

**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](mailto: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  $\alpha 1$ -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.