

DHGP2-Forschungsvorhaben 01KW9974/2

**Struktur- und Funktionsanalyse einer medizinisch
relevanten Region des humanen X-Chromosoms**

Schlussbericht

Zuwendungsempfänger:

Prof. Dr. Alfons Meindl

Klinikum rechts der Isar an der Technischen Universität
Abteilung Gynäkologische Tumorgenetik an der Frauenklinik

Ismaninger Str. 22, 81675 München,

Tel.: 089-4140-2429; FAX: 089-4140-2416

E-mail: alfons.meindl@lrz.tu-muenchen.de

Vorher:

Institut für Humangenetik der Ludwig-Maximilians-Universität

Goethestr. 29, 80336 München

I.1 Aufgabenstellung

Im Rahmen der Vorgängerprojekte, die ebenfalls vom BMBF gefördert wurden (01KW9634/4 und 9974/1), begannen wir mit der systematischen Analyse einer medizinisch relevanten Region im Bereich Xp11.3 bis Xp11.22. In diesen Vorläuferprojekten konnten wir nicht nur einen wichtigen Beitrag zur vollständigen Sequenzierung dieses Bereichs leisten, sondern es konnten auch wichtige Augenerkrankungsgene (siehe I.4) identifiziert werden. Im Fortsetzungsprojekt 01KW9974/2 haben wir uns, in Zusammenarbeit mit dem IMB in Jena (Dr. Matthias Platzer), auf die finale Sequenzierung einer Region in Xp11.3-23 und die Identifizierung zusätzlicher Erkrankungsgene konzentriert. Dies erforderte aber auch die ständige Annotierung aller in diese Region kartierten Gene (Erstellung einer möglichst vollständigen Transkriptkarte). Aufgrund einer begonnenen Zusammenarbeit mit Dr. Charles Schwartz (Greenwood Genetic Center, South-Carolina, USA), Dr. Frank Kooy (Universität Antwerpen, Belgien) und Dr. Lisa Baumbach (Universität Miami, Florida, USA), haben wir uns auf neurologische Erkrankungsgene konzentriert (mentale Retardierungsgene auf dem X-Chromosom = MRX; X-chromosomale spinale Muskelatrophie = SMA).

Die erblichen Formen mentaler Retardierung werden in syndromische und nicht-syndromische Entitäten unterteilt. Während die syndromischen eine Kombination aus mentaler Beeinträchtigung und weiteren Symptomen, meistens physische Auffälligkeiten, repräsentieren, treten bei den nicht-syndromischen Formen nur mentale Defizienzen auf. Unsere Überlegung war, dass die Isolierung von X-chromosomal gekoppelten Genen für mentale Retardierung die Charakterisierung biochemischer Stoffwechselwege im Gehirn ermöglicht und unser Verständnis kognitiver Funktionen erweitern kann. Tatsächlich hat die funktionelle Charakterisierung von Proteinen, die entweder mit syndromischen oder nicht-syndromischen Formen assoziiert werden konnten, bereits zur Definition relevanter regulatorischer Kaskaden im neuronalen Prozess geführt (Toniolo, D. 2000).

Die X-gekoppelte mentale Retardierung ist durch eine ausgeprägte Heterogenität gekennzeichnet und mehr als **50** verschiedene XLMR-Gene wurden bis jetzt identifiziert (R. Echeverri and H. Lubs: XLMR-Web-Database <http://xlmr.med.miami.edu/> and P. Chiurazzi et al. 2004: XLMR-catalogue <http://xlmr.interfree.it/home.htm>). Allerdings scheint es dabei eine Konzentration von MRX-Genen in der Xp21-Xcen-Region zu geben (Ropers et al., 2003) und tatsächlich konnten in dieser Region bis jetzt **10** MRX-Gene identifiziert werden (Tabelle 1, schattiert). Die meisten dieser Gene wurden mit Hilfe umfangreicher Mutations- oder Bruchpunktanalysen entweder durch eine Gruppe am Max-Planck Institut in Berlin-Dahlem (Direktor Prof. H.-H. Ropers) oder, wie unter II. 1 dargestellt, durch unsere Gruppe am Institut für Medizinische Genetik an der Ludwig-Maximilians-Universität/Frauenklinik am Klinikum rechts der Isar, identifiziert.

Verschiedene Formen der klinisch und genetisch heterogenen spinalen Muskelatrophie (SMA) wurden beschrieben, wobei Typ 1 die schwerste Manifestation repräsentiert. Während das Gen für die

autosomal rezessive Form des Typ 1 seit längerem bekannt ist (SMN1), war das Gen für die X-chromosomal rezessive Form des schweren Typs (SMA2) 10 Jahre nach den ersten Kopplungsanalysen (Baumbach et al, 1994, Kobayashi et al., 1995) immer noch nicht identifiziert. Zusätzlich zu den für die Werdnig-Hoffmannsche Erkrankung typischen Symptomen wie schwere Hypotonie und Muskelschwäche, zeigt diese Form auch kongenitale Arthrogryposis. Wie bei der autosomal rezessiven Form vom Typ 1, lässt sich in den Muskelbiopsien auch ein Verlust der anterioren Hornzellen feststellen.

Der Genort für SMA2 konnte durch Kopplungsanalysen in fünf größeren Familien auf den zentromernahen Bereich des X-Chromosoms kartiert werden, wobei der größere Bereich dieses 20 Mb großen Intervalls auf den kurzen Arm liegt (DXS8035 in Xp11.3 bis DXS1174 in Xq12). Außerdem konnten neun weitere Familien, bei denen sehr wahrscheinlich ein X-chromosomal rezessiver Erbgang vorliegt, gesammelt werden. Durch die Untersuchung aller annotierten Gene die im genetischen Intervall liegen, sollten Kandidatengene für SMA2 identifiziert werden. Überraschenderweise weisen unsere neuesten Ergebnisse auf Mikroheterogenität hin (siehe II.1.5).

I.2 Voraussetzungen für das Projekt

Hervorragende Voraussetzungen für das Projekt waren aufgrund geeigneter Kooperationspartner (siehe I.5), erfolgreicher Vorarbeiten (siehe ausführlicher I.4), und der Kollaboration mit dem IMB in Jena (siehe I.3) gegeben.

I.3 Planung und Ablauf des Vorhabenszeitplan

Das Projekt konnte bzw. musste allerdings zweimal kostenneutral verlängert werden, da temporär die bewilligten Stellen nicht besetzt werden konnten. Außerdem konnte das Projekt nicht im vorgesehenen Zeitrahmen bearbeitet werden, da ein Umzug von der Ludwig-Maximilians-Universität an das Klinikum rechts der Isar innerhalb Münchens zu bewältigen war. Eine Verlängerung des Projektes bis einschließlich September 05 war aber auch deswegen notwendig, da bis dahin die Suche nach SMA-Genen (siehe II.1.5) und proteinchemische Arbeiten zu HADH2 (siehe II.1.4) noch nicht abgeschlossen waren. Andererseits funktionierte die Kollaboration mit dem Partner in Jena (IMB, Dr. Matthias Platzer) hervorragend und dieses Teilprojekt (01KW9916) konnte erfolgreich Ende September 2004 abgeschlossen werden. Ein Schlußbericht dazu wurde Ihnen nach Absprache mit mir zugeleitet.

I.4 Wissenschaftliche Vorarbeiten

Seit 1997 arbeitete unsere Gruppe, u.a. im Rahmen des deutschen Humangenomprojektes (DHGP), an der Identifizierung und Charakterisierung von Erkrankungsgenen in der medizinisch relevanten Region Xp21.1-Xcen auf dem menschlichen X-Chromosom. Im Rahmen des deutschen Humangenomprojektes 1 und DHGP 2 (1996-2005) (MPI-Berlin, Dr. Ramser, Prof. Lehrach, IMB Jena, Dr. Platzer, LMU-München, Prof. Meindl) wurde eine vollständige Transkriptkarte für ein ca. 20 Mb grosses

Intervall auf dem kurzen Arm des menschlichen X-Chromosoms (Xp21.1-Xcen) erstellt. In Zusammenarbeit mit dem Institut für Molekulare Biotechnologie in Jena (IMB, Dr. Matthias Platzer) wurde ein ca. 4 Mb grosses Intervall vollständig genomisch kloniert und sequenziert und mit Hilfe von systematischen Datenbankabfragen (<http://genome.ucsc.edu/>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; <http://ensembl.org/>; <http://www.sanger.ac.uk/>) und der Anwendung von computergestützten Genvorhersageprogrammen ca. **160** funktionelle Gene und **20** EST-Cluster identifiziert (Wen et al., 2005, Ross et al., 2005). Diese Region ist von hoher medizinischer Relevanz, da zahlreiche Erkrankungen dorthin kartiert worden sind und bisher mehr als 20 Erkrankungsgene dort identifiziert werden konnten (siehe Tabelle 1). Neun davon wurden mit einem mehr oder weniger prominenten Beitrag unserer Gruppe isoliert. Während der ersten vier Forschungsjahre haben wir uns in Zusammenarbeit mit dem Institut für Molekulare Biotechnologie in Jena mit der Erstellung einer kompletten Transkriptkarte im distalen Bereich dieser Region, sowie der Isolierung und Charakterisierung von Augenerkrankungsgenen, beschäftigt (Strom et al., 1998, Pusch et al., 2000; Thiselton et al., 2002; Demirci et al., 2003; Wutz et al., 2002; Zito et al., 2003, Bader et al., 2003).

Basierend auf einer umfangreichen Sequenzierungs- und Annotierungsstrategie in der Kernregion zwischen den Markern *DXS1003* und *DXS1039* in Xp11.23, waren wir als Erstes in der Lage, das Gen, das bei der unvollständigen Form der congenitalen stationären Nachtblindheit (CSNB2) verändert ist, zu identifizieren (Strom et al., 1998). Mutationen in dem Gen *CACNA1F* wurden ebenfalls in einer großen Mennoniten- und anderen amerikanischen CSNB2-Familien gefunden (Bech-Hansen et al., 1998). Das Gen kodiert für die α 1-Untereinheit eines Kalziumkanals vom L-Typ und wird nur in der Retina exprimiert. Neben den Synapsen der Photorezeptorzellen ist er auch in anderen retinalen Zellen exprimiert, sehr wahrscheinlich den Bipolarzellen (Berntson et al., 2003). Wir haben insgesamt 30 CSNB2-Familien nach Veränderungen im *CACNA1F* Gen untersucht, wobei 28 davon eine Auffälligkeit zeigten (Wutz et al., 2002). Darüberhinaus bestätigte die Mutationsanalyse in englischen Familien den direkten Zusammenhang von *CACNA1F*-Veränderungen und CSNB2 (Zito et al., 2003).

Zwei Jahre später konnten wir das Gen isolieren, das in Familien mit congenitaler stationärer Nachtblindheit vom vollständigen Typ (CSNB1) verändert war (Pusch et al., 2000). Der *CSNB1*-Genort wurde in ein 5 cM großes Kopplungsintervall in Xp11.4 kartiert und die Feinkarteierung in einer großen CSNB1-Familie zeigte, dass das krankheitsverursachende Gen zwischen den Marken *DXS993* und *DXS228* lokalisiert sein mußte (Pusch et al., 2001). Diese Region wurde, wie auch die anderen meisten Regionen des X-Chromosoms durch das Sanger Centre, Hinxton, UK, sequenziert (Demirci et al., 2003, Ross et al., 2005). Nachdem wir drei Gene, die in dieser Region liegen, als ursächlich für CSNB1 ausgeschlossen hatten, untersuchten wir das *NYX*-Gen. Es kodiert für ein Protein von 481 Aminosäuren, das jetzt Nyctalopin genannt wird, und in geringen Mengen in verschiedenen Geweben wie auch Retina, Gehirn, Testis und Muskel zur Expression kommt. Bei diesem Polypeptid handelt es

sich um ein durch einen Glycosylphosphatidylinositol-(GPI)-Rest verankertes extrazelluläres Protein mit 11 typischen und zwei cysteinhaltigen, Leucinreichen “repeats” (LRRs). Die Mutationsanalyse in 24 nicht verwandten *CSNB1* Familien zeigte 16 unterschiedliche Mutationen im *NYX*-Gen und bestätigte, dass es ursächlich für diesen Fänotyp ist (Pusch et al., 2000). Es wurde postuliert, dass der Defekt, der sich bei *CSNB1* und dem entsprechenden Mausmodell *nob* manifestiert, die Weiterleitung der visuellen Transduktion behindert, was zur Unterbrechung des retinoneuralen Netzwerks führt. Wie erwartet, wird das *NYX*-Gen in den mehr distal angeordneten retinalen Zelltypen wie Bipolarzellen und Müllerzellen exprimiert (Khan et al., 2004).

Nachdem mit den beiden Genen für die X-chromosomalen Formen *CSNB* und den beiden Genen für die X-chromosomalen Formen von Retinitis pigmentosa alle wichtigen Augenerkrankungsgene identifiziert waren (siehe z. B. Zito et al., 2003), konnten wir uns auf die Klonierung und Charakterisierung neurologischer Erkrankungsgene konzentrieren. Dazu mußte im Folgeprojekt aber auch eine komplette Transkriptkarte für den proximalen Bereich der Region erstellt werden.

I.5 Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern

Dr. Charles Schwartz (J. C. Self Research Institute, Greenwood Genetic Center, Greenwood, South-Carolina, USA):

Dr. Schwartz stellte uns 5 gut charakterisierte syndromische oder nichtsyndromische MRX-Familien zur Verfügung. Von der klassischen Renpenning Familie erhielten wir DNAs für Feinkartierungen und Zell-Linien für die Mutationsanalyse.

Dr. Frank Kooy (Universität von Antwerpen, Belgien):

Mit Dr. Frank Kooy hatten wir eine gute Zusammenarbeit bei der Identifizierung der verursachenden Erkrankungsgene in den Familien MRX9 (FTSJ1) und MRXS10 (HADH2). In beiden Fällen handelt es sich um große Familien, die seit mehreren Jahren klinisch gut dokumentiert werden.

Dr. Lisa Baumbach

Eine Identifizierung und Charakterisierung von Genen, die bei der X-chromosomalen Form der spinalen Muskelatrophie verändert sind (SMAX), war nur durch die Kooperation mit Dr. Baumbach möglich. Sie rekrutiert seit mehr als 10 Jahren solche Familien und stellte sie uns exklusiv für eine Mutationsanalyse zur Verfügung.

Dr. Matthias Platzer und Dr. Gaiping Wen (Institut für Molekulare Biotechnologie, Jena):

Im Rahmen von DHGP2 hatten wir wieder eine produktive Zusammenarbeit mit einer Gruppe am IMB Jena. Diese konzentrierte sich auf die partielle Sequenzierung und Annotierung der geförderten Region. Diese Arbeiten wurden in Absprache mit uns und auf der Basis eines Kooperationsvertrages durchgeführt.

II.1 Erzielte Ergebnisse

Wie schon unter I.1 erwähnt, haben wir uns während der vier Jahre neben der Generierung einer vollständigen Transkriptkarte auf die Identifizierung von MRX-Genen bzw. *SMAX2* aus der Xp21.1-Xcen-Region konzentriert. Dafür haben wir enge und produktive Kooperationen mit Dr. Charles Schwartz (Greenwood Genetic Center, South-Carolina, USA) und Dr. Frank Kooy (Institut für Humangenetik, Antwerpen, Belgien), die beide klinisch gut untersuchte und exzellent dokumentierte MRX-Familien gesammelt haben, aufgebaut. Beide haben uns DNA-Proben und Zell-Linien geschickt und wir konnten damit in vier Fällen die verursachenden Gene finden bzw. bestätigen (siehe nachfolgend). Bezüglich der Identifizierung von Kandidatengen für *SMAX2* arbeiteten wir mit Dr. Lisa Baumbach, Universität von Miami, USA, zusammen. Hier haben wir in der Verlängerungsphase des Projekts eine Variante in einem Gen in einer *SMAX*-Familie gefunden, die möglicherweise krankheitsassoziiert ist.

II.1.1 Charakterisierung des *PQBPI*-Gens

Ein Gen, das bei syndromischer mentaler Retardierung verändert ist, in diese Region kartiert und für ein Poly-Glutamin-Bindendes Protein (**PQBPI**) kodiert, wurde zuerst von einer Gruppe am Max-Planck-Institut identifiziert (Kalscheuer et al. 2004). Bald danach konnten aber wir nachweisen, dass dieses Gen auch beim klassischen **Renpenning-Syndrom** verändert ist (Lenski et al., 2004). Dieses Syndrom ist definiert durch das kombinierte Auftreten von mentaler Retardierung, Kleinwuchs und Mikrozephalie (Renpenning et al., 1962). Interessanterweise wird diese Kombination an Phänotypen durch trunkierende Mutationen in der ER/DR-Domäne verursacht, während ein Aminosäureaustausch in der WW-Domäne des PQBPI-Proteins zu einem völlig unterschiedlichen klinischen Phänotyp, dem **Golabi-Ito-Hall** Syndrom, führt (Lubs et al., 2006).

Das *PQBPI*-Gen besteht aus sechs Exonen, die für ein Protein mit 265 Aminosäuren kodieren. Die WW-Domäne, die in Patienten mit dem Golabi-Ito-Hall Syndrom verändert ist, interagiert mit der karboxyterminalen Domäne der RNA-Polymerase II, die ER/DR-Domäne, die in der XMRE-Familie verändert ist, interagiert mit der Polyglutamin-Region des Transkriptionsfaktors BRN2, der die Transkription inhibiert (Sudol et al., 1991). Neben *ARX*, *MECP2* und *SLC6A8* ist *PQBPI* bis jetzt das am Häufigsten veränderte Gen in MRX-Familien (Kleefstra und Hamel, 2005).

II.1.2 Der Renin-Rezeptor ist in einer Familie mit mentaler Retardierung und Epilepsie (XMRE) verändert

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) wurde als ein systemisch zirkulierendes beschrieben, um Angiotensin II (AngII) herzustellen. Aktuelle Untersuchungen weisen aber darauf hin, dass der Prozess komplexer ist und dass zusätzlich zum endokrinen RAS ein gewebespezifisches RAS eine wichtige Rolle in physiologischen Prozessen wie Lernen und Gedächtnis (Gard, 2002), Gewebewachstum und Erkrankungen wie Entzündungen, macro- und microvasculäre Hypertrophie und vasculäres "remodel-

ling” (Dzau et al., 2001) spielt. Im zentralen Nervensystem besteht die Rolle von RAS, neben seiner Aufgabe als Modulator kardiovascularer Funktionen, darin, die autonomen Aktivitäten, die Salzaufnahme sowie Trinkverhalten, Zellregulation, und die Entwicklung der kognitiven Fähigkeiten zu kontrollieren (McKinley et al., 2003). Die Bedeutung des RAS-Stoffwechsels in der Regulation kognitiver Fähigkeiten des Gehirns wurde bereits vor drei Jahren durch den Nachweis von Mutationen im Angiotensin Typ 2 Rezeptor gezeigt (Vervoort et al., 2002), und konnte jetzt durch die Identifizierung einer sehr spezifischen Veränderung im Renin-Rezeptor-Gen in der XMRE- (**X**-linked **M**ental **R**etardation and **E**pilepsy) Familie durch uns weiter bestätigt werden.

Kopplungsanalysen lokalisierten das Gen, das in dieser Familie verändert ist, in der Region Xp21.1-Xp11.4, zwischen den Markern *DXS8054* and *DXS1049* (Hedera et al., 2002). Neben 25 anderen Genen, fanden wir in diesem Bereich das Gen *ATP6AP2*, das für den Renin-Rezeptor kodiert. Eine stille Mutation im Exon 4 des Gens (Nucleotide Position 321C->T), die eine putative exonische-Spleiß-“Enhancer” (ESE) Stelle verändert (Cartegni et al., 2002), resultiert im Verlust von Exon 4 in etwa 50% der Renin-Rezeptor-mRNA. Die Untersuchung des Rezeptors in den Blutzellen von Patienten zeigte die normale und eine verkürzte Form. Erste funktionelle Untersuchungen zeigten, dass der veränderte Rezeptor ähnlich wie der Wildtyp-Rezeptor Renin weiterhin binden kann. Jedoch werden die beiden MAP-Kinasen ERK1/2 schwächer aktiviert als in den Kontrollen (Ramser et al., 2005). Diese Befunde bestätigen die wichtige Rolle des Renin-Angiotensin-Systems (RAS), bei der Regulation kognitiver Entwicklungsprozesse und weisen auf eine von Angiotensin II unabhängige Rolle des Renin-Rezeptors in diesem Prozess hin. Aktuelle Arbeiten von einem unserer Kooperationspartner weisen darauf hin, dass tatsächlich in bestimmten Neuriten der Patienten die beiden MAP-Kinasen ERK1/2 durch NGF schwächer stimuliert werden (Walker et al., 2006).

II.1.3 Trunkierende Mutationen in dem mitochondrialen Gen *FTSJ1* verursachen isolierte mentale Retardierung

Eine große belgische Familie, die mit MRX9 bezeichnet wird, wurde ebenfalls in die Xp11.4-Xp11.22-Region kartiert (Winnepenninckx et al., 2002). In dieser Familie, die aus vier Generationen besteht, gibt es sieben betroffene Männer. Bei diesen wurde eine milde bis schwere Form mentaler Retardierung festgestellt, aber keine anderen klinischen oder dysmorphen Auffälligkeiten. Um das Gen, das in dieser Familie verändert ist, zu finden, haben wir insgesamt 30 Gene, die im genetischen Intervall liegen, nach Veränderungen untersucht. Durch genomische Sequenzanalysen in einem betroffenen männlichen Indexpatienten konnte eine Veränderung in einer Spleißakzeptorstelle (IVS2-2a->T) des *FTSJ1*-Gens gefunden werden. Dieses Gen liegt in der Xp11.23-Region zwischen den Markern *DXS6949* und *DXS6941* und enthält 13 Exone, von denen 11 kodierend sind. Die gefundene Veränderung führt zum Verlust von Exon 4, der in einer Leserasterverschiebung und einem vorzeitigen Stopcodon nach Aminosäurenposition 81 führt (Ramser et al. 2004). Freude et al. (2004)

haben unabhängig von uns trunkierende Mutationen im *FTSJ1*-Gen bei anderen MRX-Familien gefunden. Diese Familien zeigten ebenfalls außer mentaler Retardierung keine Auffälligkeiten.

Das aufgrund eines offenen Leserahmens vorhergesagte FTSJ1 Protein besteht aus 330 Aminosäuren und ist evolutionär stark konserviert. So beträgt die Identität mit dem Ftsj Protein aus dem *E. coli* Bakterium 34% und die Ähnlichkeit 52%. In *E. coli* wurde Ftsj als "heat shock"-Protein charakterisiert, dass die 23S rRNA an Position U2552 methyliert. Dabei wird S-Adenosyl-Methionin (SAM) als Lieferant der Methylgruppe benutzt. Tatsächlich spielt die Methylierung an der Ribose 2'-OH-Gruppe eine wichtige Rolle bei dem Zusammenfügen des ribosomalen Komplexes und bakterielle Ftsj Null-Mutanten zeigen ein deutlich verändertes ribosomales Profil und Wachstumsretardierung (Bugl et al., 2000). In allen eukaryontischen Spezies, die bisher untersucht wurden, konnten drei unterschiedliche homologe Proteine von Ftsj gefunden werden. Allerdings ist bis jetzt nicht bekannt, ob diese Proteinfamilie im Menschen eine ähnliche oder gar identische Funktion hat wie Ftsj im Bakterium. Da aber die Konservierung der Aminosäuren, speziell in den funktionellen Domänen, sehr hoch ist zwischen diesen drei Proteinen, haben sie wahrscheinlich eine ähnliche Funktion und können möglicherweise, außer im Gehirn, einander kompensieren. Dies könnte auch erklären, warum in den Patienten andere Organe nicht betroffen sind. Da bis jetzt nur wenig über die Rolle des eukaryontischen FTSJ1 im Allgemeinen und im Gehirn im Besonderen bekannt ist, sollten funktionelle und zelluläre Untersuchungen durchgeführt werden.

II.1.4 Das *HADH2*-Gen ist in der MRXS10 Familie reduziert exprimiert

Eine andere Familie mit einer syndromischen Form von MRX wurde ebenfalls in den zentromernahen Teil von Xp kartiert und als MRXS10 (Reyniers et al., 1999) bezeichnet. Alle betroffenen Männer in der Familie zeigen milde Formen mentaler Retardierung in Kombination mit Choreoathetose und abnormen Verhalten. Durch Feinkartierungen konnte das genetische Intervall für diese Entität zwischen die Marker *DXS228* (Xp11.3) und *DXS991* (Xp11.21) gelegt werden. Wir haben umfangreiche Mutationsanalysen in der MRXS10-Familie durchgeführt und insgesamt 67 von 90 annotierten Genen, die in diesem Bereich liegen, nach Veränderungen untersucht. Dabei fanden wir eine neue stille Mutation im *HADH2*-Gen. Es kodiert für ein Protein, das L-3-Hydroxyacyl-dehydrogenase II genannt wird und ein mitochondriales Enzym darstellt, das zur "short-chain dehydrogenase/reductase superfamily" gehört. Durch funktionelle Analysen konnte bereits gezeigt werden, dass es ein multifunktionales Enzym ist, das mehrere Substrate binden bzw. verändern kann (Powell et al., 2000). Interessanterweise führen Punktmutationen im *HADH2*-Gen, die einzelne Aminosäureaustausche bewirken, zur 2-Methyl-3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase-(MHBD)-Defizienz. Diese Stoffwechselerkrankung ist charakterisiert durch kognitive Beeinträchtigung und Verzögerungen der motorischen Entwicklung, spastische Diplegie, und occipitale periventriculäre Läsionen in der weißen Substanz, die durch Kernspintomographie im Gehirn sichtbar werden (Ofman et al., 2003).

Die neue stille Mutation, die im *HADH2*-Gen der MRXS10 Familie gefunden wurde, verursacht, wie die stille Mutation im *ATP6AP2*-Gen, ein dereguliertes Spleißen. Dabei kommt es wie im Falle der XMRE-Familie zur Generierung von Wildtyp- und aberranten Fragmenten. Diese spezifische Veränderung segregiert in der MRXS10-Familie und konnte bisher nicht in 400 männlichen und 600 weiblichen Kontrollen gefunden werden. Außerdem konnte die Veränderung bis jetzt auch nicht in 40 RNAs von männlichen Kontrollen gefunden werden. Dass die identifizierte stille Veränderung ursächlich für den aberranten Spleißvorgang ist, konnte inzwischen auch in einem "in vitro Expressions-system" gezeigt werden. Diese Daten wurden beim 12. Internationalen MRX-Kongress in Williamsburg, Virginia, USA, und vor kurzem beim Europäischen Humangenetik-Kongreß präsentiert (Ramser et al., 2006). Gegenwärtig werden die Daten, die inzwischen auch durch proteinchemische Untersuchungen untermauert wurden, für eine Publikation in einem hochrangigen genetischen Journal zusammengefasst. Tatsächlich korrespondiert eine durch quantitative RT-PCR nachgewiesene reduzierte Expression des Wildtypfragments mit einer um 50-70%igen Reduktion des HADH2-Proteins. Durch unsere Arbeiten wurde auch deutlich, dass einzelne Aminosäureaustausche in diesem Protein (siehe oben) zu einem anderen Fänotyp führen wie seine reduzierte Expression.

Das HADH2-Protein, von dem viele **Akronyme** existieren, wie z. B. ABAD, SCHAD und ERAB, ist schon durch mehrere Gruppen charakterisiert worden. Durch die Arbeiten von He et al. (1999) wurde deutlich, dass es ein mitochondriales Protein ist, das Östradiol und Testosteron oxidiert. Es ist ein Homotetramer mit einem Molekulargewicht von 108 kDa. In einer kürzlichen Arbeit (Tieu et al., 2004) wurde gezeigt, dass die Expression von HADH2 vor Parkinson schützt und dementsprechend in den Gehirnen von Parkinson-Patienten reduziert ist. Allerdings zeigen die betroffenen Männer der MRXS10 Familie, bei denen HADH2 reduziert ist, bis jetzt keine klinischen Anzeichen von Parkinson. Ob HADH2 in Alzheimer Patienten eher hoch- oder eher runterreguliert ist, ist gegenwärtig noch unklar. Während Lustbader et al. (2004) zeigten, dass HADH2 und das Amyloid- β -Protein direkt in Mitochondrien interagieren und damit die A β induzierte mitochondriale Toxizität unterstützt, finden Frackowiak et al. nur geringe Mengen an HADH2 in Zellen, in denen sich A β akkumuliert hat.

II.1.5 Identifizierung eines Kandidatengens für SMAX2

Parallel zur Identifizierung von MRX-Genen beschäftigten wir uns mit der Suche nach Genen, die in SMAX-Familien verändert sind. Die Identifizierung des SMAX2-Gens sollte dazu beitragen, die zellulären und molekularen Ursachen der infantilen Form von SMA weiter aufzuklären und möglicherweise auch das Verständnis des Wirkungsmechanismus des SMN1-Proteins erweitern.

Wie oben beschrieben, konnte die Erkrankung mithilfe mehrerer großer Familien in ein 20 Mb großes Intervall zwischen den Markern *DXS8035* und *DXS1174* lokalisiert werden. Durch eigene und den Arbeiten anderer nationaler und internationaler Gruppen, konnten in diesem Intervall bis jetzt **160** annotierte Gene lokalisiert werden (Ross et al. 2005, Ramser J, unveröffentlichte Daten), von denen

schon 36 mit anderen Erkrankungen assoziiert werden konnten. Außerdem befinden sich dort ca. 35 LOC-Gene, die nur auf Genvorhersagen beruhen und ca. 75 einzelne ESTs („expressed sequence tags“). Aktuelle Auswertungen konnten auch die Existenz von mindestens 10 Mikro-RNAs zeigen (Ramser et al., unveröffentlichte Daten). Um ein Gen für SMAX2 zu identifizieren, wurde die Mutationsanalyse in einer großen Familie vollständig und in einer zweiten Familie in den meisten annotierten Genen durchgeführt. Von den 35 LOC-Genen wurden bis jetzt nur die Hälfte in beiden Familien untersucht.

Während in der großen SMAX2-Familie (KY), die von Kobayashi et al. (1995) veröffentlicht wurde, bis jetzt keine Veränderung in den untersuchten 124 annotierten und 18 LOC-Genen gefunden wurde, konnte in der zweiten großen Familie (AR) eine Variante in einem Gen aus der Xp11.23-Region gefunden werden. Diese Variante wurde nach Ablauf der Förderung validiert und es ist sehr wahrscheinlich, dass es sich um eine pathogene Variante handelt, obwohl die andere große SMAX-Familie in diesem Gen bis jetzt keine Veränderung zeigt.

Bei der Variante, die in der AR-Familie gefunden wurde, handelt es sich um einen Aminosäureaustausch, der a) in dem betroffenen Protein stark evolutionär (bis Tetraodon) konserviert ist, b) nicht in 1500 Kontrollchromosomen zu finden war und c) sehr wahrscheinlich mit einem anderen Protein, das bei neurologisch auffälligen Patienten verändert ist, interagiert. Gegenwärtig versuchen wir mit einem immunhistochemischen Ansatz diese Interaktion zu beweisen, bzw. dass sie durch die gefundene Veränderung verhindert wird. Eine Veröffentlichung dieser Daten in einem hochrangigen Journal ist ebenfalls geplant.

Ob es sich bei SMAX2 ebenso wie bei MRX um Mikroheterogenität handelt (mehrere Familien kartieren in das gleiche Intervall), ist gegenwärtig nicht zu beantworten. Es ist nicht auszuschließen, dass die KY-Familie eine Veränderung im Promoterbereich des von uns identifizierten Kandidatengens zeigt. In der Zwischenzeit wurde noch eine große spanische Familie in die Mutationsanalyse einbezogen. Diese zeigt aber im Unterschied zu den anderen Familien eine verschobene, d. h. nicht zufällige X-Inaktivierung (Dr. Baumbach, persönliche Mitteilung) und sollte deshalb entweder ebenfalls in einem anderen Gen mutiert sein, oder eine Deletion in unserem Kandidatengen plus einem benachbarten Gen, zeigen. Diese Hypothese wird gegenwärtig mithilfe eines Southern-Blots überprüft.

II.2 Ausblick und voraussichtlicher Nutzen:

Ziel von künftigen Projekten kann die zelluläre Charakterisierung von drei Genen, die überwiegend von unserer Arbeitsgruppe mit X-gekoppelter mentaler Retardierung (XLMR) assoziiert wurden, sein. Obwohl alle Gene ubiquitär exprimiert werden, führen die identifizierten Veränderungen in diesen Genen im Wesentlichen nur im Gehirn zu einem Phänotyp und eignen sich deshalb zur Charakterisierung der Spezifität kognitiver Prozesse.

Eine Mutation in einem putativen "Exonischen Splice-Enhancer" (ESE), die zu einer veränderten Expression des *Reninrezeptor*-Gens führt, konnten wir mit dem kombinierten Auftreten von mentaler Retardierung und Epilepsie (XMRE) assoziieren. Die molekularen Konsequenzen der veränderten Expression des Reninrezeptors könnten durch RNAi-Experimente in HeLa- und PC12-Zellen bestimmt werden. Die Ermittlung von weiteren Genen, die nach halbiertes bzw. vollständiger Expressionsreduktion des *ATP6AP2*-Gens dereguliert werden, ermöglicht eventuell die nähere Bestimmung der zellulären Rolle des Reninrezeptors. Die phänotypische Analyse von veränderten PC12-Zellen könnte außerdem den möglichen Einfluss des Reninrezeptors auf die Differenzierung und Wachstum neuronaler Zellen aufklären.

Die reduzierte Expression eines zweiten Gens, dem *HADH2*-Gen, führt zu einer syndromischen Form von MRX, die durch Choreoathetose und milder mentaler Retardierung gekennzeichnet ist. Die verringerte Expression wird wiederum durch einen Nukleotidaustausch verursacht, der den korrekten Spleißvorgang moduliert. Um die multifunktionelle Wirkungsweise des mitochondrialen Proteins *HADH2* in einem zellulären System näher zu charakterisieren, kann auf bereits zahlreich vorliegende Untersuchungen aufgebaut werden. So ist z. B. bekannt, dass *HADH2* auch am Abbau von Steroiden im Gehirn beteiligt ist. Um speziell die Rolle von Steroiden bei der Ausbildung kognitiver und neurologischer Fähigkeiten besser zu verstehen, sollen wie im Falle des Reninrezeptors RNAi-Experimente durchgeführt werden um koregulierte Gene zu ermitteln. Da *HADH2* möglicherweise auch in der somatischen Tumorgenetik eine Rolle spielen könnte, sollen in einem Seitenprojekt auch östrogenpositive Mammakarzinome untersucht werden.

Trunkierende Mutationen im *FTSJ1*-Gen, dem dritten Gen das näher charakterisiert werden müßte, führen zu einer nicht-syndromischen MRX-Form. Bis jetzt ist nur bekannt, dass das *FTSJ1*-Protein in Bakterien die 23S rRNA methyliert und eine Defizienz dort zu einem stark veränderten ribosomalen Profil führt. Durch Untersuchungen der ribosomalen rRNA und tRNA der Patienten und durch "in vitro" Experimente soll in einem ersten Schritt geklärt werden, ob auch das humane *FTSJ1* an Methylierungsprozessen beteiligt ist. Außerdem werden durch Expressionsanalysen in Lymphozyten betroffener und nicht betroffener Männer Gene ermittelt, die durch die vermutete reduzierte Methylierungskapazität des aberrant exprimierten *FTSJ1*-Gens, differenziell exprimiert werden. Damit

sollen biologische Prozesse identifiziert werden, in die *FTSJ1* involviert ist, und deren Deregulation nur im neuronalen System klinisch auffällig wird.

Die mögliche pathogene Variante, die in einer großen *SMAX*-Familie gefunden wurde, muß zuerst weiter validiert werden. Da sie sich in einem Protein befindet, das zu einer gut charakterisierten Proteinfamilie gehört, wäre die Assoziation mit *SMAX* von höchstem Interesse.

II.3 Unterstützende Arbeiten

Entfällt

II.4 Referenzen (normal) und eigene erfolgte Veröffentlichungen (fett) während 01KW9974/2

Bugl H et al. (2000). RNA methylation under heat shock control. *Mol Cell* 6: 349-360.

Berntson A, Taylor WR, Morgans CW (2003). Molecular identity, synaptic localization, and physiology of calcium channels in retinal bipolar cells. *J Neurosci Res* 71: 146-151.

Bader I, Brandau O, Achatz H, Apfelstedt-Sylla E, Hergersberg M, Lorenz B, Wissinger B, Wittwer B, Rudolph G, Meindl A, Meitinger T (2003). X-linked retinitis pigmentosa: *RPGR* mutations in most families with definite X linkage and clustering of mutations in a short sequence stretch of exon ORF15. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44:1458-63.

Baumbach L et al. (1994). X-linked lethal infantile spinal muscular atrophy: from clinical description to molecular mapping. (Abstract) *Am. J. Hum. Genet.* 55 (suppl.): A211.

Bech-Hansen NT et al. (1998). Loss-of-function mutations in a calcium channel alpha1-subunit gene in Xp11.23 cause incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat Genet* 19: 264-267.

Cartegni L, Chew L, Krainer AR (2002). Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev* 3: 285-297.

Chiurazzi P, Tabolacci E, Neri G (2004). X-linked retardation (XLMR): from clinical conditions to cloned genes. *Crit Rev Clin Lab Sci* 41:117-158.

Demirci FY, Ramser J, White NJ, Rigatti BW, Meindl A, Lewis KF, Wen G, Gorin MB. Refinement of the physical location and the genomic characterization of the *CRSP2 (EXLM1)* gene on Xp11.4 (2003). *DNA Seq.* 14:123-7.

Dzau VJ et al. (2001). The relevance of tissue angiotensin-converting enzyme: manifestations in mechanistic and endpoint data. *Am J Cardiol* 88: 1L-20L.

Frackowiak J et al. (2001) Deposition of Alzheimer's vascular amyloid- β is associated with decreased expression of brain L-3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase (ERAB). *Brain Res* 907: 44-53.

Freude K et al. (2004). Mutations in the *FTSJ1* Gene Coding for a Novel S-Adenosylmethionine-Binding Protein cause Nonsyndromic X-Linked mental Retardation. *Am J Hum Genet* 75(2): 305-309.

Gard PR (2002). The role of angiotensin II in cognition and behaviour. *Eur J Pharmacol* 438: 1-14.

He XY et al. (1999) Human brain short chain L-3-hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase is a single-domain multifunctional enzyme. *J Biol Chem* 274: 15014-15019.

- Hedera P et al. (2002). Novel Mental Retardation-Epilepsy Syndrome Linked to Xp21.1-p11.4. *Ann Neurol* 51: 45-50.
- Lubs H, Abidi F, Echeverri R, Holloway L, Meindl A, Stevenson RE, Schwartz CE (2006) Golabi-Ito-Hall syndromes results from a missense mutation in the WW domain of the *PQBPI* gene. *J Med Genet* 43:e30.**
- Kalscheuer V et al. (2003). Mutations in the polyglutamine binding protein 1 gene cause X-linked mental retardation. *Nat Genet* 35: 313-315.
- Khan NW et al. (2004). Primate retinal signaling pathways: Suppressing ON-pathway activity in monkey with glutamate analogs mimics human genetic CSNB1-NYX night blindness. *J Neurophysiol* Epub.
- Kleefstra und Hamel (2005) X-linked mental retardation: further lumping, splitting and emerging phenotypes. *Clin Genet* 67: 451-467
- Kobayashi H et al. (1995) A gene for a severe lethal form of X-linked arthrogryposis (X-linked spinal muscular atrophy) maps to human chromosome Xp11.3-q11.2. *Hum Mol Genet* 4: 1213-1216.
- Lenski C, Abidi F, Meindl A, Gibson A, Platzer M, Kooy RF, Lubs HA, Stevenson RE, Ramser J, Schwartz CE (2004). Novel Truncating Mutations in the *Polyglutamine Tract Binding Protein 1 Gene (PQBPI)* Cause Renpenning Syndrome and X-Linked Mental Retardation in Another Family with Microcephaly. *Am J Hum Genet* 74: 777-780.**
- Lustbader JW et al. (2004) ABAD directly links A β to mitochondrial toxicity in Alzheimer disease. *Science* 304: 448-452.
- McKinley MJ et al. (2003). The brain-angiotensin system: location and physiological roles. *Int J Biochem Cell Biol* 35:901-18.
- Ofman R et al. (2003) 2-Methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency is caused by mutations in the *HADH2* gene. *Am J Hum Genet* 72: 1300-1307.
- Powell AJ et al. (2000). Recognition of structurally diverse substrates by type II 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HADH II)/amyloid-beta binding alcohol dehydrogenase (ABAD). *J Mol Biol* 303: 311-327
- Pusch, C.M., Zeitz, C., Brandau, O., Pesch, K., Achatz, H., Feil, S., Scharfe, C., Maurer, J., Jacobi, F.K., Pinckers, A., Andreasson, S., Hardcastle, A., Wissinger, B., **Meindl, A.** (2000) The complete form of X-linked congenital stationary night blindness is caused by mutations in a gene encoding a leucine-rich repeat protein. *Nat Genet* 26: 324-327.
- Pusch CM, Maurer J, Ramser J, Tomiuk J, Achatz H, Pesch K, Lichner P, Apfelstedt-Sylla E, Jacobi FK, Berger W, Meindl A, Wissinger B (2001) Complete form of X-linked congenital stationary night blindness: refined mapping and evidence of genetic homogeneity. *Int J Mol Med* 7: 155-161.
- Ramser J et al. (2004). A splice site mutation in the methyltransferase gene *FTSJ1* in Xp11.23 is associated with non-syndromic mental retardation in a large Belgian family (MRX9). *J Med Genet* 41: 679-683.**
- Ramser J, Abidi F E, Burckle C, Lenski C, Toriello H, Wen G, Lubs H, Engert S, Stevenson R, Meindl A, Schwartz C E, Nguyen G (2005). A unique exonic splice enhancer mutation in a family with X-linked mental retardation and epilepsy points to a novel role of the renin receptor. *Hum Mol Genet.* 14:1019-27.**
- Ramser J, Lenski C, Winnepenninckx B, Schwartz CE, Meindl A, Kooy RF (2006). X-linked mental retardation, choreoathetosis and abnormal behaviour (MRXS10) is caused by an unique mutation in an ubiquitously expressed gene. *Eur J Hum Genet* 14 Suppl 1: P0751**
- Renpenning H, Gerrard JW, Zaleski WA, Tabata T (1962). Familial sex-linked mental retardation. *Can Med Assoc J* 87: 954-957.

Reyniers E et al. (1999). A New Neurological Syndrome with Mental Retardation, Choeoathetosis, and Abnormal Behaviour Maps to Chromosome Xp11. *Am J Hum Genet* 65: 1406-1412.

Ropers HH et al. (2003). Nonsyndromic X-linked mental retardation: where are the missing mutations? *Trends Genet* 19: 316-320.

Ross MT, Grafham DV, Coffey, AJ, Scherer, S, McLay, K., Muzny, D., Platzer, M., Howell, G.R., Burrows, C., Bird, C.P., Frankish, A., Lovell, F.L., Howe, K.L., Ashurst, J.L., Fulton, R.S., Sudbrak, R., Wen, G., Jones, M.C., Hurles, M.E., Andrews, T.D., Scott, C.E., Searle, S., Ramser, J, and Meindl A et al. (2005) The DNA sequence of the X chromosome. *Nature* 434: 325-337.

Stevenson RE et al. (1998). Renpenning Syndrome maps to Xp11. *Am J Hum Genet* 62: 1092-1101.

Strom, T. M., Nyakatura, G., Apfelstedt-Sylla, E., Hellebrand, H., Lorenz, B., Wutz, K., Gutwillinger, N., Rüther, K., Weber, B., Drescher, B., Zrenner, E., Meitinger, T., Rosenthal, A., **Meindl, A.** (1998) An L-type calcium channel gene (*CACNA1F*) mutated in incomplete X-linked congenital stationary night blindness (CSNB2). *Nat Genet* 19: 260-263

Sudol M, Sliwa K, Russo T (2001). Functions of WW domains in the nucleus. *FEBS Letters* 490: 190-195.

Tieu K et al. L-3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase II protects n a model of Parkinson´s disease. *Ann of Neurol* 56: 51-60.

Thiselton DL, McDowall J, Brandau O, Ramser J, d'Esposito F, Bhattacharya SS, Ross MT, Hardcastle AJ, Meindl A (2002). An integrated, functionally annotated gene map of the DXS8026-ELK1 interval on human Xp11.3-Xp11.23: potential hotspot for neurogenetic disorders. *Genomics* 79:560-72.

Toniolo D (2000). In search of the MRX genes. *Am J Med Genet* 97:221-227.

Vervoort et al. (2002) AGTR2 mutations in X-linked mental retardation. *Science* 296: 2401-2403.

Walker J et al. (2006) The mutation in the Renin Receptor (ATP6A2) associated with XMRE (X-linked MR-epilepsy) significantly reduces ERK1/2 activation by NGF in neurites. *Eur J Hum Genet Suppl*1:C43.

Wen G, Ramser J, Taudien S, Gausmann U, Blechschmidt K, Frankish A, Ashurst J, Meindl A, Platzer M (2005) Validation of mRNA/EST-based gene predictions in human Xp11.4 revealed differences to the organization of the orthologous mouse locus. *Mamm Genome* 16:934-941.

Winnepenninckx B et al. (2002). Family MRX9 Revisited: Further Evidence for Locus Heterogeneity in MRX. *Am J Med Genet* 112: 17-22.

Wutz K, Sauer C, Zrenner E, Lorenz B, Alitalo T, Broghammer M, Hergersberg M, de la Chapelle A, Weber BH, Wissinger B, Meindl A, Pusch CM (2002). Thirty distinct *CACNA1F* mutations in 33 families with incomplete type of XLCSNB and *Cacna1f* expression profiling in mouse retina. *Eur J Hum Genet.* 10:449-56

Zito I, Allen LE, Patel RJ, Meindl A, Bradshaw K, Yates JR, Bird AC, Erskine L, Cheetham ME, Webster AR, Poopalasundaram S, Moore AT, Trump D, Hardcastle AJ (2003) Mutations in the *CACNA1F* gene and *NYX* genes in British CSNBX families (2003). *Hum Mut* 21: 169.

Tabelle1

MARKER	GEN	GEN FUNKTION	ERKRANKUNG	OMIM #	REFERENZEN
<i>DXS1394</i>	<i>CYBB</i>	Cytochrome b-245, beta polypeptide	Chronic granulomatous disease	MIM300481	Royer-Pokora, B. <i>et al.</i> Cloning the gene for an inherited human disorder-chronic granulomatous disease-on the basis of its chromosomal location. <i>Nature</i> 322:32-38, 1986.
<i>DXS6679</i>	<i>RPGR</i>	Retinitis pigmentosa GTPase regulator	Retinitis pigmentosa	MIM312610	Meindl, A. <i>et al.</i> A gene (RPGR) with homology to the RCC1 guanine nucleotide exchange factor is mutated in X-linked retinitis pigmentosa (RP3). <i>Nature Genet.</i> 13:35-42, 1996.
<i>DXS9851</i>	<i>OTC</i>	Ornithine carbamoyltransferase	Ornithine transcarbamylase deficiency	MIM300461	Rozen, R. <i>et al.</i> Gene deletion and restriction fragment length polymorphisms at the human ornithine transcarbamylase locus. <i>Nature</i> 313: 815-817, 1985.

Tabelle1

DXS1409	TM4SF2	The gene encodes the transmembrane protein 4, superfamily member 2, that interacts with extracellular molecules and appears to be involved in intracellular signaling. It is ubiquitously expressed and is a member of the tetraspanin family of proteins that are known to participate in molecular complexes including beta1-integrins. The gene was found to be inactivated by a X-breakpoint of a X,2 balanced translocation in a patient with nonsyndromic mental retardation. Further investigation led to the identification of additional mutations in <i>TM4SF2</i> in the MRX58 family: a premature stop codon, TGA (gly218-to-ter), predicting a truncated protein lacking the fourth trans-membrane segment and the carboxyterminal domain, a two bp deletion (564delGT), resulting in a premature stop codon at position 192 and a C-A transversion resulting in a nonconservative pro172-to-his substitution.	Nonsyndromic mental retardation	MIM300096	Zemni, R. <i>et al.</i> A new gene involved in X-linked mental retardation identified by analysis of an X;2 balanced translocation. <i>Nature Genet.</i> 24:167-170, 2000.
	BCOR	BCL6 co-repressor	Oculofaciocardiodental and Lenz microphthalmia	MIM300412	Ng, D. <i>et al.</i> Oculofaciocardiodental and Lenz microphthalmia syndromes result from distinct classes of mutations in BCOR. <i>Nature Genet.</i> 36:411-416, 2004.
	ATP6AP2	The gene encodes the renin receptor, a 350 amino acid large protein with a single transmembrane domain and with no homology to any known membrane protein. It was shown that the binding of renin to the renin receptor induces a fourfold increase of the catalytic efficiency of angiotensinogen conversion to angiotensin I and induces an intracellular signal associated to an activation of MAP kinases ERK1/2. A silent mutation in a putative exonic splicing enhancer (ESE) in exon 4 resulted in inefficient inclusion of exon 4 in 50% of renin receptor mRNA in a patient with X-linked mental retardation and epilepsy (XMRE) syndrome. Functional studies showed, that renin binding failed to activate ERK1/2 in this patient.	Mental retardation and epilepsy (XMRE)	----	Ramser, J. <i>et al.</i> A unique exonic splice enhancer mutation in a family with X-linked mental retardation and epilepsy points to a novel role of the renin receptor. <i>Hum Mol Genet.</i> 14:1019-27, 2005.

Tabelle1

<i>DXS8012</i>	<i>NYX</i>	Nyctalopin	Congenital stationary night blindness type 1 (CSNB, complete)	MIM300278	Pusch, C. M. <i>et al.</i> The complete form of X-linked congenital stationary night blindness is caused by mutations in a gene encoding a leucine-rich repeat protein. <i>Nature Genet.</i> 26: 324-327, 2000 and Bech-Hansen, N. T. <i>et al.</i> Mutations in <i>NYX</i> , encoding the leucine-rich proteoglycan nyctalopin, cause X-linked complete congenital stationary night blindness. <i>Nature Genet.</i> 26:319-323, 2000.
	<i>MAOA</i>	<i>MAOA</i> encodes the monoamine oxidase A, an enzyme of the mitochondrial outer membrane. It catalyzes the oxidative deamination of biogenic amines throughout the body. The enzyme is critical in the neuronal metabolism of catecholamine and indolamine transmitters. In a large Dutch family, affected males showed a mild form of mental retardation in association with a particular aggressive and violent behaviour. Urinalysis in 3 affected males indicated a marked disturbance of the monoamine metabolism, which was considered to be consistent with a primary defect in the gene for <i>MAOA</i> . Further analysis revealed the identification of a point mutation in the eighth exon of <i>MAOA</i> in 5 affected males.	Monoamine oxidase A deficiency and Brunner Syndrome	MIM309850	Brunner, H. G. <i>et al.</i> X-linked borderline mental retardation with prominent behavioral disturbance: phenotype, genetic localization, and evidence for disturbed monoamine metabolism. <i>Am. J. Hum. Genet.</i> 52: 1032-1039, 1993.
	<i>NDP</i>	Norrie disease protein	Norrie disease (pseudoglioma)	MIM310600	Berger, W., Meindl, A. <i>et al.</i> Isolation of a candidate gene for Norrie disease by positional cloning. <i>Nature Genet.</i> 1:199-203, 1992.

Tabelle1

	<i>ZNF674</i>	Zinc finger protein 674. By analysis of BAC clones followed by PCR of a fetal brain cDNA bank and 3-prime and 5-prime RACE, Lugtenberg et al. (2006) identified the ZNF674 gene, a novel Kruppel-associated box-containing zinc finger gene present in a 1-Mb deletion of chromosome Xp11.3 in a child with learning disabilities, retinal dystrophy, and short stature. The ZNF674 cDNA encodes a protein with KRAB A and B domains and 11 Kruppel-type C2H2 zinc finger domains.	Nonsyndromic mental retardation		Lugtenberg, D. et al. ZNF674: A New Kruppel-Associated Box-Containing Zinc-Finger Gene Involved in Nonsyndromic X-Linked Mental Retardation. <i>Am J Hum Genet.</i> 78:265-78, 2006.
<i>DXS1146</i>	<i>RP2</i>	Retinitis pigmentosa 2 protein	Retinitis pigmentosa 2	MIM312600	Schwahn, U. <i>et al.</i> Positional cloning of the gene for X-linked retinitis pigmentosa 2. <i>Nature Genet.</i> 19:327-332, 1998.
<i>DXS1004E</i>	<i>ZNF41</i>	Zinc finger protein 41, that potentially encodes a polypeptide featuring an array of 18 contiguous zinc fingers of the C2H2 type. A balanced translocation t(X;7) (p11.3; q11.21) in a female patient with severe nonsyndromic mental retardation disrupted ZNF41 at the X chromosomal breakpoint. Expression studies indicated that ZNF41 transcripts were absent in the patient cell line. The screening of a panel of patients with MRX led to the identification of two ZNF41 mutations in two other MRX families that were not found in healthy control individuals: a P111L amino acid exchange and an intronic splice-site mutation that resulted in the loss of specific splice variants of the gene.	Nonsyndromic mental retardation	MIM314995	Shoichet, S. A. <i>et al.</i> Mutations in the ZNF41 gene are associated with cognitive deficits: Identification of a new candidate for X-linked mental retardation. <i>Am. J. Hum. Genet.</i> 73: 1341-1354, 2003.

Tabelle1

RH93309	PFC	Properdin P factor complement	Properdin deficiency X-linked	MIM300383	Westberg, J. <i>et al.</i> Sequence-based analysis of properdin deficiency: identification of point mutations in two phenotypic forms of an X-linked immunodeficiency. <i>Genomics</i> 29:1-8, 1995 and van den Bogaard, R. <i>et al.</i> Molecular characterisation of 10 Dutch properdin type I deficient families: mutation analysis and X-inactivation studies. <i>Europ. J. Hum. Genet.</i> 8:513-518, 2000.
RH69105	ELK1	The gene is a member of the ETS oncogene family. The protein encoded by this gene acts as a transcription factor and contains an ETS domain, a B-box, a D-domain and a C terminal TAD-domain. Highest expression was found in brain, lung and testis. A T108A amino acid substitution in exon 4 was detected in a three generation family with MR. The substitution cosegregated with the phenotype of the MR-patients.	Mental retardation Schroer Syndrome	MIM311040	Schroer, A. <i>et al.</i> Cosegregation of T108A Elk-1 with mental retardation. <i>Am. J. Med. Genet.</i> 95:404-405, 2000.
	ZNF81	Zinc finger protein 81. The breakpoint of a de novo translocation (t(X;9)(p11.23;q34.3) in a mentally retarded female was found to disrupt <i>ZNF81</i> . Mutation analysis in more than 300 families and patients with MRX revealed a sequence change c.536G>A in exon 6 in the MRX45 family, resulting in an amino acid substitution p.S179N that was fully segregating with the phenotype.	Nonsyndromic mental retardation	MIM314998	Kleefstra <i>et al.</i> Zinc finger 81 (<i>ZNF81</i>) mutations associated with X-linked mental retardation. <i>J. Med. Genet.</i> 41(5):394-399, 2004.

Tabelle1

<i>DXS6941</i>	<i>FTSJ1</i>	FtsJ homolog 1 (<i>E. coli</i>). The protein encoded by this gene is a member of the S-adenosylmethionine-binding protein family. It is a nucleolar protein and may be involved in the processing and modification of rRNA. It displayed a sequence alteration in the conserved acceptor splice site of intron 3 in affected males of the MRX9 family. This mutation results in skipping of exon 4 and introduces a premature stop codon in exon 5, leading to a severely truncated protein. Freude and colleagues could detect another mutation in <i>FTSJ1</i> in family MRX44 resulting in the deletion of exon 9.	Nonsyndromic mental retardation	----	Ramser, J. <i>et al.</i> A splice site mutation in the methyltransferase gene <i>FTSJ1</i> in Xp11.23 is associated with nonsyndromic mental retardation in a large Belgian family (MRX9). <i>J. Med. Genet.</i> 41(9):679-683, 2004 and Freude, K. <i>et al.</i> Mutations in the <i>FTSJ1</i> gene coding for a novel S-Adenosylmethionine-binding protein cause nonsyndromic X-linked mental retardation. <i>Am. J. Hum. Genet.</i> 75(2), 2004.
<i>RH63465</i>	<i>EBP</i>	Emopamil binding protein (sterol isomerase)	X-linked dominant chondrodysplasia punctata (CDPX2)	MIM300205	Derry, J. M. J. <i>et al.</i> Mutations in a delta(8)-delta(7) sterol isomerase in the tattered mouse and X-linked dominant chondrodysplasia punctata. <i>Nature Genet.</i> 22: 286-290, 1999.
<i>DXS1696 / DXS8281</i>	<i>WAS</i>	Wiskott-Aldrich syndrome protein	Wiskott-Aldrich syndrome eczema-thrombocytopenia	MIM300392	Derry, J. M. J. <i>et al.</i> Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. <i>Cell</i> 78:635-644, 1994.
	<i>GATA1</i>	GATA binding protein 1 (globin transcription factor 1)	X-linked dyserythropoietic anemia and thrombocytopenia	MIM305371	Nichols, K. E. <i>et al.</i> Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in <i>GATA1</i> . <i>Nature Genet.</i> 24:266-270, 2000.

Tabelle1

<i>RH38767</i>	<i>PQBP1</i>	The gene encodes the polyglutamine binding protein 1. The 265 amino acid large protein contains an N-terminal WW domain and a putative nuclear localization signal. It is ubiquitously expressed including several regions of the brain. Highest expression was found in the cerebellum, the hippocampus and the olfactory bulb. In 5 out 29 families with XLMR mutations were detected that caused frameshifts in the fourth coding exon, which contains a stretch of 6 AG dinucleotides in the DR/ER repeat. In the Sutherland-Haan family the affected males carried an extra AG dinucleotide. In the Renpenning family a 1-bp insertion was identified. It is proposed that mental retardation, microcephaly and short stature are consistent findings among individuals with <i>PQBP1</i> mutations.	X-linked mental retardation	MIM300463	Kalscheuer, V. M. <i>et al.</i> Mutations in the polyglutamine binding protein 1 gene cause X-linked mental retardation. <i>Nature Genet.</i> 35: 313-315, 2003 and Lenski, C. <i>et al.</i> Novel truncating mutations in the polyglutamine tract binding protein 1 gene (<i>PQBP1</i>) cause Renpenning syndrome and X-linked mental retardation in another family with microcephaly. <i>Am. J. Hum. Genet.</i> 74: 777-780, 2004.
<i>DXS1007E</i> <i>/DXS1208</i>	<i>CACNA1F</i>	Calcium channel, voltage-dependent, alpha 1F subunit	Congenital stationary night blindness type 2	MIM300110	Strom, T. M. <i>et al.</i> An L-type calcium-channel gene mutated in incomplete X-linked congenital stationary night blindness. <i>Nature Genet.</i> 19: 260-263, 1998 and Bech-Hansen, N. T. <i>et al.</i> Loss-of-function mutations in a calcium-channel alpha-1-subunit gene in Xp11.23 cause incomplete X-linked congenital stationary night blindness. <i>Nature Genet.</i> 19:264-267, 1998.
<i>DXS9795</i>	<i>FOXP3</i>	Forkhead box P3	X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome (XLAAD)	MIM300292	Chatila, T. A. <i>et al.</i> JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation (sic) syndrome. <i>J. Clin. Invest.</i> 106:R75-R81, 2000.

Tabelle1

<i>RH38802</i>	<i>CLCN5</i>	Chloride channel 5 protein	Nephrolithiasis 2, X-linked, Dent disease	MIM300008	Lloyd, S. E. <i>et al.</i> A common molecular basis for three inherited kidney stone diseases. <i>Nature</i> 370:445-449, 1996.
<i>DXS1044</i>	<i>FGD1</i>	Faciogenital dysplasia protein	Faciogenital dysplasia (Aarskog-Scott syndrome)	MIM305400	Pasteris, N. G. <i>et al.</i> Isolation and analysis of the faciogenital dysplasia (Aarskog-Scott syndrome) gene: a putative, rho/rac guanine nucleotide exchange factor. <i>Cell</i> 79:669-678, 1994.
<i>DXS7666</i>	<i>HADH2</i>	This gene encodes 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type II, a member of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. The gene product is a mitochondrial protein that catalyzes the oxidation of a wide variety of fatty acids, alcohols, and steroids. The protein has been implicated in the development of Alzheimer's disease, and mutations in the gene are the cause of 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency (MHBD). By mutation analysis HADH2 was also found to be mutated in patients presenting mental retardation, choreoathetosis and abnormal behaviour (MRXS10).	X-linked mental retardation choreoathetosis and abnormal behaviour	MIM300256	Lenski, C. <i>et al.</i> X-linked mental retardation, choreoathetosis and abnormal behaviour (MRXS10) is caused by aberrant splicing in the HADH2 gene. Manuscript submitted.
<i>RH63497</i>	<i>ALAS2</i>	Aminolevulinate, delta-, synthase 2	Sideroblastic/hypochromic anemia	MIM301300	Cotter, P. D. <i>et al.</i> Late-onset X-linked sideroblastic anemia: missense mutations in the erythroid delta-aminolevulinate synthase (<i>ALAS2</i>) gene in two pyridoxine-responsive patients initially diagnosed with acquired refractory anemia and ringed sideroblasts. <i>J. Clin. Invest.</i> 96:2090-2096, 1995.