE und dem assoziierten Promotor mikroskopisch vermessen und im Vergleich zu angemessenen Kontrollen einer statistischen Analyse unterzogen. Die drei ausgewählten CREs und ihre Interaktionen *in cis* bzw. *in trans* ließen den Schluss zu, dass sie eine signifikant geringere nukleäre Distanz zu *PTHLH* oder *SOX9* aufwiesen als die Kontrollen.

Interessanterweise fanden wir einen die *CISTR-ACT*-Region überspannenden EST im *UCSC Genome Browser*. In *RACE*-Experimenten an C28/I2-RNA identifizierten wir diesen als lange nicht-polyadenylierte nichtkodierende RNA (lncRNA). lncRNAs können, analog zu Enhancern, Zielgene regulieren, die mehrere Megabasen von ihnen entfernt liegen.⁹⁶ Wir stellten die Frage, ob diese lncRNA selbst einen regulativen Einfluss auf die Expression von *PTHLH in cis* und *SOX9 in trans* hat. Die Depletion der lncRNA und der Transkripte der beiden kodierenden Gene *PTHLH* und *SOX9* in der Chondrozytenzelllinie C28/I2-Zellen mittels siRNA deckte ein expressionsabhängiges Netzwerk auf, wobei die Repression der lncRNA zur Verminderung der *PTHLH*- und *SOX9*-Expression führte, die Depletion von *PTHLH* und *SOX9* jedoch die Expression der lncRNA verstärkte.

Genomweit konnten wir im Expressionsarray nach Depletion bzw. Überexpression der lncRNA in C28/I2-Zellen nachweisen, dass Cluster mit chromatinremodulierenden Genen und essentiellen Morphogenesegenen der frühen Gliedmaßenentwicklung und der Chondrogenese differentiell exprimiert werden.

Im nächsten Schritt untersuchten wir, ob und inwieweit die beiden Translokationen t(4;12)(q13.2-13.3;p11.2) und t(8;12)(q13;p11.2) neben einer reduzierten *PTHLH*-Expression auch eine veränderte Expression der lncRNA und *SOX9* in chondrogen differenzierten Fibroblasten der BDE-Patienten bedingen. Im BDE-Patientenmaterial war, äquivalent zur Depletion von *PTHLH* in C28/I2-Zellen, die Expression der lncRNA signifikant erhöht. *SOX9* war nur unwesentlich niedriger exprimiert als in den Kontrollen. Um zu ermitteln, ob beide Gene durch die lncRNA direkt okkupiert werden und ob die Interaktion zwischen den betroffenen Genen und der lncRNA in BDE-Translokationspatienten gestört ist, nutzten wir die Methode der Chromatinisolation mittels RNA-Aufreinigung (ChIRP - *chromatin isolation by RNA purification*).

Wir konnten zeigen, dass die lncRNA in der Chondrozytenzelllinie an beide Gene bindet, sowohl an *PTHLH* als auch an *SOX9*. In BDE-Translokationspatienten war die Bindung an *PTHLH* jedoch signifikant geringer. Die Bindung an das *SOX9*-Gen war in Patienten nahezu unverändert.

Analoge Experimente mit Maus- und Rattenchondrozytenlinien belegten, dass es sich bei *CISTR-ACT* um einen evolutionär konservierten Mechanismus handelt, der auch die regulativen Effekte einer nichtkonservierten lncRNA auf *PTHLH* und *SOX9* einschließt.

In transgenen Mausembryonen mit dem humanen und Maus-*CISTR-ACT* wiesen wir eindeutig die mesenchymale und prächondrogene Beteiligung des Regulators während der Gliedmaßenentwicklung nach.

Unsere Daten belegen, wie eine translokationsvermittelte Unterbrechung der *PTHLH*–(*CISTR-ACT*)-Assoziation zur Erkrankung BDE führt. Sie geben einen neuen Einblick in die Komplexität der dahinter liegenden molekularen pathogenen Mechanismen. Chromosom 12 (*PTHLH*; *CISTR-ACT*) und Chromosom 17 (*SOX9*) nehmen im Zellkern benachbarte Territorien ein.⁹⁷ Wir postulierten, dass *PTHLH* und *SOX9* einer chondrogenen Transkriptionsfabrik angehören. Im Falle der hier untersuchten Translokationen verbleibt das derivative Chromosom 12 und somit *CISTR-ACT* in seinem chromosomalen Territorium und kann weiterhin mit *SOX9* kommunizieren, wohingegen *PTHLH* in das Territorium des Chromosoms 8 bzw. 4 transloziert wird. Damit ist ein Zugang zu seinem Regulator *CISTR-ACT* verhindert. Die gewebespezifische rückgekoppelte Expressionsregulation von *PTHLH* und lncRNA kann nicht stattfinden, was zu einer gestörten Chondrogenese und im Ergebnis zur Ausprägung des BDE-Phänotyps führt.

Seite 77 - 89 Originalarbeit

Maass PG, Rump A, Schulz H, Stricker S, Schulze L, Platzer K, Aydin A, Tinschert S, Goldring MB, Luft FC, Bähring S. *A misplaced lncRNA causes brachydactyly in humans*. The Journal of Clinical Investigation, 2012. 122(11): p. 3990-4002. doi: 10.1172/JCI65508

<http://www.jci.org/articles/view/65508>

3. Diskussion

Die Aufklärung der genetischen Ursachen der Hypertonie verspricht eine objektive, von bekannten physiologischen Vorgängen unabhängige, Herangehensweise, die Pathogenese des Bluthochdrucks zu verstehen, was zukünftig gegebenenfalls zur Identifizierung neuer Zielmoleküle für therapeutische Interventionen führen kann. Neuere Studien bestätigen die genetische Determiniertheit des Blutdrucks und schätzen ihren Anteil auf 31-67%.^{98, 99} Trotz des beträchtlichen technologischen Fortschritts gestaltet sich die Identifizierung der genetischen Mechanismen, die der essentiellen Hypertonie, aber auch anderen komplexen humanen Erkrankungen zugrunde liegen, weiterhin schwierig. Der Großteil der genetischen Faktoren bleibt aufgrund der Komplexität des Merkmals Hypertonie weiter ungeklärt. Mit großer Wahrscheinlichkeit ist die Blutdruckvariabilität in der allgemeinen Bevölkerung auf eine höhere Anzahl von Genen und deren Regulatoren als erwartet zurückzuführen. Dabei hat jedes Gen für sich möglicherweise nur einen kleinen Effekt auf die Regulation des Gesamtgeschehens.

Einen großen Fortschritt hinsichtlich der Identifikation von neuen blutdruckrelevanten Genen versprach man sich durch genomweite Assoziationsstudien (*GWAS; genome wide associaten studies*). *GWAS* nutzen Sets genomweit relativ dicht verteilter häufiger SNPs (*common variants*). In den letzten Jahren wurden, auf große Personengruppen mit vielen tausend Probanden zurückgreifend, mehrere *GWAS* mit systolischem und diastolischem Blutdruck als quantitatives Merkmal durchgeführt. Diese *GWAS* identifizierten 41 Loci mit der ausreichenden signifikanten statistischen Assoziation.¹⁰⁰⁻¹⁰⁵ Sie bestätigten die Annahme, dass zahlreiche genetische Varianten den Blutdruck in der menschlichen Population beeinflussen. Jedoch hatte jede der bisher auf diesem Wege identifizierten Varianten nur einen sehr geringen Effekt auf den Blutdruck. So wurde abgeschätzt, dass 29 Loci nur ca. 0,9% der phänotypischen Varianz am systolischen und diastolischen Blutdruck erklären.¹⁰⁴ Der gemeinschaftliche Effekt aller über *GWAS* identifizierten blutdruckassoziierten Loci erklärt nur ca. 2% der Blutdruckheritabilität.¹⁰⁶ Dafür gibt es mehrere mögliche Erklärungen: Erstens ist die für die SNP-Arrays ausgewählte Variantendichte zu gering. Es ist deshalb relativ unwahrscheinlich, dass die ursächlichen Polymorphismen tatsächlich auf dem Array enthalten sind und detektiert werden können. Zweitens sind SNPs nur Marker für potentielle genomische Loci. Sie können im Kopplungsungleichgewicht (*linkage disequilibrium*) liegen und eine weit größere genomische Region und damit andere funktionelle Varianten repräsentieren. Drittens bezieht sich die Auswertung der assoziierten SNPs nur auf die unmittelbar benachbarten Gene. Epigenetische Kontrollregionen werden damit nicht erfasst. Unsere eigenen Daten haben gezeigt, dass Kontrollregionen in großer Distanz zum regulierten Gen oder gar auf anderen Chromosomen

lokalisiert sein können.⁷⁷ Erstaunlicherweise wurde nur eines der vorher in monogenen Hochdruckfamilien gefundenen Gene in GWAS detektiert (CYP17A1).¹⁰⁶ Die Definition von klinischen Subphänotypen könnte für den Nachweis seltener assoziierter Varianten daher geeigneter sein als die Nutzung der Blutdruckwerte als alleiniges quantitatives Merkmal selbst. Varianten von blutdruckregulierenden Genen mit größeren Effekten können relativ rar sein, so dass sie in der Breite der Kohorte nicht signifikant genug assoziiert sind. Eine eindrucksvolle Studie lieferte das Labor von Richard Lifton. In mehr als 5000 Personen der *Framingham Heart Study* suchten sie nach Mutationen in drei Genen (*SLC12A3*, *SLC12A1*, *KCNJ1*), die für die monogenen rezessiven Erkrankungen Bartter-Syndrom und Gitelman-Syndrom ursächlich sind. Beide Syndrome sind durch niedrigen Blutdruck und Salzverlust charakterisiert. In diesen drei Genen wurden 30 funktionelle Mutationen gefunden, die im heterozygoten Zustand mit niedrigeren Blutdruckwerten assoziiert und protektiv für Hypertonie waren. Bei den Mutationen handelte es sich um seltene Varianten, die jedoch einen relativ großen Effekt auf den Blutdruck hatten.¹⁰⁷ Zusätzlich verdeutlichte diese Studie erneut zwei grundlegende Sachverhalte: Zum einen wurde bestätigt, dass die veränderte renale Salz-Wasser-Regulation zur Blutdruckvarianz in der Allgemeinbevölkerung beiträgt, und zum anderen wird wiederholt erkennbar, dass die Untersuchung seltener monogener Formen komplexer Erkrankungen zur Identifizierung von Genen nach wie vor wichtige grundlegende Erkenntnisse zum pathophysiologischen Gesamtgeschehen liefert.³⁵

Die Niere ist nur eines der zur Blutdruckhomöostase beitragenden Systeme. Sie kontrolliert den Salz-Wasser-Haushalt und somit das zirkulierende Blutvolumen. Neue Studien belegen, dass dabei dem Interstitium der Haut als Natriumspeicherreservoir eine entscheidende Bedeutung zukommt, da es die Wirkung der Natriumanreicherung auf das intravaskuläre Volumen und den Blutdruck puffern kann.¹⁰⁸ Vasoaktive Hormone, die Aktivität des zentralen und autonomen Nervensystems, immunologische und Entzündungsprozesse und nicht zuletzt die Kontraktibilität der Gefäßmuskulatur sind an der Regulation des Blutdrucks beteiligt.¹⁰⁹ Hypertonierelevante Gene sollten in allen diesen physiologischen Regelsystemen zur Blutdruckvarianz beitragen.

Das Bilginturan-Syndrom als autosomal-dominant vererbte Hypertonie, die ohne Ausnahme in Assoziation mit BDE auftritt, entspricht pathophysiologisch der essentiellen Hypertonie in der Allgemeinbevölkerung. Unbehandelt führt der enorme Bluthochdruck zu Schlaganfall vor dem 50. Lebensjahr. Die Hypertonie ist das leitende Diagnostikkriterium des Syndroms und bereits im frühen Kindesalter nachweisbar.⁶⁴ Unsere weitreichenden klinischen und physiologischen Untersuchungen konnten sekundäre Hypertonieformen und eine Beteiligung der Salz-Wasser-Regulation ausschließen.⁴¹ Ähnlich wie bei essentiellen Hypertonikern senkt nur die Kombination mehrerer antihypertensiver Medikamentenklassen den Blutdruck normgerecht.⁴⁹

Zusätzlich konnten wir eine Reihe intermediärer Phänotypen charakterisieren. Betroffene zeigen einen erhöhten Gefäßwiderstand, der mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine Hyperplasie der peripheren Gefäßmuskulatur zurückzuführen ist.⁶³ Hautfibroblasten Betroffener zeichnen sich durch eine erhöhte Proliferationsrate aus.⁴¹ Beides lässt auf einen Einfluss der genetischen Ursache(n) für das Syndrom auch auf die Zellzyklusregulation schließen. In allen untersuchten Patienten mit dem Syndrom sind Gefäßanomalien in Form von Gefäßschlingen der *Arteria cerebelli inferior posterior* (PICA) im Bereich der linksseitigen ventrolateralen Medulla nachweisbar, was für ein neurovaskuläres Kontaktsyndrom spricht.⁵⁴ Der Beweis dafür, dass der neurovaskuläre Kontakt tatsächlich den Hypertonus bedingt, wurde bislang jedoch nicht erbracht. Das Risiko, das mit einem neurochirurgischen Eingriff zur mikrovaskulären Dekompression einhergeht, ist unverhältnismäßig hoch und daher von uns nicht verantwortbar. Das autonome Nervensystem ist an der Ausprägung des Hochdrucks beim Hypertonie/BDE-Syndrom beteiligt. Betroffene haben eine Störung des Barorezeptorreflexes und sind nicht in der Lage, Blutdruckschwankungen zu puffern, wohingegen die Baroreflexkontrolle der Herzrate nur geringfügig gestört ist.^{55, 56} Ein Ausdruck der Barorezeptorfunktionalität ist die Änderung des systolischen und diastolischen Blutdrucks zwischen liegender und stehender Position. Die systolische Blutdruckdifferenz bei Lageveränderung wurde in einer anderen genomweiten Kopplungsanalyse auf den kurzen Arm von Chromosom 12 als einzigem Locus kartiert; dieser überlappt mit dem Hypertonie/BDE-Locus.¹¹⁰ Überraschenderweise sind selbst bei älteren Patienten mit Hypertonie/BDE keine Arteriosklerose, Nephrosklerose oder Augenhintergrundveränderung nachweisbar.⁴² Auch die sonst bei Hypertoniepatienten häufig auftretende linksventrikuläre Hypertrophie ist trotz der enormen Blutdruckwerte nur schwach ausgeprägt. Neben den beschriebenen pathogenen Effekten scheinen die dem Syndrom zugrundeliegenden genetischen Defekte offenbar auch eine protektive Wirkung hinsichtlich hochdruckbedingter Folgeschäden zu haben.

Die Kopplungsanalyse unter Einbeziehung von fünf Familien mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund und dem japanischen Deletionspatienten führte zu einem Kopplungsintervall von 6 cM auf dem kurzen Arm von Chromosom 12. Physikalisch erstreckt sich diese Region im humanen Referenzgenom vom Februar 2009 (UCSC; GRCh37/hg19) über eine Distanz von 3.178.336 bp, die zwischen den SNP-Markern rs2044316 und rs1899920 lokalisiert ist. Die distale Grenze des Intervalls wird durch die in den USA rekrutierte Familie festgelegt. Die proximale Grenze definiert die türkische Familie. Die chromosomale Region überlappt mit dem Locus für essentielle Hypertonie in einem chinesischen Patientenkollektiv, was die Bedeutung des Chromosomenabschnittes für den komplexen Phänotyp Bluthochdruck unterstreicht.⁵⁷ Von vier Familien und einem spontanen Fall mit Hypertonie/BDE verfügten wir über kultivierte Zellen. Mittels FISH an Interphasekernen konnten wir in allen Fällen individuelle familiäre

chromosomale Rearrangements innerhalb der Kopplungsregion nachweisen. Allen Rearrangements war eine Inversion im proximalen Teil des Kopplungsintervalls oder über diesen hinaus gemeinsam.⁶³ Der minimale gemeinsame invertierte Chromosomenabschnitt umfasst ca. 453 kb, wird durch die BACs RP11-114G22 und CITB-345P1 definiert und befindet sich zwischen den beiden Genen *ETNK1* (*ethanolamine kinase 1*) und *SOX5*.

In Positionsklonierungsstrategien zur Identifikation von krankheitsassoziierten Genen ist jedes im Kopplungsintervall lokalisierte Gen aufgrund seiner allelischen Kosegregation mit dem Phänotyp ein Positionskandidat.¹¹¹ Nachdem die Mutationsanalysen der ersten Gene nach Aufklärung der Exon-Intron-Struktur auf der Basis von BAC- und PAC-Klonen durch uns erfolgt war, basierte sie nachfolgend auf dem humanen Referenzgenom der Bilder hg16, hg17 und hg18 (<http://genome.ucsc.edu>). Im März 2006 waren 18 Gene im Kopplungsbereich annotiert. In keinem der Gene war eine Mutation mittels Sanger-Sequenzierung nachweisbar. Auf der Grundlage von vier ESTs identifizierten wir in der Inversionsregion insgesamt 32 Exone, die entweder auf dem Plus- oder auch auf dem Minusstrang der DNA liegen. In Abhängigkeit vom Ausgangsgewebe wurden diese in unterschiedlicher Weise zu lncRNAs gespleißt.⁶³ Die Anzahl der Gene im humanen Referenzgenom des aktuellen Bildes GRCh37/hg19 hat sich um nur einen ORF (*open reading frame*) erhöht, jedoch sind eine Vielzahl annotierter Transkripte mit zusätzlichen Exonen, aktualisierten UTRs (*untranslated regions*), Spleißvarianten, lncRNAs und microRNAs hinzugekommen. Die von uns identifizierten lncRNAs sind heute ebenfalls fast vollständig in den Datenbanken (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>; UCSC: Human mRNAs, Spliced ESTs) enthalten (Abb. 3). Um einen vollständigen Überblick aller Sequenzvarianten im Kopplungsintervall zu erhalten und die genomische Struktur der Rearrangements aufzuklären, wurden DNAs von Mitgliedern dreier Familien mit Hypertonie/BDE einer genomweiten Sequenzierung unterworfen. Die Daten werden gegenwärtig analysiert.

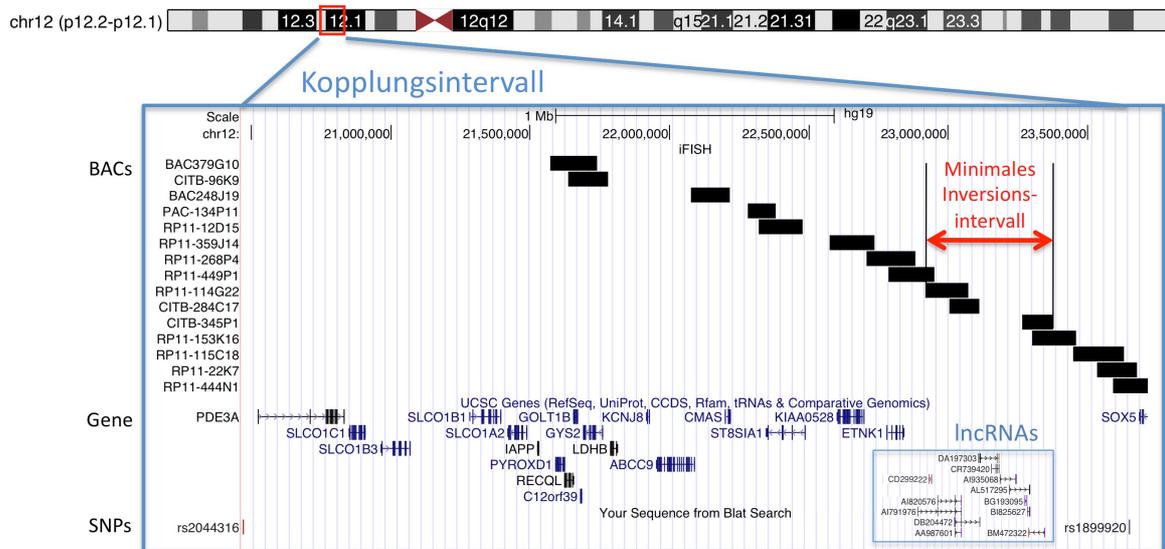


Abb. 3: Kopplungsintervall für Hypertonie/BDE auf dem kurzen Arm von Chromosom 12.

Die physiologischen und molekularbiologischen funktionellen Untersuchungen der phänotyprelevanten Kandidatengene *PDE3A*, *KCNJ8/ABCC9* und *SOX5* lieferten keine hinreichenden Belege für deren Kausalität für das Syndrom.⁶² *KCNJ8/ABCC9* und *SOX5* waren in den untersuchten Patientenmaterialien von Fibroblasten und peripheren Arterien im Vergleich zu nichtbetroffenen Kontrollpersonen nicht differentiell exprimiert. Die Expression von *PDE3A* war ausschließlich in den peripheren Gefäßen älterer Betroffener erhöht. In Fibroblasten Betroffener war für keines der 18 Gene ein Expressionsunterschied zu Nichtbetroffenen nachweisbar (unveröffentlichte Daten). Zehn Spleißvarianten der lncRNAs der Inversionsregion zeigten ebenfalls keine differentielle Expression in Fibroblasten betroffener und nichtbetroffener Familienmitglieder. Zwei der zwölf Transkripte wurden allerdings ausschließlich in Fibroblasten nichtbetroffener Personen exprimiert. Sie enthielten beide ein Exon, für das eine für microRNAs typische Sekundärstruktur vorhergesagt werden konnte.⁶³ Die nur partielle Komplementarität zu den Zieltranskripten ermöglicht einer einzelnen microRNA die regulatorische Einflussnahme auf eine Vielzahl unterschiedlichster Proteine innerhalb einer Zelle. Unser Ziel war es, die Existenz der vorhergesagten microRNA gewebespezifisch nachzuweisen, ihre Zieltranskripte zu identifizieren und eine mögliche differentielle Expression der Proteine in Betroffenen und Nichtbetroffenen zu untersuchen, um einen kausalen Zusammenhang zu Hypertonie/BDE zu belegen. Unter Berücksichtigung unserer Befunde, dass Hypertonie/BDE eine Erkrankung ist, die im Skelett-, im Gefäß- und im Nervensystem manifestiert ist, wählten wir verschiedene humane Zelllinien, die die phänotyprelevanten Gewebe repräsentieren. Wir konnten im *Northern Blot* niedrig exprimierte kleine RNAs von 18, 21 und 24 Nukleotiden nachweisen. Zum

experimentellen Nachweis, welche Proteine durch die Wirkung dieser kleinen RNAs gegebenenfalls reprimiert würden, transfizierten wir die microRNA in humane Chondrozyten (C28/12) und Endothelzellen (EA.hy926) unter Zusatz von Aminosäuren, die mit stabilen Isotopen markiert waren (pSILAC; *pulsed stable-isotope labeling with amino acids in cell culture*). Die neu synthetisierten Proteine wurden massenspektrometrisch analysiert. Die dabei identifizierten, negativ regulierten Proteine gaben Einblicke in Signalwege der Chondrogenese und Angiogenese. Unter ihnen fanden wir Mitglieder des TGF-beta-Signalweges, u. a. Endoglin (unveröffentlichte Daten). Entscheidend für die syndrombezogene Rolle der microRNA ist jedoch deren differentielle Regulation im Patienten- versus Kontrollgewebe. Fibroblasten und LCLs waren die einzig verfügbaren zellulären Ressourcen von Patienten und deren nichtbetroffenen Familienangehörigen. In ihnen war eine differentielle Expression zwischen Betroffenen und Nichtbetroffenen nicht nachweisbar. Wir gehen davon aus, dass diese nur in Zell- bzw. Gewebesystemen detektiert werden kann, die repräsentativ für die jeweiligen Phänotypen sind. Gegenwärtig generieren wir induzierte pluripotente Stammzellen (*iPS cells*; *induced pluripotent stem cells*) von Patienten und nichtbetroffenen Mitgliedern der türkischen Familie. Zusätzlich etablierten wir die Kultivierung von mesenchymalen Stammzellen (MSC). Unser gegenwärtiges Engagement gilt der Differenzierung der Stammzellen in glatte Gefäßmuskelzellen (VSMCs), Endothelzellen, Kardiomyozyten, neuronale Zellen und Chondrozyten.

Unsere Fokussierung auf Translokationsfamilien mit BDE ohne Hypertonie hatte zum Ziel, Mechanismen zu identifizieren, die ebenfalls von Relevanz für Hypertonie/BDE sein könnten. Beiden untersuchten Familien war gemeinsam, dass einer der Bruchpunkte auf dem kurzen Arm von Chromosom 12 lokalisiert war.^{67, 77} Diese Arbeiten führten uns auf das Gebiet der Epigenetik und gewebespezifischen Genregulation. Ursächlich für die BDE ist die translokationsbedingte Abkopplung des für die Gliedmaßenentwicklung essentiellen regulatorischen Elementes *CISTR-ACT* von dem von ihm regulierten Gen *PTHLH*, was zur Dysregulation eines transkriptionsabhängigen Netzwerkes führt, dem *PTHLH*, *SOX9* und eine lncRNA angehören. In den die Translokation tragenden BDE-Patienten ist die Bindung der lncRNA im *PTHLH*-Gen reduziert, was zu einer verminderten Expression von *PTHLH* führt⁷⁷¹¹². Das haploinsuffiziente Gen *PTHLH* ist das einzige BDE-Gen auf Chromosom 12.⁶⁸ Es liegt jedoch nicht im, sondern proximal zum Kopplungsbereich von Hypertonie/BDE. Die logische Frage, die sich ergab, war die, ob *PTHLH* auch in Patienten mit Hypertonie/BDE fehlreguliert ist. In Fibroblasten von betroffenen und nichtbetroffenen türkischen Familienmitgliedern ist *PTHLH* nicht differentiell exprimiert. Werden die Fibroblasten jedoch chondrogen differenziert, ist die mRNA-Expression von *PTHLH* in Betroffenen signifikant vermindert (unpublizierte Daten) (Abb.4). Ob die Inversionsregion mit ihren ncRNAs äquivalent zur Translokation eine Änderung

der Chromatinarchitektur bewirkt und dies Auswirkungen auf die Expression sowohl der ncRNAs selbst als auch potentieller Zielgene, u. a. *PTHLH*, hat, wird Gegenstand zukünftiger Arbeiten sein. Wir werden die aus Patienten- und Kontrollstammzellen differenzierten Zelltypen nutzen, um intra- und interchromosomale Regulatoren und Chromatininteraktionspartner zu identifizieren (ChIA-PET; *Chromatin Interaction Analysis by Paired-End Tag Sequencing*). Transkriptomsequenzierung wird uns einen Einblick in die qualitative und quantitative Zusammensetzung der lncRNAs und kleinen RNAs der Inversionsregion, der Gene des Kopplungsintervalls und aller genomweit exprimierten RNAs liefern. Durch Kombination der Daten hoffen wir, jene zelltypspezifischen Regulationsmechanismen erschließen zu können, die die Ausprägung des Syndroms und seiner Phänotypen auf zellulärer Ebene bedingen.

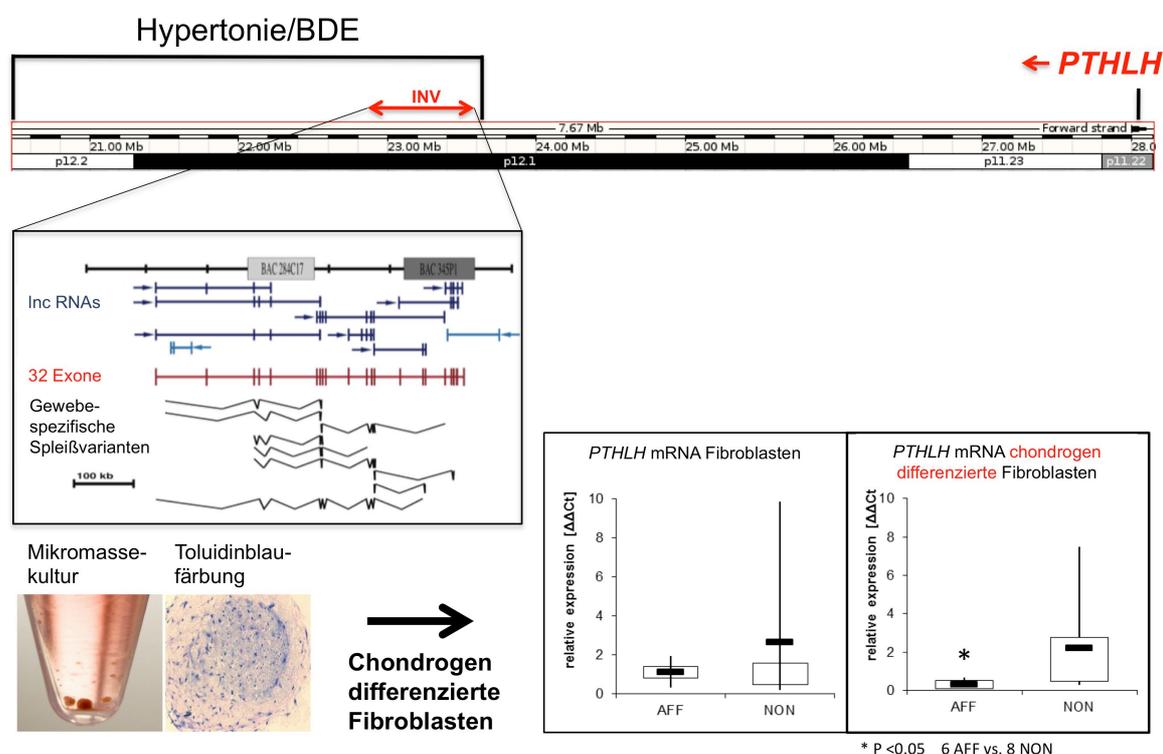


Abb.4: *PTHLH* im Kontext des Hypertonie/BDE-Syndroms

Gezeigt werden die Chromosomenbanden 12p12.2 bis 12p11.23 mit der Kopplungsregion des Hypertonie/BDE-Syndroms, der integrierten Inversion und den darin kodierten ncRNAs. *PTHLH* ist 4,6 Mb proximal zum Kopplungssegment lokalisiert. In Mikromassekulturen wurden Fibroblasten von betroffenen und nichtbetroffenen Mitgliedern der türkischen Familie in Chondrozyten differenziert. *PTHLH* ist in Fibroblasten nicht differentiell zwischen den beiden Gruppen exprimiert, in Chondrozyten dagegen ist seine Expression in Betroffenen signifikant vermindert.

Inwieweit die Regulation von *PTH1R* oder der Signalweg, in den es integriert ist, auch an der Ausprägung der Hypertonie des Hypertonie/BDE-Syndroms beteiligt sind, ist noch ungeklärt. Auf die vielfältigen Funktionen des Gens wurde bereits hingewiesen. Alternatives Spleißen generiert unterschiedliche mRNAs. Zusätzlich unterliegt das initiale Translationsprodukt verschiedenen endoproteolytischen Spaltungen. *PTH1R* kodiert für drei verschiedene funktionelle Peptide. Die Aminosäurereste 1-37 bilden das N-terminale Peptid, das parathormonähnliche und wachstumsregulatorische Funktionen ausübt. Die hohe Homologie zum Parathormon (PTH) war ausschlaggebend für die Namensgebung sowohl des Gens als auch des Proteins (PTHrP). Die Aminosäuren 38-93 enthalten ein Kernlokalisierungssignal, regulieren den Kalziumtransport und die Zellproliferation.¹¹³ Die C-terminale Domäne (AS 102-141) moduliert Osteoklastenaktivität und ist auch unter dem Namen Osteostatin bekannt.^{114, 115} PTHrP hat RNA-bindende Eigenschaften und ist in einigen Zelltypen im Nukleolus lokalisiert, was vermuten lässt, dass es an der Regulation des *RNA-Trafficking*, der Ribosomendynamik und/oder der Translation beteiligt ist.¹¹⁶ Das N-terminale Peptid von PTHrP bindet und aktiviert den gleichen Rezeptor (PTH1R; *parathyroid hormone 1 receptor*) wie PTH selbst, hat aber eine von der Rezeptorkonformation abhängige unterschiedliche Bindungskapazität.^{117, 118} PTH1R ist ein typisches Mitglied der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und weist sieben Transmembrandomänen auf. Mutationen in seinem Gen (MIM 168468) führen zu verschiedenen Chondrodysplasien. PTH1R bindet bevorzugt an die alpha-Untereinheit des stimulierenden G-Protein-Komplexes G_s und agiert nach PTH/PTHrP-Aktivierung über den cAMP/PKA (*protein kinase A*)-Signalweg. Eine direkte Bindung an andere G-Proteine wie G_{q/11}, G_{i/o} und G_{12/13} wurde ebenfalls gezeigt, was zur Aktivierung unterschiedlicher Signalwege führt.¹¹⁹ Mutationen im Gen der G_s-alpha-Untereinheit (*GNAS*) verursachen AHO (*Albrights hereditary osteodystrophy*), eine Erkrankung mit einem genetisch heterogenen Phänotyp, der Pseudohypoparathyroidismus Typ 1a (PHP1a [MIM 13580]), Typ 1c (PHP1c [MIM 612462]) und Pseudopseudohypoparathyroidismus (PPHP [MIM 612463]) einschließt. Der *GNAS complex locus* auf Chromosom 20q13.32 zeichnet sich durch *Imprinting* aus. Die Nutzung alternativer Promotoren und alternatives Spleißen führen zur Entstehung verschiedener Transkripte (MIM 139320). Funktionsverlustmutationen in *GNAS* sind mit PHP1a and PPHP assoziiert.¹²⁰⁻¹²² Die klinischen Symptome von AHO sind vielfältig. BDE und Kleinwuchs gehören dazu, aber auch mentale Retardierung und Adipositas. Zwei unabhängige genomweite Studien assoziierten den chromosomalen Locus 20q13.32 mit den Genen *GNAS-EDN3* (*Endothelin 3*) zu Hypertonie, systolischem und diastolischem Blutdruck.^{101, 104} Akrodysostose (MIM 101800) ist eine Multisystemerkrankung, die durch endokrine, neurologische und skelettale Auffälligkeiten gekennzeichnet ist. Zu den Skelettanomalien gehört eine schwere Brachydaktylie mit Zapfenepiphysen und häufig mild ausgeprägter Kleinwuchs. Zwei Gene, die ursächlich für diese Erkrankung sind, wurden kürzlich veröffentlicht. Dominante Mutationen im Gen *PRKAR1A*

(*protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha*), das für die cAMP-abhängige regulatorische Untereinheit der PKA kodiert, führen zu einer reduzierten PKA-Aktivierung durch cAMP und zu einer eingeschränkten Hormonantwort in einer Vielzahl von Geweben.^{123, 124} Heterozygote *Missense*-Mutationen des Gens *PDE4D* (*phosphodiesterase 4D, cAMP-specific*) scheinen zu einer beeinträchtigten Phosphodiesteraseaktivität führen und somit die cAMP-Hydrolyse und den zellulären cAMP-Spiegel zu beeinflussen.¹²⁵⁻¹²⁷ Fasst man diese Daten und Erkenntnisse zusammen, unterstützen sie die Schlüsselfunktion des cAMP-Signalweges in der Genese des menschlichen Skeletts.

Die pathophysiologische Ursache der Hypertonie beim Bilginturan-Syndrom sehen wir in der Struktur der arteriellen Gefäße. Hypertonie/BDE ist ein Syndrom, das sich sehr wahrscheinlich bereits in der Embryonalentwicklung manifestiert. Betroffene Kinder kamen mit einem signifikant geringeren Gewicht zur Welt.⁶⁴ Eine veränderte Chondrogenese führt zu BDE und Kleinwuchs. Auch die Vaskulogenese und/oder Angiogenese der Betroffenen könnte bereits entwicklungsbiologisch gestört sein. Allgemein wird die sogenannte Gefäßremodellierung (*vascular remodeling*), die sich in der Ausprägung einer Hypertrophie der Gefäßmuskulatur äußert, zu einer verringerten Elastizität der peripheren Gefäße führt und damit einen erhöhten Gefäßwiderstand bedingt, als eine Auswirkung von Bluthochdruck angesehen. Folkow postulierte jedoch, dass eine veränderte Gefäßstruktur und ein damit verbundener erhöhter peripherer Widerstand eine Ursache, quasi den „Startpunkt“, zur Entwicklung einer Hypertonie darstellen.¹²⁸ Diese Hypothese sehen wir in den Hypertonie/BDE-Patienten bestätigt. Eine Hyperplasie der Tunica media scheint den nachweisbaren erhöhten Gefäßwiderstand zu bedingen. Zusätzlich zeigen die Betroffenen Gefäßstrukturveränderungen in Form von Gefäßanomalien und Gefäßschlingen. Inwieweit diese auch für die gestörte Barorezeptorfunktion ursächlich sind, kann derzeit nicht beurteilt werden. Unsere Befunde zeigten, dass *PTH1H* in Chondrozyten von Patienten fehlreguliert ist. Auch in glatten Gefäßmuskelzellen sind sowohl das Gen für PTHrP als auch das für seinen Rezeptor PTH1R exprimiert.^{129, 130} PTHrP hat vasodilatorische Eigenschaften und senkt den Blutdruck im Mausmodell.¹³¹ Seit einigen Jahren wird PTHrP als ein Schlüsselprotein der Gefäßremodellierung untersucht. Erhöhte PTHrP-Spiegel in VSMCs sind oft mit Hyperplasie assoziiert. PTHrP hat einen entscheidenden Effekt auf die Proliferationskontrolle in VSMCs.¹³² Die VSMC-Proliferationsrate in PTHrP-knock-out-Mäusen ist – verglichen mit jener in Wildtyp-Kontrollmäusen – signifikant reduziert. Die Überexpression von PTHrP in VSMCs *in vitro* führt zu einer erhöhten Zellteilungsrate und scheint abhängig vom Kernlokalisierungssignal zu sein.¹³³ Exogenes PTHrP, das über die Stimulation des PTH1R wirkt, hemmt die VSMC-Proliferation. Nach interzellulärer Prozessierung und Sekretion ist PTHrP selbst an der Regulation seines Rezeptors PTH1R beteiligt.¹³⁴ Ob PTH1H/PTHrP auch an der Ausprägung der arteriellen

Hyperplasie der Hypertonie/BDE-Patienten beteiligt ist, konnte bislang nicht untersucht werden. Die Nutzung von Stammzellen der Patienten und deren Differenzierung in VSMCs wird uns dies in der nahen Zukunft ermöglichen.

Die Ausprägung von Brachydaktylie Typ E, von Kleinwuchs und von arterieller Hyperplasie scheinen dem gleichen regulatorischen Signalweg zu unterliegen. Dieser führt über die Bindung von PTHrP an seinen Rezeptor PTH1R zur Aktivierung der G_s-alpha-Untereinheit. Die daraus resultierende Stimulation der Adenylatcyklase bewirkt die Synthese des sekundären Botenstoffs (*second messenger*) cAMP. Der zelluläre cAMP-Spiegel unterliegt der Regulation durch Phosphodiesterasen, die in diesen Signalweg eingreifen und cAMP zu AMP hydrolysieren. Die Bindung von cAMP an PRKAR1A, die cAMP-abhängige regulatorische Untereinheit von PKA, führt zur Dissoziation der katalytischen C-Untereinheit vom Holoenzym und zur Aktivierung der Kinase. PKA phosphoryliert eine Vielzahl von Proteinen, u. a. CREB-Proteine (*cAMP-responsive element binding proteins*), eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die im phosphorylierten Zustand an konservierte palindromische DNA-Motive, sogenannte CRE (*cAMP-responsive elements*) binden. Gemeinsam mit anderen Kofaktoren sind sie an der transkriptionellen Regulation von Zielgenen beteiligt (Abb. 4). Unsere derzeitige Arbeitshypothese besteht darin, dass der genetische Defekt für Hypertonie/BDE zu einer veränderten Aktivität des cAMP/PKA-Signalweges führt und – aufgrund gewebe- und zelltypspezifischer Regulationsmechanismen–die unterschiedlichen Phänotypen verursacht.

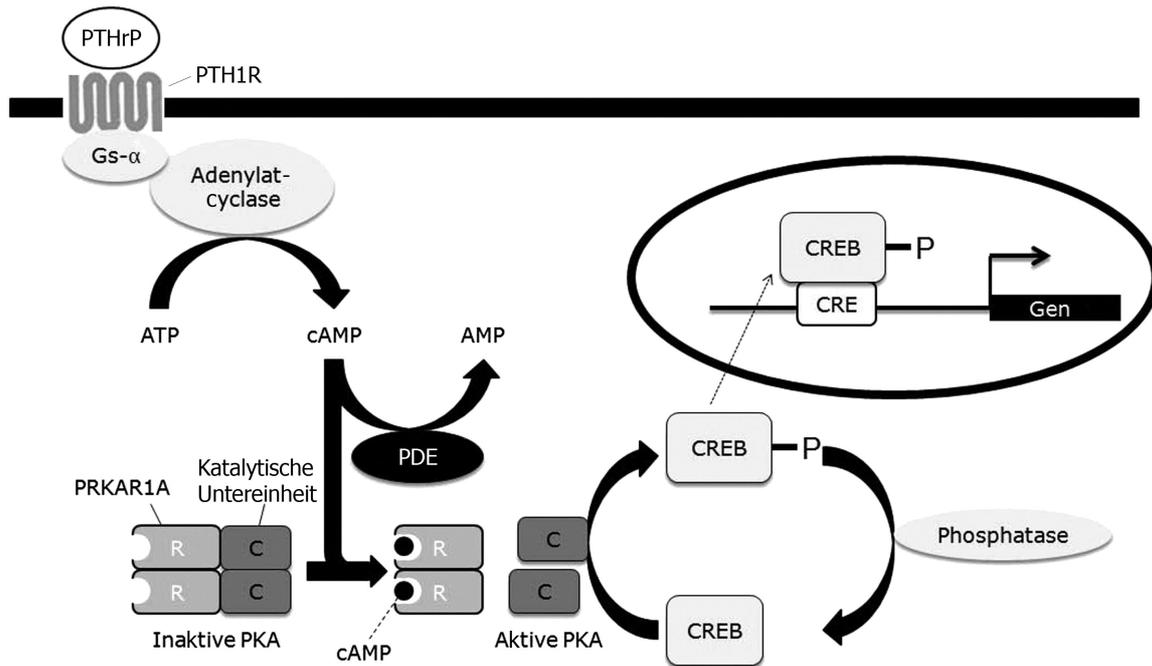


Abb.4: Die über PTHrP induzierte cAMP-Signalkaskade (Adaptiert aus ¹²⁶)

Ausblick

Trotz des simplen autosomal-dominanten Erbgangs weist das Bilginturan-Syndrom in seiner phänotypischen Ausprägung ein komplexes Erscheinungsbild auf, das sich in zelltyp- und gewebespezifischen regulatorischen Prozessen widerspiegeln sollte. Die nunmehr verfügbaren neuen Technologien werden es uns ermöglichen, die bereits identifizierten chromosomalen Rearrangements auf genomischer Ebene zu entschlüsseln, relevante Chromatininteraktionen aufzuklären und transkriptionelle und proteinbasierte Unterschiede zwischen Hypertonie/BDE-Patienten und deren nichtbetroffenen Familienmitgliedern in ihrer Komplexität zu verifizieren. Basis für diese Arbeiten werden die bereits generierten Stammzellen unserer Patienten und ihrer nichtbetroffenen Familienangehörigen und die daraus differenzierten zellulären Subtypen sein.

4. Zusammenfassung

Bluthochdruck ist eine komplexe genetische Erkrankung, an deren Ausprägung eine nach wie vor noch unbekannte Anzahl von Genen und genetischen Varianten beteiligt ist. Seltene monogene Hypertonieformen sind ungeachtet des großen technologischen Fortschritts und umfangreicher genomweiter Assoziationsstudien ein hilfreiches Instrument, neue genetische Hintergründe und physiologische Mechanismen der Blutdruckregulation zu identifizieren.

Das Bilginturan-Syndrom ist durch eine autosomal-dominante Hypertonie charakterisiert, die mit Brachydaktylie Typ E assoziiert ist. Pathophysiologisch ähnelt sie der essentiellen Hypertonie in der allgemeinen Bevölkerung. Klinische und physiologische Untersuchungen konnten sekundäre Hypertonieformen und eine Beteiligung der Salz-Wasser-Regulation ausschließen. Betroffene sterben vor Vollendung ihres 50. Lebensjahrs an den Folgen eines Schlaganfalls. Der Bluthochdruck manifestiert sich bereits im frühen Kindesalter und stellt das leitende Diagnostikkriterium des Syndroms dar. Der Hypertonus ist sehr wahrscheinlich auf einen erhöhten peripheren Gefäßwiderstand zurückzuführen, der durch eine Hyperplasie der arteriellen *Tunica media* bedingt ist. Der Skelettphänotyp der Betroffenen zeichnet sich durch eine Brachydaktylie des Typs E und Kleinwüchsigkeit aus.

Hypertonie/BDE wurde, basierend auf der von Bilginturan beschriebenen türkischen Familie und fünf weiteren Familien, auf den kurzen Arm des Chromosoms 12 kartiert. Das Syndrom ist genomisch mit einer Inversion innerhalb des minimalen Kopplungsintervalls assoziiert. Die Inversionsregion ist durch multiple nichtkodierende RNAs gekennzeichnet.

In zwei Translokationsfamilien mit BDE, t(4;12)(q13.2-13.3;p11.2) und t(8;12)(q13;p11.2), ist eine reduzierte chondrogene Expression des Gens *PTHLH* ursächlich für die Entwicklung der BDE. Der zugrundeliegende Mechanismus ist die translokationsbedingte Abkopplung des für die Gliedmaßenentwicklung essentiellen regulatorischen Elementes *CISTR-ACT* von dem durch dieses Element regulierten Gen *PTHLH*, was zur Dysregulation eines transkriptionsabhängigen Netzwerkes führt, dem *PTHLH*, *SOX9* und eine lncRNA angehören. Auch in Patienten mit Hypertonie/BDE ist die chondrogene *PTHLH*-Expression vermindert.

Eine mögliche Einflussnahme des für Hypertonie/BDE ursächlichen genetischen Defektes auf den cAMP/PKA-Signalweg als dysregulierte kausale Kaskade für Brachydaktylie Typ E, Kleinwuchs und arterielle Hyperplasie wird diskutiert.

5. Literaturverzeichnis aus dem freien Text

1. Lawes CM, Vander Hoorn S, Rodgers A. Global burden of blood-pressure-related disease, 2001. *Lancet*. 2008; **371**(9623): 1513-8.
2. WHO. Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. 2009.
3. Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet*. 2005; **365**(9455): 217-23.
4. GBE. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. 2010 [cited; Available from: <http://www.gbe-bund.de>
5. 1999 World Health Organization-International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. Guidelines Subcommittee. *J Hypertens*. 1999; **17**(2): 151-83.
6. Hochdruckliga D. Leitlinien zur Behandlung der arteriellen Hypertonie. 2008.
7. Lenfant C, Chobanian AV, Jones DW, Roccella EJ. Seventh report of the Joint National Committee on the Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (JNC 7): resetting the hypertension sails. *Hypertension*. 2003; **41**(6): 1178-9.
8. Weitz W. Zur Ätiologie der genuinen oder vasculären Hypertension. *Z klin Med*. 1923; **96**: 151-70.
9. Volhard F. Nieren und ableitende Harnwege. In: Strehlin GvBaR, editor. *Handbuch der inneren Medizin*. Berlin: Springer; 1931.
10. De Vries H. Intracellulare Pangenesis. Jena: G.Fischer; 1889.
11. Stamhuis IH, Meijer OG, Zevenhuizen EJ. Hugo de Vries on heredity, 1889-1903. *Statistics, Mendelian laws, pangenesis, mutations*. *Isis*. 1999; **90**(2): 238-67.
12. Johannsen WJ. *Elemente der exakten Erblichkeitslehre*. Jena: Gustav Fischer; 1909.
13. Platt R. Heredity in hypertension. *Q J Med*. 1947; **16**(63): 111-33.
14. Pickering GW. *High Blood Pressure*. London: J&A Churchill Ltd; 1955.
15. Pickering GW. The genetic factor in essential hypertension. *Ann Intern Med*. 1955; **43**(3): 457-64.
16. Swales JD. Platt versus Pickering: an episode in recent medical history. London: The Keynes Press, British Medical Association; 1985. p. 155.
17. Zanchetti A. Platt versus Pickering: an episode in recent medical history. By J. D. Swales, editor. *An essay review. Medical history*. 1986; **30**(1): 94-6.
18. Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS. Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell*. 2001; **104**(4): 545-56.
19. Sutherland DJ, Ruse JL, Laidlaw JC. Hypertension, increased aldosterone secretion and low plasma renin activity relieved by dexamethasone. *Can Med Assoc J*. 1966; **95**(22): 1109-19.
20. New MI, Peterson RE. A new form of congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab*. 1967; **27**(2): 300-5.
21. Salti IS, Stiefel M, Ruse JL, Laidlaw JC. Non-tumorous "primary" aldosteronism. I. Type relieved by glucocorticoid (glucocorticoid-remediable aldosteronism). *Can Med Assoc J*. 1969; **101**(1): 1-10.
22. Giebink GS, Gotlin RW, Biglieri EG, Katz FH. A kindred with familial glucocorticoid suppressible aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab*. 1973; **36**(4): 715-23.
23. Lifton RP, Dluhy RG, Powers M, Rich GM, Cook S, Ulick S, et al. A chimaeric 11 beta-hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension. *Nature*. 1992; **355**(6357): 262-5.
24. Mune T, Rogerson FM, Nikkila H, Agarwal AK, White PC. Human hypertension caused by mutations in the kidney isozyme of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Nat Genet*. 1995; **10**(4): 394-9.
25. Geller DS, Farhi A, Pinkerton N, Fradley M, Moritz M, Spitzer A, et al. Activating mineralocorticoid receptor mutation in hypertension exacerbated by pregnancy. *Science*. 2000; **289**(5476): 119-23.
26. Liddle GW, Bledsoe T, Coppage WS, Jr. . A familial renal disorder simulating primary aldosteronism but with negligible aldosterone secretion. *Trans Assoc Am Physicians*. 1963; **76**: 199-213.
27. Shimkets RA, Warnock DG, Bositis CM, Nelson-Williams C, Hansson JH, Schambelan M, et al. Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the beta subunit of the epithelial sodium channel. *Cell*. 1994; **79**(3): 407-14.
28. Hansson JH, Nelson-Williams C, Suzuki H, Schild L, Shimkets R, Lu Y, et al. Hypertension caused by a truncated epithelial sodium channel gamma subunit: genetic heterogeneity of Liddle syndrome. *Nat Genet*. 1995; **11**(1): 76-82.

29. Schild L, Canessa CM, Shimkets RA, Gautschi I, Lifton RP, Rossier BC. A mutation in the epithelial sodium channel causing Liddle disease increases channel activity in the *Xenopus laevis* oocyte expression system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; **92**(12): 5699-703.
30. Schild L, Lu Y, Gautschi I, Schneeberger E, Lifton RP, Rossier BC. Identification of a PY motif in the epithelial Na channel subunits as a target sequence for mutations causing channel activation found in Liddle syndrome. *Embo J*. 1996; **15**(10): 2381-7.
31. Wilson FH, Disse-Nicodeme S, Choate KA, Ishikawa K, Nelson-Williams C, Desitter I, et al. Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science*. 2001; **293**(5532): 1107-12.
32. Kahle KT, Ring AM, Lifton RP. Molecular physiology of the WNK kinases. *Annu Rev Physiol*. 2008; **70**: 329-55.
33. McCormick JA, Ellison DH. The WNKs: atypical protein kinases with pleiotropic actions. *Physiol Rev*. 2011; **91**(1): 177-219.
34. Flatman PW. Cotransporters, WNKs and hypertension: important leads from the study of monogenetic disorders of blood pressure regulation. *Clin Sci (Lond)*. 2007; **112**(4): 203-16.
35. Toka HR, Koshy JM, Hariri A. The molecular basis of blood pressure variation. *Pediatr Nephrol*. 2012.
36. Bilginturan N, Zileli S, Karacadag S, Pirnar T. Hereditary brachydactyly associated with hypertension. *J Med Genet*. 1973; **10**(3): 253-9.
37. Bell J. Brachydactyly and symphalangism. *Treasury of Human Inheritance*. London: Cambridge University Press; 1951. p. 1-31.
38. A comprehensive genetic linkage map of the human genome. NIH/CEPH Collaborative Mapping Group. *Science*. 1992; **258**(5079): 67-86.
39. A comprehensive genetic linkage map of the human genome. NIH/CEPH Collaborative Mapping Group. *Science*. 1992; **258**(5079): 148-62.
40. Schuster H, Wienker TE, Bähring S, Bilginturan N, Toka HR, Neitzel H, et al. Severe autosomal dominant hypertension and brachydactyly in a unique Turkish kindred maps to human chromosome 12. *Nat Genet*. 1996; **13**(1): 98-100.
41. Schuster H, Wienker TF, Toka HR, Bähring S, Jeschke E, Toka O, et al. Autosomal dominant hypertension and brachydactyly in a Turkish kindred resembles essential hypertension. *Hypertension*. 1996; **28**(6): 1085-92.
42. Hattenbach LO, Toka HR, Toka O, Schuster H, Luft FC. Absence of hypertensive retinopathy in a Turkish kindred with autosomal dominant hypertension and brachydactyly. *Br J Ophthalmol*. 1998; **82**(12): 1363-5.
43. Nagai T, Nishimura G, Kato R, Hasegawa T, Ohashi H, Fukushima Y. Del(12)(p11.21p12.2) associated with an asphyxiating thoracic dystrophy or chondroectodermal dysplasia-like syndrome. *Am J Med Genet*. 1995; **55**(1): 16-8.
44. Bähring S, Nagai T, Toka HR, Nitz I, Toka O, Aydin A, et al. Deletion at 12p in a Japanese child with brachydactyly overlaps the assigned locus of brachydactyly with hypertension in a Turkish family. *Am J Hum Genet*. 1997; **60**(3): 732-5.
45. Chitayat D, Grix A, Balfe JW, Abramowicz JS, Garza J, Fong CT, et al. Brachydactyly-short stature-hypertension (Bilginturan) syndrome: report on two families. *Am J Med Genet*. 1997; **73**(3): 279-85.
46. Riccardi VM, Holmes LB. Brachydactyly, type E: hereditary shortening of digits, metacarpals, metatarsals, and long bones. *J Pediatr*. 1974; **84**(2): 251-4.
47. Smith DW. Brachydactyly Syndrome, Type E. In: Jones KL, editor. *Smith's recognizable patterns of human malformation*. 4 ed. Philadelphia: W. B. Saunders Co; 1988. p. 396.
48. Toka HR, Bähring S, Chitayat D, Melby JC, Whitehead R, Jeschke E, et al. Families with autosomal dominant brachydactyly type E, short stature, and severe hypertension. *Ann Intern Med*. 1998; **129**(3): 204-8.
49. Schuster H, Toka O, Toka HR, Busjahn A, Oztekin O, Wienker TF, et al. A cross-over medication trial for patients with autosomal-dominant hypertension with brachydactyly. *Kidney Int*. 1998; **53**(1): 167-72.
50. Cushing H. Concerning a definite regulatory mechanism of the vasomotor center which controls blood pressure during cerebral compression. *Johns Hopkins Hosp Bull*. 1901; **12**: 290-2.
51. Jannetta PJ, Segal R, Wolfson SK, Jr., Dujovny M, Semba A, Cook EE. Neurogenic hypertension: etiology and surgical treatment. II. Observations in an experimental nonhuman primate model. *Ann Surg*. 1985; **202**(2): 253-61.
52. Jannetta PJ, Segal R, Wolfson SK, Jr. Neurogenic hypertension: etiology and surgical treatment. I. Observations in 53 patients. *Ann Surg*. 1985; **201**(3): 391-8.

53. Levy EI, Scarrow AM, Jannetta PJ. Microvascular decompression in the treatment of hypertension: review and update. *Surg Neurol*. 2001; **55**(1): 2-10; discussion -1.
54. Naraghi R, Schuster H, Toka HR, Bähring S, Toka O, Oztekin O, et al. Neurovascular compression at the ventrolateral medulla in autosomal dominant hypertension and brachydactyly. *Stroke*. 1997; **28**(9): 1749-54.
55. Jordan J, Toka HR, Heusser K, Toka O, Shannon JR, Tank J, et al. Severely impaired baroreflex-buffering in patients with monogenic hypertension and neurovascular contact. *Circulation*. 2000; **102**(21): 2611-8.
56. Tank J, Toka O, Toka HR, Jordan J, Diedrich A, Busjahn A, et al. Autonomic nervous system function in patients with monogenic hypertension and brachydactyly: a field study in north-eastern Turkey. *Journal of human hypertension*. 2001; **15**(11): 787-92.
57. Gong M, Zhang H, Schulz H, Lee YA, Sun K, Bähring S, et al. Genome-wide linkage reveals a locus for human essential (primary) hypertension on chromosome 12p. *Hum Mol Genet*. 2003; **12**(11): 1273-7.
58. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001; **409**(6822): 860-921.
59. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science*. 2001; **291**(5507): 1304-51.
60. Muller HJ. Types of visible variations induced by X-rays in *Drosophila*. *J Genet*. 1930; **22**: 299–335.
61. Osborne LR, Li M, Pober B, Chitayat D, Bodurtha J, Mandel A, et al. A 1.5 million-base pair inversion polymorphism in families with Williams-Beuren syndrome. *Nat Genet*. 2001; **29**(3): 321-5.
62. Bähring S, Rauch A, Toka O, Schroeder C, Hesse C, Siedler H, et al. Autosomal-dominant hypertension with type E brachydactyly is caused by rearrangement on the short arm of chromosome 12. *Hypertension*. 2004; **43**(2): 471-6.
63. Bähring S, Kann M, Neuenfeld Y, Gong M, Chitayat D, Toka HR, et al. Inversion region for hypertension and brachydactyly on chromosome 12p features multiple splicing and noncoding RNA. *Hypertension*. 2008; **51**(2): 426-31.
64. Toka O, Maass PG, Aydin A, Toka H, Hubner N, Ruschendorf F, et al. Childhood hypertension in autosomal-dominant hypertension with brachydactyly. *Hypertension*. 2010; **56**(5): 988-94.
65. Stricker S, Mundlos S. Mechanisms of digit formation: Human malformation syndromes tell the story. *Dev Dyn*. 2011; **240**(5): 990-1004.
66. Johnson D, Kan SH, Oldridge M, Trembath RC, Roche P, Esnouf RM, et al. Missense mutations in the homeodomain of HOXD13 are associated with brachydactyly types D and E. *Am J Hum Genet*. 2003; **72**(4): 984-97.
67. Maass PG, Wirth J, Aydin A, Rump A, Stricker S, Tinschert S, et al. A cis-regulatory site downregulates PTHLH in translocation t(8;12)(q13;p11.2) and leads to Brachydactyly Type E. *Hum Mol Genet*. 2010; **19**(5): 848-60.
68. Klopocki E, Hennig BP, Dathe K, Koll R, de Ravel T, Baten E, et al. Deletion and point mutations of PTHLH cause brachydactyly type E. *Am J Hum Genet*. 2010; **86**(3): 434-9.
69. Burtis WJ, Wu T, Bunch C, Wysolmerski JJ, Insogna KL, Weir EC, et al. Identification of a novel 17,000-dalton parathyroid hormone-like adenylate cyclase-stimulating protein from a tumor associated with humoral hypercalcemia of malignancy. *J Biol Chem*. 1987; **262**(15): 7151-6.
70. Strewler GJ, Stern PH, Jacobs JW, Eveloff J, Klein RF, Leung SC, et al. Parathyroid hormonelike protein from human renal carcinoma cells. Structural and functional homology with parathyroid hormone. *J Clin Invest*. 1987; **80**(6): 1803-7.
71. Suva LJ, Winslow GA, Wettenhall RE, Hammonds RG, Moseley JM, Diefenbach-Jagger H, et al. A parathyroid hormone-related protein implicated in malignant hypercalcemia: cloning and expression. *Science*. 1987; **237**(4817): 893-6.
72. Wysolmerski JJ. Parathyroid hormone-related protein: an update. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012; **97**(9): 2947-56.
73. Karaplis AC, Luz A, Glowacki J, Bronson RT, Tybulewicz VL, Kronenberg HM, et al. Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene. *Genes Dev*. 1994; **8**(3): 277-89.
74. Weir EC, Philbrick WM, Amling M, Neff LA, Baron R, Broadus AE. Targeted overexpression of parathyroid hormone-related peptide in chondrocytes causes chondrodysplasia and delayed endochondral bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; **93**(19): 10240-5.
75. Kronenberg HM. PTHrP and skeletal development. *Ann N Y Acad Sci*. 2006; **1068**: 1-13.

76. Takahashi K, Inoue D, Ando K, Matsumoto T, Ikeda K, Fujita T. Parathyroid hormone-related peptide as a locally produced vasorelaxant: regulation of its mRNA by hypertension in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995; **208**(1): 447-55.
77. Maass PG, Rump A, Schulz H, Stricker S, Schulze L, Platzer K, et al. A misplaced lncRNA causes brachydactyly in humans. *J Clin Invest*. 2012; **122**(11): 3990-4002.
78. Albright F, Burnett CH, Smith PH, Parson W. Pseudo-hypoparathyroidism--an example of 'Seabright-Bantam syndrome': report of three cases. *Endocrinology*. 1942; **30**: 922-32.
79. Patten JL, Johns DR, Valle D, Eil C, Gruppuso PA, Steele G, et al. Mutation in the gene encoding the stimulatory G protein of adenylate cyclase in Albright's hereditary osteodystrophy. *N Engl J Med*. 1990; **322**(20): 1412-9.
80. Takahashi K, Inoue D, Ando K, Matsumoto T, Ikeda K, Fujita T. Parathyroid hormone-related peptide as a locally produced vasorelaxant: regulation of its mRNA by hypertension in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995; **208**(1): 447-55.
81. Giedion A. Cone-shaped epiphyses (CSE). *Annals of Radiology*. 1965; **8**: 135-45.
82. Miki T, Suzuki M, Shibasaki T, Uemura H, Sato T, Yamaguchi K, et al. Mouse model of Prinzmetal angina by disruption of the inward rectifier Kir6.1. *Nat Med*. 2002; **8**(5): 466-72.
83. Chutkow WA, Pu J, Wheeler MT, Wada T, Makielski JC, Burant CF, et al. Episodic coronary artery vasospasm and hypertension develop in the absence of Sur2 K(ATP) channels. *J Clin Invest*. 2002; **110**(2): 203-8.
84. Meacci E, Taira M, Moos M, Jr., Smith CJ, Movsesian MA, Degerman E, et al. Molecular cloning and expression of human myocardial cGMP-inhibited cAMP phosphodiesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; **89**(9): 3721-5.
85. Wagner RS, Smith CJ, Taylor AM, Rhoades RA. Phosphodiesterase inhibition improves agonist-induced relaxation of hypertensive pulmonary arteries. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997; **282**(3): 1650-7.
86. Lefebvre V, Li P, de Crombrughe B. A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *Embo J*. 1998; **17**(19): 5718-33.
87. Ikeda T, Zhang J, Chano T, Mabuchi A, Fukuda A, Kawaguchi H, et al. Identification and characterization of the human long form of Sox5 (L-SOX5) gene. *Gene*. 2002; **298**(1): 59-68.
88. Lai EC. Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat Genet*. 2002; **30**(4): 363-4.
89. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009; **136**(2): 215-33.
90. Telatar B, Comert S, Vitrinel A, Erginoz E. Anthropometric measurements of term neonates from a state hospital in Turkey. *East Mediterr Health J*. 2009; **15**(6): 1412-9.
91. Hatipoglu N, Kurtoglu S, Ozturk A, Mazicioglu MM. The weight and height percentiles in 6-18 year old children in Kayseri and comparison with Istanbul data. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2009; **1**(3): 129-35.
92. The fourth report on the diagnosis, evaluation, and treatment of high blood pressure in children and adolescents. *Pediatrics*. 2004; **114**(2 Suppl 4th Report): 555-76.
93. Falkner B, Daniels SR. Summary of the Fourth Report on the Diagnosis, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure in Children and Adolescents. *Hypertension*. 2004; **44**(4): 387-8.
94. Bai XH, Wang DW, Kong L, Zhang Y, Luan Y, Kobayashi T, et al. ADAMTS-7, a direct target of PTHrP, adversely regulates endochondral bone growth by associating with and inactivating GEP growth factor. *Mol Cell Biol*. 2009; **29**(15): 4201-19.
95. Bai XH, Wang DW, Luan Y, Yu XP, Liu CJ. Regulation of chondrocyte differentiation by ADAMTS-12 metalloproteinase depends on its enzymatic activity. *Cell Mol Life Sci*. 2009; **66**(4): 667-80.
96. Orom UA, Derrien T, Beringer M, Gumireddy K, Gardini A, Bussotti G, et al. Long noncoding RNAs with enhancer-like function in human cells. *Cell*. 2010; **143**(1): 46-58.
97. Bolzer A, Kreth G, Solovei I, Koehler D, Saracoglu K, Fauth C, et al. Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. *PLoS Biol*. 2005; **3**(5): e157.
98. Hottenga JJ, Boomsma DI, Kupper N, Posthuma D, Snieder H, Willemsen G, et al. Heritability and stability of resting blood pressure. *Twin Res Hum Genet*. 2005; **8**(5): 499-508.
99. Kupper N, Willemsen G, Riese H, Posthuma D, Boomsma DI, de Geus EJ. Heritability of daytime ambulatory blood pressure in an extended twin design. *Hypertension*. 2005; **45**(1): 80-5.

100. Newton-Cheh C, Johnson T, Gateva V, Tobin MD, Bochud M, Coin L, et al. Genome-wide association study identifies eight loci associated with blood pressure. *Nat Genet.* 2009; **41**(6): 666-76.
101. Levy D, Ehret GB, Rice K, Verwoert GC, Launer LJ, Dehghan A, et al. Genome-wide association study of blood pressure and hypertension. *Nat Genet.* 2009; **41**(6): 677-87.
102. Adeyemo A, Gerry N, Chen G, Herbert A, Doumatey A, Huang H, et al. A genome-wide association study of hypertension and blood pressure in African Americans. *PLoS Genet.* 2009; **5**(7): e1000564.
103. Padmanabhan S, Melander O, Johnson T, Di Blasio AM, Lee WK, Gentilini D, et al. Genome-wide association study of blood pressure extremes identifies variant near UMOD associated with hypertension. *PLoS Genet.* 2010; **6**(10): e1001177.
104. Ehret GB, Munroe PB, Rice KM, Bochud M, Johnson AD, Chasman DI, et al. Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk. *Nature.* 2011; **478**(7367): 103-9.
105. Kato N, Takeuchi F, Tabara Y, Kelly TN, Go MJ, Sim X, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies identifies common variants associated with blood pressure variation in east Asians. *Nat Genet.* 2011; **43**(6): 531-8.
106. Padmanabhan S, Newton-Cheh C, Dominiczak AF. Genetic basis of blood pressure and hypertension. *Trends Genet.* 2012; **28**(8): 397-408.
107. Ji W, Foo JN, O'Roak BJ, Zhao H, Larson MG, Simon DB, et al. Rare independent mutations in renal salt handling genes contribute to blood pressure variation. *Nat Genet.* 2008; **40**(5): 592-9.
108. Machnik A, Neuhofer W, Jantsch J, Dahlmann A, Tammela T, Machura K, et al. Macrophages regulate salt-dependent volume and blood pressure by a vascular endothelial growth factor-C-dependent buffering mechanism. *Nat Med.* 2009; **15**(5): 545-52.
109. Coffman TM. Under pressure: the search for the essential mechanisms of hypertension. *Nat Med.* 2011; **17**(11): 1402-9.
110. Harrap SB, Cui JS, Wong ZY, Hopper JL. Familial and genomic analyses of postural changes in systolic and diastolic blood pressure. *Hypertension.* 2004; **43**(3): 586-91.
111. Wicking C, Williamson B. From linked marker to gene. *Trends Genet.* 1991; **7**(9): 288-93.
112. Troy A, Sharpless NE. Genetic "Inc"-age of noncoding RNAs to human disease. *J Clin Invest.* 2012; **122**(11): 3837-40.
113. Cingolani G, Bednenko J, Gillespie MT, Gerace L. Molecular basis for the recognition of a nonclassical nuclear localization signal by importin beta. *Mol Cell.* 2002; **10**(6): 1345-53.
114. Fenton AJ, Kemp BE, Hammonds RG, Jr., Mitchelhill K, Moseley JM, Martin TJ, et al. A potent inhibitor of osteoclastic bone resorption within a highly conserved pentapeptide region of parathyroid hormone-related protein; PTHrP[107-111]. *Endocrinology.* 1991; **129**(6): 3424-6.
115. Philbrick WM, Wysolmerski JJ, Galbraith S, Holt E, Orloff JJ, Yang KH, et al. Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology. *Physiol Rev.* 1996; **76**(1): 127-73.
116. Aarts MM, Rix A, Guo J, Bringham R, Henderson JE. The nucleolar targeting signal (NTS) of parathyroid hormone related protein mediates endocytosis and nucleolar translocation. *J Bone Miner Res.* 1999; **14**(9): 1493-503.
117. Juppner H, Abou-Samra AB, Freeman M, Kong XF, Schipani E, Richards J, et al. A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Science.* 1991; **254**(5034): 1024-6.
118. Pioszak AA, Parker NR, Gardella TJ, Xu HE. Structural basis for parathyroid hormone-related protein binding to the parathyroid hormone receptor and design of conformation-selective peptides. *J Biol Chem.* 2009; **284**(41): 28382-91.
119. Mahon MJ. The parathyroid hormone receptorsome and the potential for therapeutic intervention. *Curr Drug Targets.* 2012; **13**(1): 116-28.
120. Weinstein LS, Gejman PV, Friedman E, Kadowaki T, Collins RM, Gershon ES, et al. Mutations of the Gs alpha-subunit gene in Albright hereditary osteodystrophy detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; **87**(21): 8287-90.
121. Warner DR, Weng G, Yu S, Matalon R, Weinstein LS. A novel mutation in the switch 3 region of Gsalpha in a patient with Albright hereditary osteodystrophy impairs GDP binding and receptor activation. *J Biol Chem.* 1998; **273**(37): 23976-83.
122. Ahrens W, Hiort O, Staedt P, Kirschner T, Marschke C, Kruse K. Analysis of the GNAS1 gene in Albright's hereditary osteodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; **86**(10): 4630-4.
123. Linglart A, Menguy C, Couvineau A, Auzan C, Gunes Y, Cancel M, et al. Recurrent PRKAR1A mutation in acrodysostosis with hormone resistance. *N Engl J Med.* 2011; **364**(23): 2218-26.

124. Nagasaki K, Iida T, Sato H, Ogawa Y, Kikuchi T, Saitoh A, et al. PRKAR1A mutation affecting cAMP-mediated G protein-coupled receptor signaling in a patient with acrodysostosis and hormone resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012; **97**(9): E1808-13.
125. Michot C, Le Goff C, Goldenberg A, Abhyankar A, Klein C, Kinning E, et al. Exome sequencing identifies PDE4D mutations as another cause of acrodysostosis. *Am J Hum Genet.* 2012; **90**(4): 740-5.
126. Lee H, Graham JM, Jr., Rimoin DL, Lachman RS, Krejci P, Tompson SW, et al. Exome sequencing identifies PDE4D mutations in acrodysostosis. *Am J Hum Genet.* 2012; **90**(4): 746-51.
127. Lynch DC, Dymont DA, Huang L, Nikkel SM, Lacombe D, Campeau PM, et al. Identification of Novel Mutations Confirms Pde4d as a Major Gene Causing Acrodysostosis. *Hum Mutat.* 2012.
128. Folkow B. Comments on "endpoints in hypertension": peripheral resistance vessels--though mainly on their involvement as "starting-points". *Blood Press Suppl.* 1997; **2**: 34-8.
129. Hongo T, Kupfer J, Enomoto H, Sharifi B, Giannella-Neto D, Forrester JS, et al. Abundant expression of parathyroid hormone-related protein in primary rat aortic smooth muscle cells accompanies serum-induced proliferation. *J Clin Invest.* 1991; **88**(6): 1841-7.
130. Okano K, Wu S, Huang X, Pirola CJ, Juppner H, Abou-Samra AB, et al. Parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein (PTHrP) receptor and its messenger ribonucleic acid in rat aortic vascular smooth muscle cells and UMR osteoblast-like cells: cell-specific regulation by angiotensin-II and PTHrP. *Endocrinology.* 1994; **135**(3): 1093-9.
131. Maeda S, Sutliff RL, Qian J, Lorenz JN, Wang J, Tang H, et al. Targeted overexpression of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) to vascular smooth muscle in transgenic mice lowers blood pressure and alters vascular contractility. *Endocrinology.* 1999; **140**(4): 1815-25.
132. Fiaschi-Taesch N, Takane KK, Masters S, Lopez-Talavera JC, Stewart AF. Parathyroid-hormone-related protein as a regulator of pRb and the cell cycle in arterial smooth muscle. *Circulation.* 2004; **110**(2): 177-85.
133. Massfelder T, Dann P, Wu TL, Vasavada R, Helwig JJ, Stewart AF. Opposing mitogenic and anti-mitogenic actions of parathyroid hormone-related protein in vascular smooth muscle cells: a critical role for nuclear targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; **94**(25): 13630-5.
134. Song GJ, Fiaschi-Taesch N, Bisello A. Endogenous parathyroid hormone-related protein regulates the expression of PTH type 1 receptor and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Mol Endocrinol.* 2009; **23**(10): 1681-90.

Danksagung

Dieses Projekt lebte und lebt vom Interesse, der Begeisterung und dem außergewöhnlichen Engagement vieler Menschen. Ihnen allen gilt mein aufrichtiger Dank.

Ich danke Friedrich Luft als meinem Mentor und „Vater des Projektes“ für seine schützende Hand, seine ungeduldige Zuversicht, jede neue Herausforderung zu meistern, und für die Offenheit, unvorhergesehenen wissenschaftlichen Kurven und Wendungen zu folgen.

Ich danke Herbert Schuster, der mir zutraute, mit noch unverteidigter Promotion ein molekulargenetisches Labor aufzubauen, und der mir vertraute, als ich sagte: „Das können wir selbst.“

Ich danke Thomas Wienker, der mir ein tiefes Verständnis für humangenetische Sichtweisen vermittelte und mich in den Kreis der humangenetischen Kollegen einführte.

Mein Dank gilt Bernhard Horsthemke, André Reis und Stefan Mundlos für viele für mich sehr wertvolle Hinweise und Hilfestellungen.

Ich danke Hakan Toka und Okan Toka für die intensiven und langen sprühenden Diskussionen, für ihre Geduld, mir klinische Zusammenhänge zu erklären, und für alle Begegnungen mit den Menschen aus der Türkei. Danke auch für eure Freundschaft.

Ich danke Atakan Aydin für seine treue Mitarbeit seit mehr als 15 Jahren, für seinen unerschrockenen Einsatz, jedes technische Problem zu meistern, und seine große Bereitschaft, sich immer wieder auf Neues einzulassen.

Ich danke Philipp Maass für seine große wissenschaftliche Neugier, seinen Enthusiasmus, seinen Fleiß und seine kritischen Fragen.

Ich danke Eva Jeschke, Hannelore Kretschmer, Astrid Mühl, Yvette Wefeld-Neuenfeld, Regina Uhlmann, Eireen Bartels-Klein und Irene Hollfinger nicht nur für die Sorgfalt und Selbstständigkeit in der experimentellen Arbeit sondern auch für die aktive intellektuelle Beteiligung an der Umsetzung wissenschaftlicher Ideen. Danke, dass ihr auch die Zeiten der scheinbaren Stagnation mitgetragen habt.

Ich danke Jens Jordan, Jens Tank, Maik Gollasch, Gabor Fesüs und Christoph Schröder für die Untersuchungen am Patientenbett. Der Wechsel zwischen *bench and bed side* macht dieses Projekt besonders.

Anita Rauch, Martin Kann, Jutta Wirth, Andreas Rump und Anja Weise danke ich für das FISHen im Genom.

Für die statistische und bioinformatische Bewältigung der Datenberge danke ich Franz Rüschenndorf, Andreas Busjahn und Herbert Schulz.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen unseren Kooperationspartnern. Stellvertretend seien hier Norbert Hübner, Sigrid Tinschert, Matthias Selbach, Sigmar Stricker, Boris Jerchow genannt.

Ganz besonders bedanke ich mich bei den Patienten und deren Familienangehörigen für ihre Bereitschaft, unseren Drang nach Wissen stets zu unterstützen, und für ihr Vertrauen. Wir werden es nicht enttäuschen.

Mein großer Dank gilt ebenfalls Peter Löser für das Korrekturlesen der Habilitationsschrift.

Danke an meinen Mann, meinen Sohn und meine Freunde. Danke für die Zeit, in der ihr auf mich verzichtet habt.

ERKLÄRUNG

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....

Datum

.....

Unterschrift