

# TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Deutsches Herzzentrum München  
Klinik für Kinderkardiologie und angeborene Herzfehler

MUTATIONSANALYSE DES INV-GENS  
(INV = INVERSION OF EMBRYONIC TURNING)  
BEI PATIENTEN MIT LATERALISATIONSDEFEKTEN  
(SITUS ANOMALIEN)

Patric Schön

Vollständiger Abdruck der von der  
Fakultät für Medizin der Technischen Universität München  
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: Univ.-Prof. Dr. J. Hess, Ph.D., em.  
Univ.-Prof. Dr. A. Görlach

Die Dissertation wurde am 18.05.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 24.10.2012 angenommen.



**Mutationsanalyse des INV-Gens  
(inv = inversion of embryonic turning)  
bei Patienten mit Lateralisations-  
defekten (Situs Anomalien)**

<b>1. Einführung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2. Entwicklungen in der Kinderkardiologie</b> .....	<b>1</b>
1.2.1. Inzidenz angeborener Herz- und Gefäßfehler .....	1
1.2.2. Ätiologie angeborener Herz- und Gefäßfehler .....	2
1.2.2.1. Primär genetische Faktoren.....	2
1.2.2.2. Primäre Umweltfaktoren.....	5
1.2.2.3. Multifaktorielle Ursachen (Gen-Umwelt-Interaktion).....	6
1.2.3. Entwicklungen in Diagnostik und Therapie angeborener Herz- und Gefäßfehler - vom Fetus bis zum Erwachsenen .....	7
<b>1.3. Einführung in die Genetik der Lateralisationsdefekte (= Heterotaxie) - Meilensteine und Perspektiven</b> .....	<b>9</b>
1.3.1. Entwicklung der normalen Lateralisation.....	9
1.3.2. Störung der Lateralisation im Tiermodell.....	12
1.3.3. Lateralisationsdefekte (= Situs Anomalien) beim Menschen .....	22
1.3.3.1. NODAL-Gen des Menschen .....	22
1.3.3.2. LEFTYA- und LEFTYB-Gen.....	24
1.3.3.3. EGF-CFC-Gene.....	26
1.3.3.4. ACVR2B-Gen.....	29
1.3.3.5. CONNEXIN 43-Gen .....	31
1.3.3.6. ZIC3-Gen des Menschen.....	35
1.3.3.7. INV-Gen .....	38
<b>2. Fragestellung</b> .....	<b>46</b>
<b>3. Patienten und Methodik</b> .....	<b>47</b>
<b>3.4. Patientengruppe</b> .....	<b>47</b>
<b>3.5. Material und Methodik</b> .....	<b>51</b>
3.5.1. Isolierung genetischen Materials .....	51
3.5.1.1. Desoxyribonukleinsäure (DNA) .....	51
3.5.1.2. Ribonukleinsäure (RNA).....	55
3.5.2. Mutationscreening.....	58
3.5.2.1. DNA-Mutationscreening .....	58
3.5.2.2. RNA-Mutationscreening .....	65
3.5.3. Weitere Methoden .....	66
<b>4. Ergebnisse der Mutationsanalyse</b> .....	<b>68</b>
<b>4.6. Polymorphismen</b> .....	<b>68</b>
4.6.1. Basenaustausch an Position 2402 .....	68
4.6.2. Basenaustausch an Position 2412 .....	68
<b>4.7. Mutationen</b> .....	<b>69</b>
4.7.1. Splice-Junction Mutation.....	69
4.7.2. Splice Mutante .....	72
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>76</b>
<b>5.8. Wahl der Studiengruppe</b> .....	<b>76</b>
<b>5.9. Vergleich der Studiengruppe mit Studiengruppen aus der Literatur der Lateralisationsdefekte</b> .....	<b>77</b>
<b>5.10. Bedeutung der Splice-Junction Mutation</b> .....	<b>78</b>
<b>5.11. Lateralisationsdefekte durch Mutationen des INV-Gens</b> .....	<b>79</b>
<b>5.12. Lateralisationsdefekt trotz heterozygoter Mutation?</b> .....	<b>80</b>
<b>5.13. Lateralisationsdefekt durch INV-Mutation bei multigenischer Vererbung</b> 83	<b>83</b>
<b>6. Zusammenfassung</b> .....	<b>85</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>99</b>

# 1. Einführung

## 1.2. Entwicklungen in der Kinderkardiologie

### 1.2.1. Inzidenz angeborener Herz- und Gefäßfehler

Die Inzidenz angeborener Herz- und Gefäßfehler (CHD) wird in der Literatur je nach Studie mit 3 bis 12 Kindern pro 1000 Lebendgeborenen angegeben (Hoffman J. I., 1995). Begründet werden diese erheblichen Differenzen mit Unterschieden in den Studiengruppen, unterschiedlichen Untersuchungsmethoden (Klinik, Echokardiographie, Herzkatheteruntersuchungen) und differierenden Herzfehler-Einschlusskriterien, bei z.B. kleinen Ventrikelseptumdefekten (VSD). Diskrepanzen im Vergleich dieser Studien gibt es auch bezüglich uneinheitlicher oder fehlender gesunder Neugeborenenkontrollgruppen aus dem geographisch und zeitlich gleichen Raum (Hoffman J. I., 2002). Die Kritik an der Uneinheitlichkeit der Inzidenz-Studien bezüglich Studiengruppen, Diagnostik und Definition von angeborenem Herz- und Gefäßfehler in Betracht ziehend, kann eine Inzidenz von 6 / 1000 Lebendgeborenen angenommen werden. Zu vergleichbaren Inzidenzen kommt auch die Baltimore-Washington Infant Study, in der bei 4 Kindern von 1000 Lebendgeborenen ein angeborener Herz- und Gefäßfehler innerhalb des ersten Lebensjahres diagnostiziert werden konnte (Ferencz, 1985).

Ausgehend von einer Geburtenrate von 685000 Lebendgeborenen 2007 in der Bundesrepublik Deutschland und bei Annahme einer Inzidenz von 6 Kindern mit angeborenem Herzfehler auf 1000 Lebendgeborene (Hoffman J. I., 2002), wären 2007 in Deutschland 4110 lebendgeborene Kinder mit angeborenen Herz- und Gefäßfehlbildungen zu erwarten gewesen.

Die Diagnostik und Therapie von angeborenen Herz- und Gefäßfehlern beim Feten bis zum Erwachsenen ist ein wichtiges Spezialgebiet im Aufgabenbereich der Kinder- und Jugendmedizin. Es stellt eine einzigartige Aufgabe und Herausforderung für die Facharzt Disziplin der Kardiologen für Kinder, Jugendliche und Erwachsene dar. Um dieser Herausforderung qualitativ hochwertig zu begegnen ist eine enge interdisziplinäre Zusammenarbeit zwischen Pränatalmediziner, Gynäkologen, Neonatologen, Kinderkardiologen, Anästhesisten, Herzchirurgen, Genetikern und anderen Fachdisziplinen von großer Bedeutung.

## 1.2.2. Ätiologie angeborener Herz- und Gefäßfehler

Generell kann immer noch davon ausgegangen werden, dass ca. 10 % der angeborenen Herz- und Gefäßfehler (CHD) aufgrund primär genetischer Defekte entstehen: an erster Stelle durch chromosomale Anomalien (6 %), deren Vorkommen beim Feten (16 %) häufiger ist als beim Neugeborenen (9–13 %) (Rauch, 2004). An zweiter Stelle durch Gen-Defekte (4 %), wie z.B. mono-, di-, tri- und polygenische Ursachen.

Primäre Umweltfaktoren sind in 5 % die Ursache angeborener Herz- und Gefäßfehlbildungen. Eine Interaktion zwischen genetischen und umweltbedingten Faktoren (= multifaktorielle Ursachen) sind in den verbleibenden 85 % für die Entstehung von angeborenen Herz- und Gefäßfehlbildungen ursächlich (Bruyere, 1987).

### 1.2.2.1. Primär genetische Faktoren

#### Chromosomenanomalien (Aneuploidien)

##### Erhöhte Chromosomenzahl

Die häufigste Anomalie mit überzähligem Chromosom ist die Trisomie 21 – Down Syndrom (DS). Das DS hat eine Inzidenz von 1,0–1,3 / 1000 Lebendgeborenen aller ethnischen Gruppen (Freeman, 1998), (Freeman, 2008). Angeborene Herz- und Gefäßfehler (CHD), vorwiegend atrioventrikulärer Septumdefekt (AVSD) und Ventrikelseptumdefekt (VSD), kommen bei 30–40 % von lebenden betroffenen Individuen vor, während beim Feten mit DS die geschätzte Häufigkeit von AVSD ca. 70 % beträgt. Dem regulatorischen Protein DSCR1 („Down syndrom critical region 1“), wird eine ursächliche Funktion bei der Entstehung der Endokardkissendefekte (AVSD) beim Down-Syndrom zugeschrieben (Fuentes, 1995) (Fuentes, 2000).

##### Erniedrigte Chromosomenzahl

Im Vergleich zu der Trisomie des Down Syndroms führt bei der Monosomie X, Ullrich-Turner Syndrom (TS), ein fehlendes Chromosom zur Ausprägung des Phänotyps. Die Inzidenz beträgt 1 / 2500 Lebendgeborenen. Mazzanti und Mitarbeiter zeigten 1998, dass 23 % der Patienten mit Ullrich-Turner Syndrom eine angeborene Herzfehlbildung aufweisen (Mazzanti, 1998). Die am häufigsten assoziierte Herz-/ Gefäßfehlbildung bei Patienten mit Ullrich-Turner Syndrom ist die bikuspidale Aortenklappe (12,5%), gefolgt von der Aortenisthmusstenose (6,9 %) und der Aortenklappenstenose (3,2 %). Eine partielle Lungenvenenfehlöffnung findet sich in 2,9 % der Patienten mit TS, im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung weist diese Fehlbildung jedoch das höchste relative Risiko auf (Mazzanti, 1998). Bemerkenswert ist die Beobachtung, dass bei Vorhandensein einer kompletten Monosomie X oder eines Mosaiks mit variabler Anzahl von X-Chromosomen, wie sie in 2/3 der Patienten mit TS nachweisbar ist, die Prävalenz für einen klinisch relevanten Herzfehler deutlich höher liegt, als bei Strukturaberrationen des X-Chromosoms (Isochromosom, Ringchromosom), bei denen meist nur isolierte Aortenklappenfehlbildungen nachweisbar sind (Mazzanti, 1998). Seltener, aber klinisch relevant, ist die Assoziation mit dem hypoplastischen Linksherzsyndrom

(HLHS) bei 20 % der Patienten und der arteriellen Hypertonie bei 10 % der Patienten mit Ullrich–Turner Syndrom (Sauer, 1999) (Murken, 1999). Besonders bemerkenswert ist bei TS-Patienten mit 95 % die hohe Inzidenz intrauterin versterbender Feten.

### Segmentale Aneuploidien

Weitere genetische Ursachen angeborener Herzfehlbildungen sind segmentale Aneuploidien. Sie wurden für unterschiedliche Chromosomenabschnitte (terminale Deletionen an Chromosom 3, 5, 8 und 11) in Einzelfällen beschrieben (Posch, 2008). Bei den mit segmentalen Aneuploidien assoziierten Herz- und Gefäßfehlern handelt es sich um Septumdefekte im Bereich der Vorhöfe und der Kammern: Vorhofseptumdefekt (ASD), Ventrikelseptumdefekt (VSD), atrioventrikulärer Septumdefekt (AVSD). Die Assoziation eines hypoplastischen Linksherzsyndroms mit einer segmentalen Aneuploidie im Bereich des Chromosom 11 wurde 2007 von Foley und Mitarbeitern bei einem Patienten mit Jacobsen Syndrom (distales 11q Deletionssyndrom) beschrieben (Foley, 2007).

### Kombinierte chromosomale Anomalien

Eine Vielzahl von Kombinationsmöglichkeiten erklärt sich typischerweise durch das gleichzeitige Vorkommen einer partiellen Trisomie und partiellen Monosomie. Dabei kann es sich in bestimmten Fällen beispielsweise um eine unbalancierte reziproke Translokation bei ein und demselben Patienten handeln. Die Konsequenz ist eine große Variabilität des klinischen Erscheinungsbildes (Phänotyp) dieser Patienten. Entsprechend erschwert ist die klinische Diagnose, identische Vergleichsfälle sind in der Literatur selten.

### Mikrodeletionssyndrom (e)

Das am längsten bekannte und häufigste Mikrodeletionssyndrom ist das DiGeorge–Syndrom, d.h. das 22q11.2–Deletions–Syndrom (DS 22q11) (Dodson, 1969). Mit einer Inzidenz zwischen 1 / 3800 – 1 / 6500 Lebendgeborener (Botto, 2003), ist es nach der Trisomie 21 nicht nur die zweithäufigste Chromosomenanomalie, sondern auch die zweithäufigste genetische Ursache von angeborenen Herz- und Gefäßfehlern, das heißt, dass bei ca. 5 % aller angeborenen Herz- und Gefäßfehlern eine 22q11–Deletion zugrunde liegt.

Die Inzidenz von angeborenen Herz- und Gefäßfehlbildungen bei Patienten mit del22q11 beträgt ca. 80 % (Botto, 2003). Die häufigsten mit einem 22q11–Deletionssyndrom assoziierten Herz- und Gefäßfehlbildungen sind konotrunkal: unterbrochener Aortenbogen Typ B (IAA Typ B, Unterbrechung zwischen A. carotis communis links und A. subclavia links), Fallot-Tetralogie (TOF) und rechter Aortenbogen.

Das zweithäufigste Mikrodeletionssyndrom mit 1:7500 Lebendgeborenen ist das Williams–Beuren Syndrom (WS) (Ferrero, 2007). Sein charakteristisches Erscheinungsbild mit typischen Gesichtsdysmorphien, Hyperkalzämie im Säuglingsalter, mentaler Retardierung und einer „outgoing“ Persönlichkeit war der Schlüssel zur klinischen Diagnose. Diese korreliert mit einer Kombination außerordentlicher angeborener Herz- und Gefäßfehlbildungen. Ferrero und Mitarbeiter beschrieben 2007 die Häufigkeit der angeborenen Herz- und Gefäßfehlbildungen in einer Gruppe von 22 Patienten mit Williams–

Beuren Syndrom: supraaortale Aortenstenose (55 %), periphere Pulmonalarterienstenosen (41 %), komplette Lungenvenenfehlmündung (5 %), arterielle Hypertension (32 %) (Ferrero, 2007) (Zalzstein, 1991). Als Ursache konnte bei 90 % der Patienten mit klassischem Williams–Beuren Syndrom eine Deletion des Elastin–Gens (ELN) auf dem Chromosom 7 (7q11.23) nachgewiesen werden (Brondum-Nielsen, 1997).

### Isolierte Gendefekte bei Syndromen

Zu den selteneren bekannten Syndromen mit bedeutenden angeborenen Herz- und Gefäßfehlern (CHD), die durch Mutationen eines Einzel–Gens verursacht werden, gehören:

#### Noonan–Syndrom

Die Inzidenz des Noonan–Syndroms (NS) liegt bei 1:1000 – 1:2500 Lebendgeborenen (Nora, 1974). Die Vererbung erfolgt in der Regel autosomal-dominant. Bei familiären Formen des Noonan–Syndroms zeigen sich in 100 %, bei sporadischen Formen in 50 % der Patienten „missense“-Mutationen im Bereich des PTPN11–Gens. Angeborene Herz- und Gefäßfehlbildungen sind bei 90% der Patienten nachweisbar. Die am häufigsten auftretenden sind valvuläre Pulmonalstenosen (PaVS) in 39 % und hypertrophe Kardiomyopathien (HCM) in 10 % der Patienten. Seltener auftretende Fehlbildungen stellen atrioventrikuläre Septumdefekte (AVSD) in 8 % und Aortenisthmusstenosen (CoA) in 9 % der Patienten dar (Weismann, 2005) (Bertola, 2000) (Marino, 1999). Patienten mit PTPN11–Mutation zeigen signifikant häufiger Pulmonalstenosen (70–88 %) als Noonan–Patienten ohne PTPN11–Gen Mutation (52 %) (Tartaglia, 2001) (Tartaglia, 2002) (Zenker, 2004).

#### Alagille–Syndrom

Das Alagille–Syndrom (AS), erstmals beschrieben 1975 von Alagille und Mitarbeitern, kann mit einer Inzidenz von 1:7000 Lebendgeborenen nachgewiesen werden. Es folgt dabei einem autosomal dominantem Vererbungsmodus (Krantz, 1997) (Krantz, 1997). Als ursächlich für das Alagille–Syndrom konnten Mutationen im Jagged1 Gen (JAG1) gefunden werden (Li, 1997) (Oda, 1997). In 72 % der Mutationen kommt es zum vorzeitigen Auftreten eines Stop–Codons, 15 % liegen innerhalb der Splice–Junction und 13 % waren Missense–Mutationen (Spinner, 2001) (Warthen, 2006).

Die Inzidenz assoziierter Herz- und Gefäßfehlbildungen beträgt nahezu 100 %, wobei Stenosen und Hypoplasien der Pulmonalarterienäste deutlich häufiger als Fallotsche Tetralogien auftreten.



## Holt–Oram–Syndrom

Das Holt–Oram–Syndrom (HOS), erstbeschrieben von Holt und Oram (Holt & Oram, 1960), ist eine autosomal–dominant vererbte Fehlbildung der oberen Extremitäten mit assoziierten Herz- und Gefäßfehlbildungen (Debeer, 2007). Ursache der Fehlbildungen sind Nonsense- und Missense-Mutationen sowie submikroskopische Deletionen im TBX5–Gen (Debeer, 2007) (Borozdin, 2006) (Basson, 1997).

Newbury-Ecob und Mitarbeiter beschreiben eine Inzidenz angeborener Herz- und Gefäßfehler bei Patienten mit Holt–Oram Syndrom, Vorhofseptumdefekte (ASD) und Ventrikelseptumdefekte (VSD), von 95 % in familiären HOS. Eine positive Korrelation besteht zwischen dem Schweregrad der Extremitätenfehlbildung und dem Auftreten eines Herz- und Gefäßfehlers (Newbury-Ecob, 1996). Die Inzidenz einzeln auftretender Herz- und Gefäßfehlbildungen (ASD, VSD, PDA) bei sporadischen HOS wurde von Sletten und Mitarbeitern mit 66 % beschrieben. Die Inzidenz komplexer angeborener Herz- und Gefäßfehler, hypoplastisches Linksherzsyndrom (HLHS), komplette Lungenvenenfehlöffnung (TAPVC), Truncus arteriosus communis (TAC), wurden in derselben Arbeit mit 17,5 % angegeben (Sletten, 1996).

Einzel–Gen Defekte als Ursache einer spezifischen Herz- und Gefäßfehlbildung ohne zusätzliche Merkmale, d.h. ohne Syndrom-Phänotyp werden in der Literatur nur selten beschrieben.

Als Beispiel soll hier der familiär auftretende Vorhofseptumdefekt mit und ohne AV-Block genannt werden, der autosomal-dominant vererbt wird. Ursächlich für die Entstehung der familiär auftretenden Fehlbildung ist eine Mutation des NKX2E-Gens (Chromosom 5q34) (Bizarro, 1970) (Bosi, 1992) (Reamon-Buettner, 2004).

### 1.2.2.2. Primäre Umweltfaktoren

Neben den beschriebenen genetischen Faktoren werden 5 % der angeborenen Herz- und Gefäßfehlbildungen primär durch exogene Umweltfaktoren verursacht (Murken, 1999) (Bruyere, 1987).

Die am besten untersuchte exogene chemische Noxe ist das Thalidomid. Die dosisabhängige Einnahme während der Schwangerschaft verursacht in 33 %-40 % der Embryonen, neben den charakteristischen Stigmata der schweren Extremitätenfehlbildungen, angeborene Herz- und Gefäßfehlbildungen. Vorhof- und Kammerseptumdefekte sind neben konotrunkalen Fehlbildungen die häufigsten kardialen Fehlbildungen (Fuhrman, 1999) (Pexieder, 1999).

Ein weiterer exogener Faktor ist der Alkoholabusus der Mutter im Rahmen der Schwangerschaft. Entgegen früherer Annahmen die Inzidenz angeborener Herz- und Gefäßfehlbildungen läge dosisabhängig zwischen 29 % und 50 % (Löser, 1977), zeigten neuere Untersuchungen lediglich ein gering erhöhtes Risiko für das Auftreten von Vorhof- und Kammerseptumdefekten (Jenkins, 2007).

Infektionen wie die mütterliche Rötelerkrankung im ersten Trimenon der Schwangerschaft können als exogene Noxe zur Entstehung von angeborenen Herz- und Gefäßfehlbildungen führen. Der persistierende Ductus arteriosus ist mit einer Inzidenz von 58 % die häufigste resultierende angeborene kardiale Fehlbildung bei einer Röteln-Infektion der Mutter. Mit geringerer Inzidenz treten Kammerseptumdefekte (18 %), Vorhofseptumdefekte (7 %) und Pulmonalklappenstenosen (6 %) auf (Campbell, 1961).

Ein mütterlicher Diabetes mellitus mit erhöhten Blutzuckerwerten in der Phase der Organogenese des Kindes führt zu spezifischen angeborenen Herz- und Gefäßfehlbildungen: Transposition der großen Arterien, Vorhofseptumdefekt, Kammerseptumdefekt, hypoplastisches Linksherzsyndrom, konotrunkale Defekte, Fehlbildungen des Ausflusstrakts und persistierender Ductus arteriosus (Jenkins, 2007). Eine strikte normoglykämische Stoffwechsellage bei guter medikamentöser Einstellung des mütterlichen Diabetes zeigt eine Verminderung der Inzidenz von angeborenen Herz- und Gefäßfehlbildungen, vergleichbar mit der Inzidenz angeborener Herz- und Gefäßfehlbildungen bei Kindern nicht diabetischer Mütter.

### **1.2.2.3. Multifaktorielle Ursachen (Gen-Umwelt-Interaktion)**

Als häufigste Ursache für angeborene Herz- und Gefäßfehlbildungen (85 %) werden multifaktorielle Ursachen angenommen (Bruyere, 1987). Hierbei wird davon ausgegangen, dass für jeden Menschen ein individuelles Risiko besteht, durch eine Interaktion von genetischen und Umweltfaktoren, eine Herz- und Gefäßfehlbildung zu entwickeln.

Beeindruckende Fortschritte im Bereich der Molekulargenetik sowie das zunehmende Verständnis der embryonalen Entwicklung, speziell der kardialen Morphogenese, sowie deren normale Steuerungsmechanismen durch die Untersuchung möglicher Störfaktoren im Tiermodell, werden in Zukunft die bisher unverstandenen Ursachen angeborener Herz- und Gefäßfehlbildungen weiter entschlüsseln können.

Die daraus resultierende Verschiebung der multifaktoriellen zu Gunsten der primär genetischen Ursachen stellt einen wichtigen Schritt in der Beratung von Patienten und Angehörigen mit angeborenen Herz- und Gefäßfehlbildungen dar.

Durch die Kenntnis der Ursachen angeborener Herz- und Gefäßfehlbildungen können in der Beratung von Patienten mit kardialen Fehlbildungen sowie deren Eltern Aussagen über das Wiederholungsrisiko, die Möglichkeiten pränataler Diagnostik und die zu erwartenden therapeutischen Maßnahmen sowie der zu erwartenden Lebensqualität getroffen werden.

Ein weiteres Ziel des Verständnisses der Ursachen angeborener Herz- und Gefäßfehlbildungen ist die Möglichkeit einer gentherapeutischen Behandlung vor Ausbildung des pathologischen Phänotyps.

### **1.2.3. Entwicklungen in Diagnostik und Therapie angeborener Herz- und Gefäßfehler - vom Fetus bis zum Erwachsenen**

Erhebliche Fortschritte im Bereich der Diagnostik und Therapie angeborener Herz- und Gefäßfehler resultierten in den letzten Jahren in neuen Herausforderungen im Fachbereich der Kinderkardiologie.

#### **Nichtinvasive Diagnostik**

Durch die Weiterentwicklung der Echokardiographie mit 2D, 3D, Farbdoppler, „tissue“-Doppler, 2d-Strain und transösophagealen Untersuchungen kann bei Risikogruppen bereits pränatal ein komplexer Herzfehler diagnostiziert und die postnatale Versorgung erheblich verbessert werden (Johnson, 2007) (Chiappa, 2007). Auch bei der prä- und intraoperativen Beurteilung ist insbesondere die transösophageale Echokardiographie zu einer zielführenden diagnostischen Technik geworden (Randolph, 2002).

Weitere bildgebende Verfahren wie die Magnetresonanztomographie und die Positronenemissionstomographie gewinnen zunehmend bei der, für die Therapieentscheidung wichtigen, Darstellung anatomischer Strukturen und kardialer Funktionsbeurteilung (z.B. Pulmonalarterien, Aortenbogen) an Bedeutung (Rebergen, 2000) (Fratz, 2008), (Kaemmerer, 2000) (Woodard, 2008).

#### **Invasive Diagnostik und interventionelle Therapie**

Im Bereich des Herzkatheters entwickelten sich neben der Reduktion der Strahlenbelastung in der Diagnostik die Möglichkeiten nichtoperativer Therapien. Der interventionelle Verschluss von Vorhof- und Ventrikelseptumdefekten ist eine sichere und erfolgreiche Alternative zur operativen Therapie (Carminati, 2007). Ballondilatation und Stenteinlage gewinnen zunehmend im Einsatz von Hybridverfahren an Bedeutung (Diab, 2005) (Bacha, 2005) (Bacha, 2005). Insbesondere die perkutane transluminale Implantation von klappentragenden Stents bei Patienten mit rechtsventrikulären Ausflußtraktobstruktionen konnte die Reoperationsrate signifikant reduzieren (Frigiola, 2009). Durch diese Entwicklungen können Operationen und vor allem Re-Operationen und die damit verbundenen erhöhten Risiken oftmals zeitlich verzögert oder sogar vermieden werden.

#### **Operative Therapie**

Die Entwicklungen im Bereich der Herzchirurgie im Kindesalter ermöglichen heutzutage frühzeitige erfolgreiche Operationen komplexer angeborener Herz- und Gefäßfehler

bei immer jüngeren und leichteren Früh- und Neugeborenen. Durch das resultierende reduzierte Mortalitäts- und Morbiditätsrisiko zeigt sich eine erhöhte Inzidenz von GUCH-Patienten („grown-up congenital heart patient“) und den daraus resultierenden Problemstellungen in der Behandlung von Jugendlichen und Erwachsenen mit angeborenen Herz- und Gefäßfehlern (Somerville, 2001) (Borghini, 2007) (Winlaw, 2007).

Die erfolgreiche aber dennoch oft nur palliative Behandlung von Neugeborenen mit komplexen kardialen Fehlbildungen bei abnehmenden Mortalitäts- und Morbiditätsrisiken führt zu einer lebenslang notwendigen kardiologischen Betreuung bis in das hohe Erwachsenenalter.

Diese Entwicklungen führen neben den neuartigen Anforderungen an die Therapie von Erwachsenen mit angeborenen Herzfehlern auch an neue Fragestellungen bezüglich der Beratung. Standen bisher bei der Beratung der Eltern von CHD-Patienten Fragen nach der Lebensqualität und dem Wiederholungsrisiko bei erneuten Schwangerschaften im Vordergrund, kommt es bei GUCH-Patienten bei der Familienplanung und Kinderwunsch auch zu Fragen über die körperlichen Belastungen während der Schwangerschaft und insbesondere über die Vererbbarkeit der entsprechenden Fehlbildung (Hoess, 2002) (Mitchell, 2007).

Um in diesen Fällen eine Beratung durchführen zu können, ist die Kenntnis der Ätiologie, insbesondere der genetischen Ursachen von angeborenen Herz- und Gefäßfehlern, obligat.

Von großem Interesse werden in naher Zukunft die Antworten auf diese Fragen bei den überlebenden jungen Erwachsenen mit univentrikulären Fehlbildungskomplexen nach Norwood-Prozeduren, Fontan-Operationen oder Herztransplantationen im Neugeborenenalter sein. Die genetischen Ursachen dieser Fehlbildungen sind nur ansatzweise untersucht und naturgemäß Schwangerschaftsverläufe und Wiederholungsrisiken bisher nicht bekannt.

Fortschritte konnten auch im Bereich der Untersuchung von Ätiologie und genetischer Ursache angeborener Herz- und Gefäßfehlbildungen erreicht werden. An Tiermodellen konnte das Verständnis der normalen und fehlerhaften embryonalen Herz- und Gefäßentwicklung, insbesondere der genetischen Steuerungsprozesse, erheblich weiterentwickelt werden (Lemyre, 2007), (Andelfinger, 2008).

## **1.3. Einführung in die Genetik der Lateralisationsdefekte (= Heterotaxie) - Meilensteine und Perspektiven**

### **1.3.1. Entwicklung der normalen Lateralisation**

Bei der Entstehung des Wirbeltierorganismus zeigt sich zu Beginn im embryonalen Stadium ein symmetrischer Bauplan.

Bereits früh in der kardialen Morphogenese des Menschen, ca. Tag 23 nach Ovulation, bildet sich die normale rechtsgerichtete Schleife des bis dahin mittelständigen Herzschlauches aus (D-Herzschleife) (Taber, 1995) (Taber, 2006) (Jacobs, 2007) (Männer, 2008), als erstes Zeichen einer normalen Asymmetrie (= Lateralisation) zwischen rechter und linker Körperhälfte. Bei der im Laufe der weiteren Entwicklung auftretenden rechtsläufigen Drehung des Embryos entlang einer rostro-caudal verlaufenden Achse kommt es zur Ausbildung einer links–rechts Asymmetrie weiterer thorako-visceraler Organe wie Lunge, Magen, Dünn- und Dickdarm, Leber, Pankreas und der Milz. Die Tatsache „dass diese asymmetrische Anordnung der Organe in allen Wirbeltierorganismen als fester Bauplan konserviert ist (Fujinaga, 1997), lässt auf eine genetisch determinierte und speziesübergreifende Steuerung dieser Entwicklung schließen. Genetische Anomalien von Steuerungsmechanismen der normalen Lateralisation können daher in der Ausbildung von fehlerhaften Links-Rechts-Asymmetrien (= Lateralisationsdefekten) angenommen werden (Kosaki, 1998) (Casey, 1998).

Gemäß der Empfehlungen („The International Nomenclature Committee for Pediatric and Congenital Heart Disease“) kann man bezüglich der normalen und anormalen Entwicklung von Links-Rechts-Asymmetrien folgende Begriffe unterscheiden (Jacobs, 2007):

#### **Situs solitus**

Normale topographische Lage der asymmetrisch angelegten Organe in Thorax und Abdomen und deren regelrechte Lage zueinander.

#### **Situs inversus totalis**

Im Vergleich zum Situs solitus vollständig spiegelbildliche Anordnung der asymmetrisch angelegten Organe, bei erhaltener regelhafter räumlicher Beziehung der einzelnen Organe zueinander.

Ein Situs inversus kann sowohl ohne als auch mit assoziierten angeborenen Herz- und Gefäßfehlbildungen oder visceralen Anomalien vorkommen. Die Inzidenz beträgt ca. 1:8000–25000 Lebendgeborenen. Die ziliäre Dyskinesie (Kartagener Syndrom) mit einer Inzidenz von 1:10000 ist in ca. 42 % der Fälle mit einem Situs inversus assoziiert.

### **Heterotaxie (= Heterotaxie-Syndrom = Situs ambiguus)**

Jede anormale Anlage der inneren Organe entlang der Links-Rechts-Achse, die nicht der normalen Anlage von Situs solitus oder Situs inversus totalis entsprechen. Jede segmentale Diskordanz zwischen inneren Organen entlang der Links-Rechts-Achse kann somit als Heterotaxie bezeichnet werden.

Die Heterotaxie beinhaltet eine heterogene Gruppe von Lateralisationsdefekten, wobei zwei Untergruppen gesondert genannt werden müssen.

#### Rechts-Isomerismus

Im Bezug auf angeborene Organfehlanlagen und Organfehlbildungen beschreibt dies die spiegelbildliche beidseitige Anordnung normalerweise asymmetrisch rechtsseitig angelegter Organe (= Asplenie-Syndrom). Hierbei werden die rechtsseitigen Merkmale (3 Lungenlappen, kurzer Bronchus, rechtes Herzohr, keine Milz) in z.T. inkompletter Ausprägung beidseitig angelegt (Ivemark, 1955), (Gilbert, 1958).

#### Links-Isomerismus

Im Bezug auf angeborene Organfehlanlagen und Organfehlbildungen beschreibt dies die spiegelbildliche, beidseitige Anordnung normalerweise asymmetrisch linksseitig angelegter Organe (= Polysplenie-Syndrom). Hierbei werden die linksseitigen Merkmale (2 Lungenlappen, langer Bronchus, linkes Herzohr, Milz) in z.T. inkompletter Ausprägung beidseitig angelegt (Moller, 1967), (Peoples, 1983).

Patienten mit Heterotaxie-Syndromen zeigen eine deutlich erhöhte Inzidenz von angeborenen Herzerkrankungen. Die dabei auftretenden Herz- und Gefäßfehlbildungen sind ausgeprägt variabel. In einer Gruppe von 38 Patienten mit postnatal diagnostiziertem Heterotaxie-Syndrom wurde die Inzidenz assoziierter angeborener Herz- und Gefäßfehler untersucht (Cohen, 2007):

Angeborene Herz- und Gefäßfehlbildungen bei Heterotaxie	%
Atrio-ventrikulärer Septumdefekt	79
Obstruktion pulmonale Ausflußbahn	74
Isomerismus rechtes Herzohr	66
Doppelter Auslass rechter Ventrikel	45
Isomerismus linkes Herzohr	34
Unterbrochene untere Hohlvene	21
Komplette Lungenvenenfehlöffnung	21
Obstruktion aortale Ausflussbahn	16
Hypoplastisches Linksherz	8

***Tabelle 1 Inzidenz angeborener Herz- und Gefäßfehlbildungen bei 38 Patienten mit Heterotaxie (Cohen, 2007)***

Die hohe Inzidenz von angeborenen Herz- und Gefäßfehlbildungen bei Heterotaxie-Syndromen und die Komplexität der auftretenden Fehlbildungen unterstreicht die Relevanz der Kenntnis des Heterotaxie-Syndroms für den Kardiologen von angeborenen Herz- und Gefäßfehlbildungen.

### 1.3.2. Störung der Lateralisation im Tiermodell

Lateralisationsdefekte sind in der Literatur ein häufig beschriebenes Phänomen. Klinisch konnten in einer Vielzahl von betroffenen Familien an Hand von Stammbaumanalysen unterschiedliche Vererbungsmodalitäten von Lateralisationsdefekten nachgewiesen werden: autosomal rezessive (Mital, 1974), autosomal dominante (Casey, 1996)(Alonso, 1995), X-chromosomal gebundene (Casey, 1993) (Ferrero, 1997) (Gebbia, 1997). Auch die Möglichkeit polygenetisch bedingter Vererbungsgänge wird in Betracht gezogen (Aylsworth, 2001).

Um weitere Erkenntnisse über die molekularen Zusammenhänge bei der Entstehung von Lateralisationsdefekten zu erhalten, wurden Untersuchungen an Tiermodellen durchgeführt:

1. Mäuse (Meno, 1996)
2. Hühner (Levin, 1998)
3. Frösche (Jones, 1995)

Hierbei zeigte sich in einem sehr frühen Stadium der Embryogenese, bereits vor dem ersten morphologischen Zeichen der Lateralisation, der Ausbildung einer rechtsgerichteten Herzschleife, bei allen genannten Tiermodellen eine seitendifferente Expression verschiedener Gene aus der Familie der transformierenden Wachstumshormone (= TGF). Diese Wachstumshormone, Signalmoleküle die zu den Zytokinen zählen, spielen eine wichtige Rolle bei der embryonalen Entwicklung und Differenzierung von Zellen und Geweben (Kingsley, 1994) (Massagué, 1996) (Heldin, 1997). Sie werden in verschiedene Gruppen eingeteilt:

TGF- $\alpha$

TGF- $\beta$

BMP (= „bone morphogenetic proteins“ = morphogenetische Knochenproteine)

Zu den oben genannten seitendifferent exprimierten „kritischen Genen“, die möglicherweise mit der Determination der Lateralisation in Bezug stehen, zählen:

1. „nodal“ bei der Maus (Lowe, 1996)
2. „lefty-1“ und „lefty-2“ bei der Maus (Meno, 1996)
3. „Pitx2“ bei der Maus (Campione, 1999)
4. cNR-1 beim Huhn (= „chicken nodal related“) (Levin, 1995) (Jones, 1995) (Hummel, 1959)



Als Säugetier zeigt die Maus die höchste Übereinstimmung mit dem humanen Organismus und wird somit im Mittelpunkt bei der weiteren Beschreibung der tierexperimentellen Erkenntnisse stehen.

### **iv-Maus**

Ein für Lateralisationsstudien geeignetes Tiermodell ist die „inversus viscerum“ (iv/iv) Maus. Die Mäuse sind Träger der iv-Mutation, eine in der Entwicklung der Mäuse aufgetretene rezessive Spontanmutation. Anfänglich durch Hummel und Chapman untersuchte homozygote (iv/iv) iv-Mäuse wiesen in je der Hälfte der Fälle einen Situs inversus bzw. einen Situs solitus auf (Hummel, 1959). Weitere Untersuchungen homozygoter iv-Mäuse durch Layton und Mitarbeiter konnten in 42 % der Mäuse segmentale Diskordanzen im Sinne einer Heterotaxie nachweisen (Layton, 1976). Heterozygote Mäuse (+/iv ; iv/+) zeigen keine phänotypischen Veränderungen im Sinne eines Lateralisationsdefektes. Icardo und Mitarbeiter wiesen in einer Gruppe von 140 homozygoten iv-Mäusen eine Inzidenz von 40 % für angeborene Herz- und Gefäßfehlbildungen nach. Die häufigsten Fehlbildungen waren:

Herz- und Gefäßfehlbildungen bei homozygoten iv-Mäusen	%
Atrio-ventrikulärer Septumdefekt	24
Gemeinsamer Vorhof	17
Sinus venosus Defekt	9
Fallot Tetralogie	8
Transposition der großen Arterien	5

**Tabelle 2 Morphologie der Herz- und Gefäßfehlbildungen bei homozygoten iv-Mäusen (Icardo, 1991)**

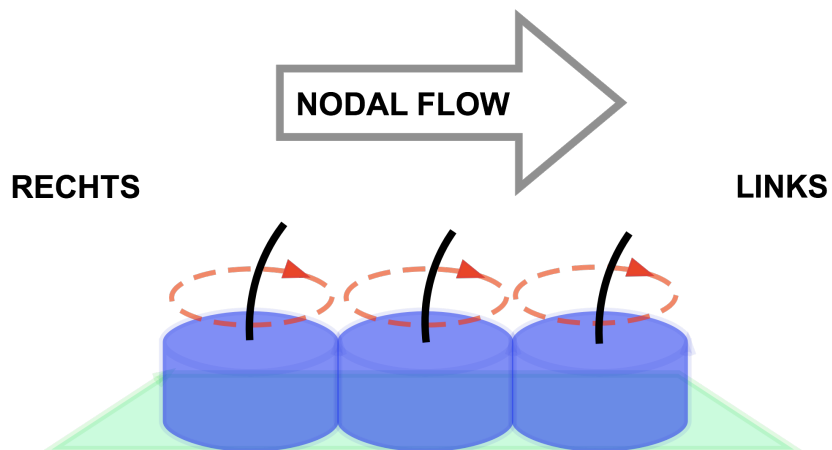
Neben den genannten Herz- und Gefäßfehlbildungen konnten bei den homozygoten Mäusen keine Veränderungen im Bereich des Respirationsepithels, der Spermien oder der Zilienstruktur gefunden werden. Sie unterscheiden sich somit wesentlich von der humanen Gruppe der Kartagener-Syndrome (Handel, 1984).

Der Arbeitsgruppe um Brueckner gelang 1991 die Entschlüsselung sowohl der Lokalisation der iv-Mutation als auch des hierdurch in seiner Funktion ausgeschalteten Gens (*lrd*) sowie des Proteins (LRD), für das es kodiert (Brueckner, 1989) (Brueckner, 1991) (McGrath, 1992) (Supp, 1997).

Das *lrd*-Gen ist auf dem Chromosom 12 der Maus lokalisiert und kodiert für die Synthese des „left-right-dynein“ Proteins (LRD). Hierbei handelt es sich um ein Strukturprotein eines Dynein-Armchens, wie es aus dem Aufbau und der Funktion von Zilien bekannt ist. Die Bedeutung des „LRD“-Proteins für den normalen Lateralisations-Ablauf liegt in seiner Initiationsrolle der Zilien-Motilität, welche ihrerseits für den Beginn des „nodal-flow“ erforderlich ist.

### Nodal-flow

Der „nodal-flow“ ist ein durch die Rotation einer Zilie gerichteter Fluß innerhalb einer kurzen Zeit in der Embryogenese (Sulik, 1994) (Nonaka, 1998) (Marszalek, 1999) (Okada, 1999) (Supp, 1999) (Takeda, 1999) (Lee, 2008).



**Abbildung 1** Durch Zilienrotation erzeugter "nodal-flow"

Durch die Rotation der Zilie entsteht ein nach links gerichteter laminarer Fluß extra-embryonaler Flüssigkeit. Kurz nach Initialisierung des „nodal-flow“, kommt es zur oben genannten asymmetrischen Expression der „kritischen Gene“ („nodal“, „lefty-1“, „lefty-2“) aus der Familie der transformierenden Wachstumshormone (TGF) in der Maus (Nonaka, 1998), sowie („Pitx2“) als Homeobox-Gen (Campione, 1999).

In weiteren Untersuchungen konnte eine kaskadenartige zeitlich aufeinander folgende Aktivierung der Expression der asymmetrisch exprimierten Gene entschlüsselt und somit die Funktion der einzelnen Gene zumindest teilweise erklärt werden (Zhu, 2006).

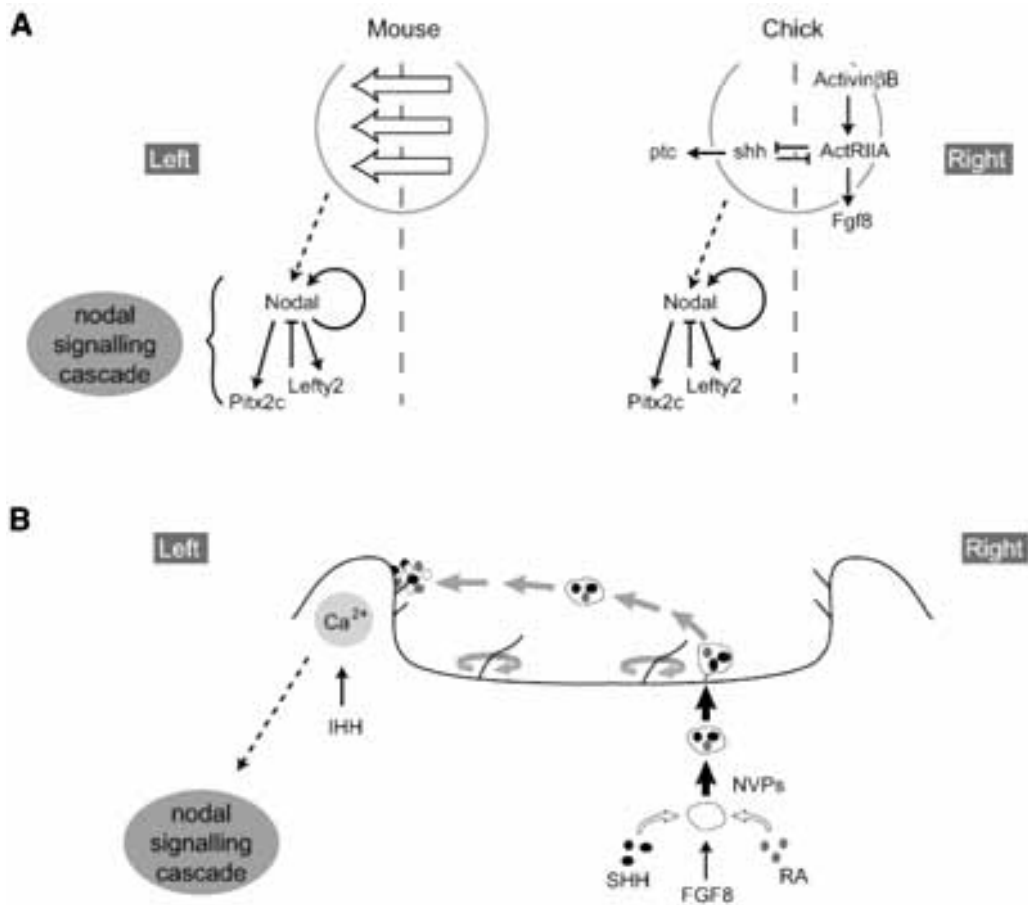


Abbildung 2 Kaskadenartige Aktivierung und asymmetrische Expression der „kritischen Gene“ bei der Entstehung der Lateralisation bei Maus und Huhn (Zhu, 2006)

Die Relevanz des „nodal-flow“ für die Entstehung der normalen Lateralisation konnte in Experimenten von Nonaka sowie Okada und deren Mitarbeitern bestätigt werden. Hierbei konnte durch die Ausschaltung des „nodal-flow“ in genetisch veränderten Mäusen die normale Lateralisation aufgehoben werden, was zu einer randomisierten Anlage der asymmetrischen Organe führte.

Die artifizielle Aufrechterhaltung eines „nodal-flows“ in diesen genetisch veränderten Mäusen konnte die Ausbildung einer normalen Lateralisation wieder herstellen. Die Umkehrung des normalen „nodal-flows“ durch einen in die entgegengesetzte Richtung erzeugten artifiziellen „nodal-flows“ führte zu einer spiegelbildlichen Anordnung der asymmetrischen Organe (Okada, 1999) (Nonaka, 2002) (Okada, 2005) (Hirokawa, 2006).

Mittlerweile konnte die Notwendigkeit des „nodal-flows“ für die Ausprägung der Lateralisation auch in anderen Spezies nachgewiesen werden (Schweickert, 2007) (Essner, 2005) (Okada, 2005) (Buceta, 2005).

Dass auch beim Menschen eine Zilienfunktionsstörung, ähnlich der beim Tier nachgewiesenen, in der Entstehung von Lateralisationsdefekten eine bedeutende Rolle spielen könnte, lässt die erhöhte Inzidenz von Lateralisationsanomalien bei Patienten mit Kartagener Syndrom in seinen beiden Haupt-Erscheinungsformen:

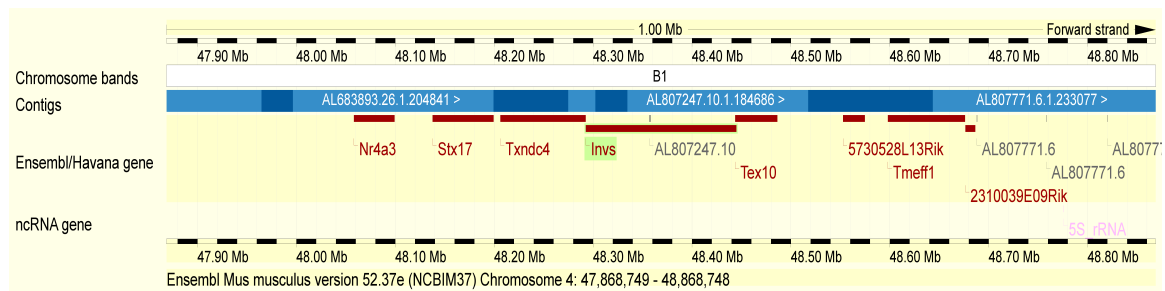
Situs inversus und Immotiles-Zilien-Syndrom

Polysplenie (Heterotaxie) und extrahepatischer Gallengangsatresie

vermuten (Afzelius, 1976), (Afzelius, 1978), (Afzelius, 1979), (Afzelius, 1981).

## inv-Maus

Neben der iv-Maus ist die transgene inv-Maus (inv = inversion of embryonic turning) ein weiteres Tiermodell, das für Untersuchungen von Lateralisationsdefekten geeignet ist. Entstanden war die inv-Mutation bei Versuchen mit transgenen Albinomäusen (fehlende Pigmentation) von Yokoyama und Mitarbeitern, nach Insertion eines Thyrosinase-Minigen in die befruchtete Eizelle der Maus. Die Tochtergenerationen zeigten zu 100 % eine wiederhergestellte Pigmentation. Während die heterozygoten Tochtergenerationen einen Situs solitus aufwiesen, zeigten homozygote Tochtergenerationen zusätzlich zur Pigmentation einen Situs inversus (88 %) oder eine Heterotaxie (12 %) (Yokoyama, 1993). Weitere Untersuchungen konnten die genetische Ursache der entstandenen Lateralisationsdefekte entschlüsseln. Durch die Insertion des Thyrosinase-Minigen kam es zu einer Unterbrechung der normalen Nukleotidabfolge und somit zu einer Veränderung der genetischen Information (= Mutation). Das durch diese Mutation in seiner Funktion gestörte Gen (inv-Gen) konnte identifiziert und auf dem Chromosom 4 der Maus lokalisiert werden (Mochizuki, 1998) (Morgan, 1998) (Morishima, 1998) (McQuinn, 2001).



**Abbildung 3 Lokalisation des inv-Gens auf Chromosom 4 der Maus (Abbildung aus der „ensembl-project“ Datenbank)**

Es folgten morphologische Untersuchungen zur Bestimmung des anatomischen Phänotyps durch Morishima und Mitarbeiter bei 40 homozygoten (inv/inv) inv-Mäusen. Ein Situs inversus wurde bei 4 (10 %) der inv-Mäusen gefunden. Von diesen vier Mäusen wies nur eine (25 %) eine angeborene Herz- und Gefäßfehlbildung (Aortenstenose) auf.

Insgesamt 36 der 40 homozygoten inv-Mäuse (90 %) wiesen segmentale Diskordanzen der Brust- und Bauchorgane im Sinne einer Heterotaxie auf. In dieser Gruppe wurden angeborene Herz- und Gefäßfehlbildungen mit einer Inzidenz von 72 % (29 / 40) nachgewiesen. Alle betroffenen Mäuse zeigten eine Kombination unterschiedlicher kardialer Fehlbildungen (Morishima, 1998) (McQuinn, 2001).

Kardiovaskuläre Fehlbildungen bei homozygoten <i>inv</i> -Mäusen	%
Unterbrechung der unteren Hohlvene	36
+ Vena azygos links	17
+ Vena azygos rechts	14
+ bilaterale Vena azygos	5
Atrio-ventrikulärer Septumdefekt	14
Fallot Tetralogie	11
Transposition der großen Arterien	6
Pulmonalatresie	3
Aortenstenose	3
Vorhofseptumdefekt	3

**Tabelle 3** Inzidenz der Herz- und Gefäßfehlbildungen bei homozygoten (*inv / inv*) *inv*-Mäusen (Morishima, 1998)

Diese hohe Inzidenz von angeborenen Herz- und Gefäßfehlbildungen in Assoziation mit verschiedenen Lateralisationsdefekten unterstützt die Beobachtung, dass die Morphogenese des Herzens, das selbst zu den asymmetrischen Körperorganen gehört, besonders empfindlich ist gegenüber Lateralisationsstörungen (Harvey, 1998) (Mercola, 1999).

Basierend auf der nachweislich hohen Homologie (ca. 80 %) zwischen dem Genomprodukt der Maus und dem des Menschen (siehe Abbildung 5), bot sich die *inv*-Mutation der Maus als geeigneter Kandidat für eine Mutationsanalyse bei Patienten mit Lateralisationsdefekten, insbesondere in Kombination mit Herz- und Gefäßfehlbildungen an.

Diese Fragestellung ist Gegenstand der eigenen Untersuchungen, die im zweiten Teil dieser Arbeit dargestellt werden.

## Homologie Mensch – Maus (inv auf Proteinebene)

```

ENSP00000262457/1-1065   MNKSENLFFAGSSLASQVHAAAVNGDKGALQRLIVGNSALKDKEDQFGRTPLMYCVLADR
ENSMUSP00000030029/1-1062 MNISEDVLTGSSLASQVHAAAVNGDKGALQRLIVGNSALRDKEDRFGRTPLMYCVLADR
** **:* :*****:****:*****

ENSP00000262457/1-1065   LDCADALLKAGADVNKTDHSQRTALHLAAQKGNRYRFMKLLLTRRANWMQKLEEMTPLHL
ENSMUSP00000030029/1-1062 VDCADALLKAGADVNKTDHSRRTALHLAAQKGNRYRFMKLLLTRRANWMQKLEEMTPLHL
:*****:*****

ENSP00000262457/1-1065   TTRHRSPKCLALLLKFMAPGEVDTQDKNKQTALHWSAYYNNPEHVKLLIKHDSNIGIPDV
ENSMUSP00000030029/1-1062 STRHRSPKCLALLLKFMAPGEVDTQDKNKQTALHWSAYYNNPEHAKLLIKHDSNIGIPDV
:*****.*****

ENSP00000262457/1-1065   EGKIPLHWAANHKDP SAVHTVRCILDAAPTESLLNWQDYEGRTPLFHFAVDGNVTVDVL
ENSMUSP00000030029/1-1062 EGKIPLHWAANHKDP SAVHTVRCILDAAPTESLLNWQDYEGRTPLFHFAVDGNLTVVDVL
*****:*****

ENSP00000262457/1-1065   TSYESCNI TSYDNLFRTPLHWAALLGHAQIVHLLLERNKSGTIPSDSQGATPLHYAQS N
ENSMUSP00000030029/1-1062 TSYESCNI TSYDNLFRTPLHWAALLGHAQIVHLLLERNKSGTIPSDSQGATPLHYAQS N
*****

ENSP00000262457/1-1065   FAETVKVFLKHP SVKDDSDLEGRTSFMWAAGKGSDDVLR TMLS LKSDIDINMADKYGGTA
ENSMUSP00000030029/1-1062 FAETVKVFLQHP SVKDDSDLEGRTSFMWAAGKGNDDVLR TMLS LKSDIDINMSDKYGGTA
*****:*****.*****:*****

ENSP00000262457/1-1065   LHAAALSGHVSTVKLLENN A QVDA TDVMKHTPLFRACEMGHKDVIQT LIKGGARVDLVD
ENSMUSP00000030029/1-1062 LHAAALSGHVSTVKLLDND A QVDA TDVMKHTPLFRACEMGHRDVIQT LIKGGARVDLVD
*****:*:*****:*****

ENSP00000262457/1-1065   QDGHSL LHWAALGGNADVCQIL IENKINPNVQDYAGRTP LQCAAYGGYINCMAVLMENNA
ENSMUSP00000030029/1-1062 QDGHSL LHWAALGGNADVCQIL IENKINPNVQDYAGRTP LQCAAYGGYINCMAVLMENNA
*****

ENSP00000262457/1-1065   DPNIQDKEGR TALHWS CNNGYLDAIKLLLDFAAFP NQ MENNEERYT PLDYALLGERHEVI
ENSMUSP00000030029/1-1062 DPNIQDKEGR TALHWS CNNGYLDAIKLLLDFAAFP NQ MENNEERYT PLDYALLGERHEVI
*****

ENSP00000262457/1-1065   QFMLEHGALSIAAIQDIAAFKI QAVYKGYKVRKAFRDRKNLLMKHEQLRKDAAAKKREEE
ENSMUSP00000030029/1-1062 QFMLEHGALSIAAIQDIAAFKI QAVYKGYKVRKAFRDRKNLLMKHEQLRKDAAAKKREEE
*****

ENSP00000262457/1-1065   NKRKEAEQQKGRRSPDSCR PQ-----ALPCLPSTQDVPSRQSRAPSQPPAGNVAQGPE
ENSMUSP00000030029/1-1062 NKRKEAEQQKGLDTPPRSHCSSAPVLP C P P S P Q N E A S K Q D A T P S K Q P P A S H T V Q S P D
*****:..*. *.: .*** **.*: *.*:*****:..*.*:

ENSP00000262457/1-1065   PRDSRGSP-GGSLGGALQKEQH VSSDLQGTNSRRPNETA REHSGKQSACVHFRENEGSDG
ENSMUSP00000030029/1-1062 PEHS--RPPGRC PGRSQGDS--SIDLQGTASRKPSETPIEHCRGPSACVHRSWEGGNS
*..* * * . * * * :. * ***** **:*.**.* **.:* ***** * . **.:.

```



## Mutationsanalyse des INV-Gens bei Patienten mit Lateralisationsdefekten

```

ENSP00000262457/1-1065   SRHPGVPSVEKSRGETAGD-ERCAKKGKGFVKQPSCIRVAGPDEKGEDSRRAAASLPPHDS
ENSMUSP00000030029/1-1062 SKNQGTSVVEKRRGETNGKHRRCEEKGFSSARQPLCTGSGRPAEKGEDSSPAVASASQQDH
      *:. *.***** ***** * . ** :* . .: ** * . * ***** *.** . : *

ENSP00000262457/1-1065   HWKPSRRHDTEPKAKCAPQKRRTQELRGGRCSPAGSSRPGSARGEAVHAGQNPPHRTPR
ENSMUSP00000030029/1-1062 PRKPNKRQDRAARPRGASQKRRTHQLR-DRCS PAGSSRPGSAKGEVACADQSSLHRHTPR
      **.:*: * .: .: *.*****: ** .*****:***. *.** . *:***

ENSP00000262457/1-1065   NKVTQAKLTGGLYSHLPQSTEELRSGARRLETSTLSEDFQVSKETDPAPGPLSGQSVNID
ENSMUSP00000030029/1-1062 SKVTQDKLIGGVSSGLPLSTEASRSGCKQ-----LYEDICASPETGVAHGPPPGQCMNIH
      .**** * * **: * * * * * **.: * **: . * ** . * * .**.:**

ENSP00000262457/1-1065   LLPVELRLQIIQRERRRKELEFRKKNKAAAVIQRAWRSYQLRKHLHLRHMKQLGAGDVDR
ENSMUSP00000030029/1-1062 LLPVEQRLLIQRERSRKELEFRKKNKAAAVIQRAWRSYQLRKHLRLLHLKQLGAREVLR
      ***** * * ***** *****:*****:*****: * *:***** : * *

ENSP00000262457/1-1065   WRQESTALLQVWRKELELKFQTTAVSKAPKSPSKGTSKSTKHSVLKQIYGCSHEGK
ENSMUSP00000030029/1-1062 CTQVCTALLQVWRKELELKFPKSISVSRTSKSPSKGSSATKYARHSVLRQIYGCSQEGK
      * .*****:*****: * ** .:*****:***. ** .:*****:*****:***

ENSP00000262457/1-1065   IHHPTRSVKASSVLRNLNSVNLQCIHLLNSGRSKNFSYNLQSATQPKNKTTP
ENSMUSP00000030029/1-1062 GHHPIKSSKAPAVLHLSSVNSLQSIHL-DNSGRSKKFSYNLQPSQSKNKPKL
      *** : * **.:**:* ** .** .** .*** :*****:*****.:* .*** . *
    
```

***Vergleich der Homologie zwischen den Genprodukten INV (Mensch, obere Zeile) und inv (Maus, untere Zeile) auf Proteinebene. Sterne unterhalb der Zeilen markieren Homologie zwischen den Proteinen von Mensch und Maus.***

### 1.3.3. Lateralisationsdefekte (= Situs Anomalien) beim Menschen

Untersuchungen zur Identifizierung von Genen, die für die Steuerung der Lateralisation verantwortlich sein könnten, konzentrierten sich in erster Linie auf Mutationsanalysen von Genen, die während der Embryogenese seitendifferent exprimiert werden. Zu den wichtigsten bekannten Genen, die ursächlich bei Lateralisationsdefekten des Menschen in Frage kommen, gehören: NODAL, LEFTYA, LEFTYB, ACVR2B, CFC1, CONNEXIN43, ZIC3 und INV.

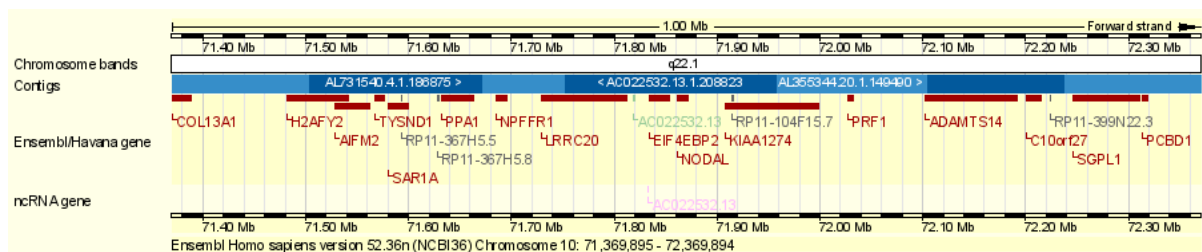
Die Resultate dieser Mutationsanalysen werden in den folgenden Abschnitten im Einzelnen beschrieben.

#### 1.3.3.1. NODAL-Gen des Menschen

Das „nodal“-Gen der Maus liegt auf Chromosom 10, gehört zur Familie der transformierenden Wachstumshormone (TGF) und wird während des Gastrulationsstadiums asymmetrisch, linksseitig im Mäuseembryo exprimiert (Zhou, 1993).

Bei Mausmodellen mit Links-Rechts Achsen Malformationen (= Lateralisationsdefekten) ist diese linksseitige „nodal“-Expression aufgehoben (Lowe, 1996).

Im Jahre 1997 gelang es Ferrero und Mitarbeitern das humane NODAL-Homolog zu identifizieren und auf Mutationen zu untersuchen (Ferrero, 1997).



**Abbildung 4 Lokalisation des NODAL-Gens auf Chromosom 10 des Menschen (Abbildung aus der „ensembl-project“ Datenbank)**

Bei Untersuchungen durch genetische Kopplungsanalysen in Familien mit Lateralisationsdefekten konnte Gebbia 1997 ein neues Gen (ZIC3) identifizieren, welches auf dem X-Chromosom lokalisiert und an der Entstehung der Lateralisationsdefekte in den betroffenen Familien beteiligt zu sein schien (siehe Erläuterungen ZIC3) (Gebbia, 1997). Die größte untersuchte Familie mit 3 Generationen und 30 Mitgliedern (n = 30) wies unter den 18 männlichen Familienangehörigen (60%) in 7 Fällen (23 %) eine Heterotaxie auf, 3 Betroffene (10 %) waren bereits verstorben, 2 weitere (7 %) verstarben bevor

eine Untersuchung durchgeführt werden konnte. Alle männlichen Familienmitglieder mit Heterotaxie wiesen komplexe angeborene Herz- und Gefäßfehlbildungen auf. Der Erbgang der männlichen Nachkommen mit Lateralisationsdefekt zeigte sich x-chromosomal rezessiv. Von 12 weiblichen Familienmitgliedern (40 %) konnte nur bei einer Familienangehörigen (3 %) eine Heterotaxie nachgewiesen werden. Vater (Familienmitglied) und Mutter der Betroffenen waren gesund und wiesen einen Situs solitus auf, es bestand keine Konsanguinität zwischen den Eltern. Untersuchungen von Vater und Tochter zeigten keine Mutationen im Bereich des ZIC3-Gens.

Weiterführende zusätzliche Mutationsanalysen bei den Familienmitgliedern im Bereich des zuvor entschlüsselten humanen Homolog des „nodal“-Gens (NODAL), konnten eine Punktmutation im Bereich des NODAL-Gens der erkrankten Tochter und der unauffälligen Mutter nachweisen. Weder die verbleibenden 28 Familienmitglieder (93 %) noch eine Kontrollgruppe von 200 Chromosomen wiesen diese Mutation auf.

Diese Befunde lassen eine Beteiligung von Mutationen im ZIC3-Gen bei der Entstehung von Lateralisationsdefekten bei männlichen Patienten vermuten.

Eine Beteiligung von NODAL-Mutationen bei der Entstehung von weiblichen Patienten mit Lateralisationsdefekten ist nach den Ergebnissen der oben genannten Studie denkbar, eine Kausalität konnte jedoch durch Gebbia und Mitarbeiter nicht gezeigt werden (Gebbia, 1997).

### 1.3.3.2. LEFTYA- und LEFTYB-Gen

Bei Mäusen haben Meno und Mitarbeiter zwei aus der Familie der transformierenden Wachstumshormone (TGF) stammende Gene, Lefty1 und Lefty2, identifiziert, die auf dem Chromosom 1 der Maus liegen und beide während der Embryogenese nur linksseitig exprimiert werden (Meno, 1996) (Meno, 1997) (Meno, 1998).

In weiteren Experimenten konnten sie zeigen, dass eine Störung von Lefty1 eine bilaterale Expression von drei weiteren, primär ebenfalls nur asymmetrisch im Maus-Embryo exprimierten, Genen zur Folge hatte: Lefty2, Nodal, Pitx2 (Meno, 1998).

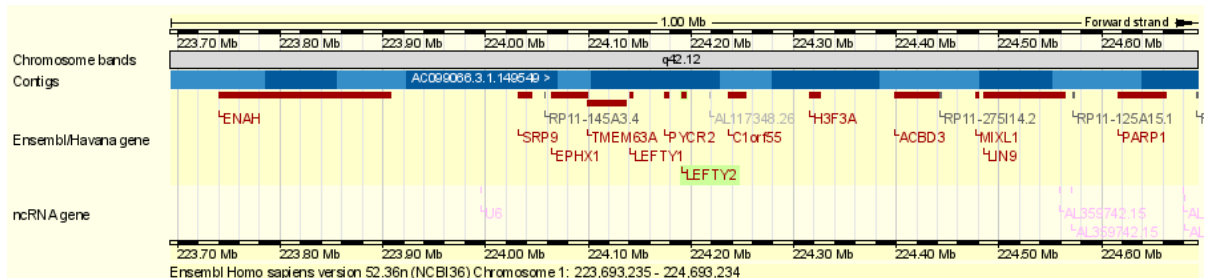
Die asymmetrische Expression von Nodal, Lefty2 und Pitx2 bei der Maus konnten dadurch erklärt werden, dass normalerweise die Expression von Nodal, Lefty2 und Pitx2 auf der rechten Seite durch die dort vorausgehende Expression von Lefty1 verhindert und die Initialisierung der Lateralisation darstellt (Nakamura, 2006).

Die homologen humanen Gene, LEFTYA und LEFTYB, wurden 1999 von Kosaki identifiziert. Beide Gene liegen in einem Abstand von 50kb auf dem Chromosom 1q42 und enthalten jeweils 4 Exons, die beim Splicing an exakt gleicher Stelle geschnitten werden.



**Abbildung 4 Chromosom 1 des Menschen (Abbildung aus der „ensembl project“-Datenbank)**

Die Ähnlichkeit zwischen LEFTYA und LEFTYB ist mit 96% höher als die Ähnlichkeit zwischen LEFTYA und Lefty1/Lefty2 mit 81% und der Ähnlichkeit zwischen LEFTYB und Lefty1/Lefty2 mit 82%.



**Abbildung 5 Lokalisation der Lefty1 (=LEFTYA)- und Lefty2 (=LEFTYB)-analogen Gene auf dem Chromosom 1 des Menschen (Abbildung aus der „ensembl project“-Datenbank)**

Nach Identifikation der humanen Homologe LEFTYA und LEFTYB führten Kosaki und Mitarbeiter bei 126 Patienten mit Lateralisationsdefekten eine Mutationsuche in den Bereichen beider Gene durch (Kosaki, 1999). Bei den Patienten handelte es sich um 112 sporadische und 14 familiäre Fälle von Lateralisationsdefekten. Eine genauere Differenzierung der Situs anomalien oder der assoziierten angeborenen Herz- und Gefäßfehlbildungen wurde nicht beschrieben.

Eine „nonsense“- und eine „missense“-Mutation wurden bei zwei der Patienten mit sporadischen Lateralisationsdefekten in LEFTYA, im Bereich des Exon 4 gefunden. In einer Kontrollgruppe von 200 Chromosomen konnten die beschriebenen Mutationen nicht nachgewiesen werden.

Der Patient mit „nonsense“-Mutation, einer Punktmutation die zum vorzeitigen Auftreten eines Stop-Codon führt, wies eine Kombination schwerer Herz- und Gefäßfehlbildungen auf: hypoplastisches Linksherz-Syndrom, atrioventrikulärer Septumdefekt, Aortenatresie, linkspersistierende obere Hohlvene, bilaterale linke (zwei) Lungenlappen, Polysplenie, mittelständige Leber, Magen rechts, Malrotation des Darms.

Der Patient mit „missense“-Mutation, einer Punktmutation mit Austausch eines Nukleotids, das zu einer Änderung der kodierenden Aminosäure führt, zeigte vergleichbare Fehlbildungen: hypoplastischer linker Ventrikel, Dextrocardie, atrioventrikulärer Septumdefekt, Subaortenstenose und Aortenisthmusstenose, linkspersistierende obere Hohlvene, atrialer Situs inversus, bilaterale linke (zwei) Lungenlappen, Leber links, Magen rechts.

Die bei den Patienten beschriebenen Situs anomalien zeigten eine hohe Übereinstimmung mit den Situs anomalien der Mäuse, bei denen das Lefty1-Gen defekt war: atrioventrikulärer Septumdefekt, hypoplastischer linker Ventrikel, Obstruktionen im linken Ausflusstrakt, pulmonaler Isomerismus.

Eine Untersuchung der DNA der gesunden Eltern beider Patienten, zeigte ein heterozygoten Auftreten der Mutation bei der Mutter des Patienten mit „nonsense“-Mutation und das heterozygote Auftreten der Mutation beim Vater des Patienten mit „missense“-Mutation. Kosaki erklärt diese Befunde durch inkomplette Penetranz, die häufig bei Lateralisationsdefekten im Tiermodell nachweisbar ist (Meno, 1998) (Icardo, 1991) sowie durch kumulative Effekte durch Mutationen in mehr als einem an der Lateralisation beteiligtem Gen und der daraus resultierenden doppelten Heterozygotie (Collignon, 1996) (Nomura, 1998). Eine Untersuchung der DNA der beiden Patienten mit Mutationen im Bereich des LEFTYA-Gens in weiteren an Lateralisationsdefekten beteiligten Genen (NODAL, ZIC3) konnte jedoch keine weiteren Mutationen aufdecken. Die Hypothese einer doppelt-heterozygoten Entstehung kann hierdurch, aufgrund der vermutlich hohen Anzahl der an Lateralisationsdefekten beteiligten Genen, jedoch nicht widerlegt werden (Casey, 1998).

### 1.3.3.3. EGF-CFC-Gene

Shen und Mitarbeiter beschrieben 1997 erstmals eine neue Familie von Genen, EGF-CFC. Die Proteine der EGF-CFC-Gene enthalten Motive, wie sie bereits bei den zuvor genannten Proteinen der Wachstumshormone aus der EGF-Familie (EGF = „epidermal growth factor“) beschrieben wurden. Desweiteren weisen sie eine hohe Homologie zu denen bei der Maus beschriebenen „Cryptic“- und „Cripto“-Genen sowie wie dem beim Frosch beschriebenen Xenopus FRL-1-Gen auf. Benannt wird diese Familie von Wachstumshormon Genen nach den enthalten Genen von Maus und Frosch EGF-CFC (Cryptic, FRL-1, Cripto) (Shen, 1997).

In weiteren Untersuchungen konnten Yan und Mitarbeiter 1999 durch das gezielte Ausschalten des aus der EGF-CFC Familie stammenden „Cryptic“-Gens bei der Maus Lateralisationsdefekte und assoziierte angeborene Herz- und Gefäßfehlbildungen erzeugen. In einer Gruppe von 49 Mäusen, die homozygote „Cryptic“-Mutationen aufwiesen, zeigten sich Situs anomalien und angeborene Herz- und Gefäßfehlbildungen:

<b>Herz- und Gefäßfehlbildungen bei Mäusen mit homozygoter „Cryptic“-Mutation</b>	<b>%</b>
Asplenie	100
Bilateral rechte (drei) Lungenlappen	100
Transposition der großen Arterien	100
Defekte von Vorhof- / Ventrikelseptum	88
Atrialer Isomerismus	71
Unterbrochene untere Hohlvene	64
Malposition der Leber	41

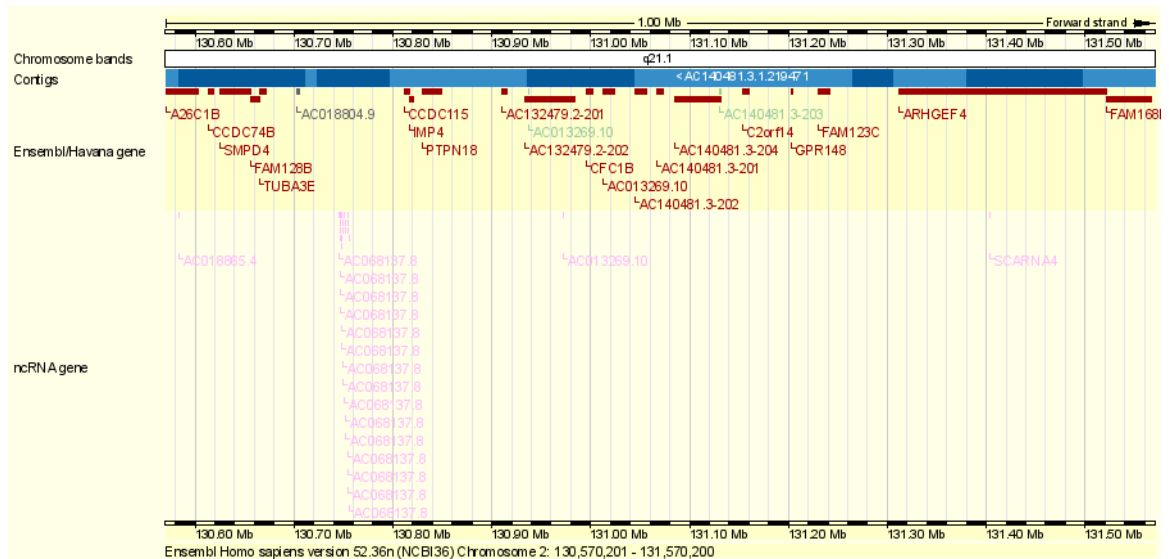
**Tabelle 4 Inzidenz der Herz- und Gefäßfehlbildungen bei Mäusen mit homozygoter „Cryptic“-Mutation (Yan, 1999)**

Nachfolgende Untersuchungen konnten zeigen, dass die seitendifferente Expression von Nodal, Lefty1, Lefty2 und Pitx2 bei homozygoten Trägern der Cryptic-Mutation aufgehoben wurde (Yan, 1999).

Ein Jahr später untersuchten Bamford und Mitarbeiter das humane Homolog des Cryptic-Gens (CFC1) in einer Gruppe von 144 Patienten mit sporadischen und familiären Lateralisationsdefekten (Bamford, 2000). Das CFC1-Gen liegt auf Chromosom 2q21.1 und kodiert für das CRYPTIC-Protein.



**Abbildung 6 Chromosom 2 des Menschen (Abbildung aus der „ensembl project“-Datenbank)**



**Abbildung 7 Lokalisation des CFC1-Gens auf Chromosom 2 des Menschen (Abbildung aus der „ensembl project“-Datenbank)**

Von den 144 untersuchten Patienten konnte bei 9 Patienten eine Mutation im CFC1-Gen gefunden werden. Einer der Patienten wies zusätzlich eine Mutation im NODAL-Gen auf.

Die Träger der CFC1-Mutation zeigten Kombinationen assoziierter komplexer Herz- und Gefäßfehlbildungen :

<b>Herz- und Gefäßfehlbildungen bei Mutation des CFC1-Gens des Menschen</b>	<b>%</b>
Dextrokardie	56
Ventrikelseptumdefekt	33
Transposition der großen Arterien	33
Pulmonalatresie	22
Vorhofseptumdefekt	22
Atrio-ventrikulärer Septumdefekt	11
Doppelter Auslass rechter Ventrikel	11
Totale Lungenvenenfehlöffnung	11
Hypoplastisches Linksherz	11
Unterbrochener Aortenbogen	11
Linkspersistierende obere Hohlvene	11

*Tabelle 5 Inzidenz der Herz- und Gefäßfehlbildungen bei Mutation des CFC1-Gens des Menschen (Bamford, 2000)*

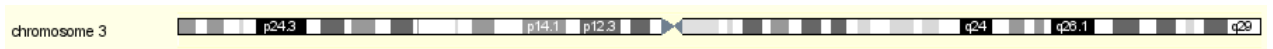
Der gesunde Vater eines der Patienten mit Mutation im CFC1-Gen wies ebenfalls eine heterozygote Mutation im CFC1-Gen auf. Der Autor erklärt dies durch eine inkomplette Penetranz und der Hypothese einer doppelten Heterozygotie, wie sie bereits bei anderen an Lateralisationsdefekten beteiligten Genen (Kosaki, 1999) beschrieben wurde. In einer Kontrollgruppe von über 300 Chromosomen konnten die gefundenen Mutationen nicht nachgewiesen werden. Der Nachweis der Mutationen im CFC1-Gen bei oben beschriebenen Patienten mit Lateralisationsdefekten legt die Annahme nahe, dass CFC1 ursächlich an der Entstehung von Lateralisationsdefekten beteiligt ist (Bamford, 2000).



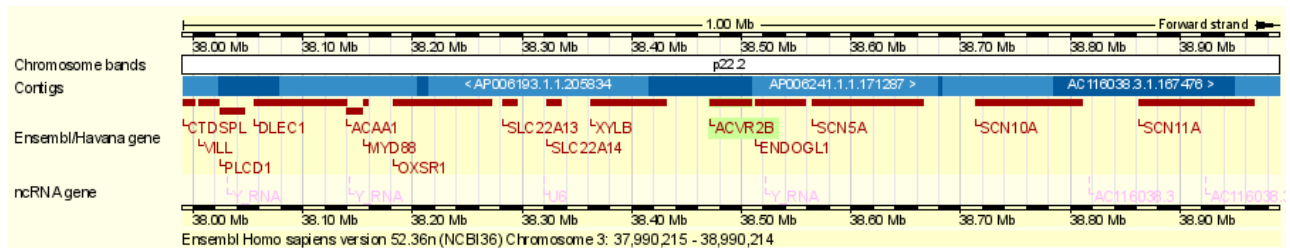
### 1.3.3.4.ACVR2B-Gen

Aktivine gehören zur Gruppe der transformierenden Wachstumshormone und zeigen ein weites Spektrum an Steuerungsvorgängen bei Zellwachstum und Differenzierung. Aktivine interagieren mit Aktivinrezeptoren zu denen der Aktivin-RezeptorIIB (ActRIIB) gehört. Die Arbeitsgruppe um Oh und Li untersuchten 1997 das für den ActRIIB-Rezeptor kodierende Gen der Maus (ActRIIB-Gen). Durch Ausschalten des Gens zeigte sich bei homozygoten Tochtergenerationen ein frühes Versterben nach der Geburt an komplexen Herz- und Gefäßfehlbildungen. Weitere Untersuchungen zeigten bei 100 % der Nachkommen unterschiedliche Kombinationen von Malpositionen der Herzspitze und der deszendierenden Aorta, Vorhof- und Kammerseptumdefekten sowie Malpositionen der großen Gefäße. Assoziiert mit den Herz- und Gefäßfehlbildungen zeigten sich Lateralisationsdefekte: bilateral vierlappige Lungen und symmetrische Bronchien, bilateral rechte Herzohren und Asplien. Mäuse mit heterozygoter Mutation waren phänotypisch unauffällig (Oh, 1997).

Das humane Homolog (hActR-IIB) des ActRIIB-Gens der Maus wurde erstmals von Ishikawa und Mitarbeitern 1998 beschrieben, es ist auf Chromosom 3p22 lokalisiert, umfasst einen Bereich von 30kb und besteht aus 11 Exons (Ishikawa, 1998).



**Abbildung 8 Chromosom 3 des Menschen (Abbildung aus der „ensembl project“-Datenbank)**



**Abbildung 9 Lokalisation des hActR-IIB-Gens (=ACVR2B-Gen) auf Chromosom 3 des Menschen (Abbildung aus der „ensembl project“-Datenbank)**

Kosaki und Mitarbeiter untersuchten 1999 eine Gruppe von 126 Patienten mit Lateralisationsdefekten (112 sporadisch, 14 familiär) auf Mutationen im hActR-IIB-Gen, das nachfolgend in ACVR2B-Gen umbenannt wurde (Kosaki R. , 1999). Bei 3 Patienten konnten 2 unterschiedliche „missense“-Mutationen im ACVR2B-Gen gefunden werden. In einer Kontrollgruppe von 200 Chromosomen konnten die Mutationen nicht nachgewiesen werden. Die betroffenen Patienten zeigten zusätzlich komplexe angeborene Herz- und Gefäßfehlbildungen:

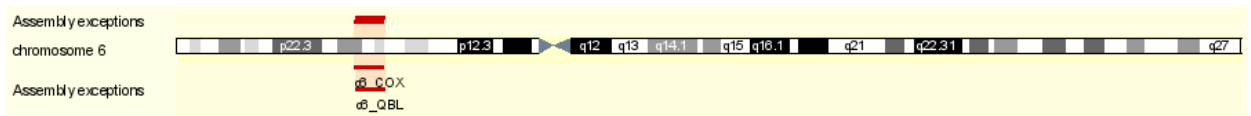
- Patient 1: Unterbrochene untere Hohlvene, V. azygos-Kontinuität, Vorhof septumdefekt, Dextrokardie, Leber mittelständig, Malrotation des Darms, Milz rechtsseitig
- Patient 2: Unterbrochene untere Hohlvene, V. azygos-Kontinuität, atrio-ventrikulärer Septumdefekt, doppelter Auslass rechter Ventrikel, Transposition der großen Arterien, Pulmonalstenose, Polysplenie, Leber mittelständig
- Patient 3: Bilaterale obere Hohlvene, totale Lungenvenenfehlmündung, Ventrikelseptumdefekt, Transposition der großen Arterien, Pulmonalstenose, Leber mittelständig

Die oben beschriebenen heterozygoten Mäuse wiesen keine phänotypischen Veränderungen auf, während die untersuchten Patienten alle heterozygot für die gefundene Mutation waren.

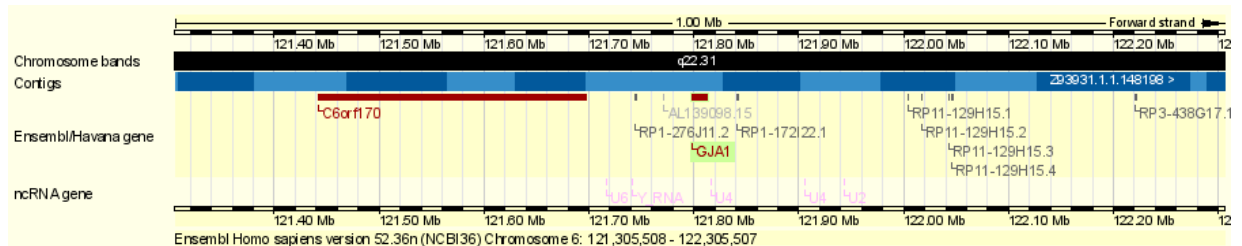
Die gefundenen humanen heterozygoten Mutationen sollten aufgrund der bereits oben beschriebenen Möglichkeit einer inkompletten Penetranz und einer multiplen Heterozygotie (Kosaki, 1999) als kausale, jedoch seltene, Faktoren bei der Entstehung von Lateralisationsdefekten in Betracht gezogen werden.

### 1.3.3.5. CONNEXIN 43-Gen

Zusätzlich zu der zunehmenden Zahl von Mitteilungen über Gen-Mutationen bei familiären Lateralisationsdefekten mit und ohne assoziierte Herz- und Gefäßfehlbildungen untersuchten Britz-Cunningham und Mitarbeiter 1995 das CONNEXIN43 „gap-junction“-Gen auf Mutationen bei Patienten mit angeborenen Herz- und Gefäßfehlern und Lateralisationsdefekten (Britz-Cunningham, 1995). Das CONNEXIN43-Gen konnte von Fishman und Mitarbeitern auf Chromosom 6 lokalisiert werden (Fishman, 1990), seine Größe umfasst ca. 15000bp.



**Abbildung 10 Chromosom 6 des Menschen (Abbildung aus der „ensembl project“-Datenbank)**



**Abbildung 11 Lokalisation des CONNEXIN43-Gens auf Chromosom 6 des Menschen (Abbildung aus der „ensembl project“-Datenbank)**

Britz-Cunningham und Mitarbeiter untersuchten die DNA von 25 gesunden Probanden und 30 Patienten mit unterschiedlichen angeborenen Herz- und Gefäßfehlbildungen: hypoplastisches Linksherzsyndrom, hypertrophierte und dilatierte Kardiomyopathien, Asplenie und Polysplenie Syndrome, hypoplastischer Aortenbogen, Vorhof- und Kammerseptumdefekte, Trisomie 13 und DiGeorge Syndrom (22q1.1 Mikrodeletion) (Britz-Cunningham, 1995). Eine detaillierte Beschreibung der angeborenen Herz- und Gefäßfehlbildungen sowie der assoziierten Lateralisationsdefekte wurde nicht gegeben. Die Patienten waren aufgrund der komplexen Herzfehlbildungen transplantiert, die untersuchte DNA wurde aus Herzmuskelgewebe der explantierten Herzen isoliert. Die Kontrollgruppen DNA entstammte der Extrahierung aus Vollblut.

Bei 25 gesunden Probanden konnte keine Änderung der Nukleotidabfolge im Vergleich zu einer HSCGJP- (=“human sequence cardiac gap-junction protein“) Gen-Datenbank gefunden werden.

Wie oben beschrieben liegt nach aktueller Definition eine Heterotaxie vor, sobald eine segmentale Diskordanz im Bereich der thorakalen oder viszeralen Segmente nachweisbar ist.

Die in der Arbeit von Britz-Cunningham als Heterotaxie definierten Patienten wiesen als Einschlusskriterium eine atriale, bronchopulmonale oder viszerale Isomerie auf.

Aus der Gruppe der 30 Patienten mit komplexen angeborenen Herz- und Gefäßfehlbildungen wiesen 24 der Patienten (80%) keine atriale, bronchopulmonale oder viszerale Isomerie auf und wurden nicht als Patienten mit Heterotaxie definiert. Diese Gruppe von 24 Patienten ohne assoziierte Heterotaxie zeigten keine Mutationen im CONNEXIN-Gen.

Eine Gruppe von 6 Patienten mit komplexen, nicht weiter differenzierten Herz- und Gefäßfehlbildungen sowie assoziierten atrialem, bronchopulmonalem oder viszeralem Isomerismus (= Heterotaxie) zeigten Mutationen im Bereich des CONNEXIN43-Gens:

Phänotypus:

Patient 1 – 3:	Asplenie-Syndrom , Pulmonalatresie / -stenose
Patient 4 – 5:	Polysplenie-Syndrom, Pulmonalatresie/ -stenose
Patient 6:	Normale Milz, atrialer und bronchopulmonaler Isomerismus, Pulmonalatresie/ -stenose

Genotypus:

Patient 1	Ser364Pro	Glu352Gly
Patient 2	Ser364Pro	
Patient 3	Ser364Pro	Ser365Asn
Patient 4	Ser364Pro	
Patient 5	Ser364Pro	Ser373Gly
Patient 6	Thr326Ala	Glu352Gly

Bei einem weiteren Patienten konnte eine Mutation im Bereich des CONNEXIN43-Gens gefunden werden. Dieser Patient wies jedoch im Unterschied zu den 6 anderen Mutationsträgern keinen atrialen, bronchopulmonalen oder viszeralen Isomerismus auf und keine Pulmonalatresie /-stenose auf.

Phänotypisch konnte bei diesem Patienten mit Mutation im Bereich des CONNEXIN43-Gens ein familiär auftretender Vorhofseptumdefekt vom Sekundumtyp nachgewiesen werden.

Britz-Cunningham und Mitarbeiter schlussfolgerten eine Assoziation zwischen Mutationen im CONNEXIN43-Gen und Heterotaxie.

Die Beschreibungen von Britz-Cunningham und Mitarbeiter über Mutationen bei 6 Patienten mit Heterotaxie und Pulmonalstenose / Pulmonalatresie wurden von 5 Arbeitsgruppen in vergleichbaren Patientenkollektiven überprüft. Keine der Arbeitsgruppen konnte die von Britz-Cunningham und Mitarbeitern beschriebenen Mutationen in denen von ihnen untersuchten Patientengruppen nachweisen.

Casey und Ballabio untersuchten 1995 die aus Vollblut gewonnene DNA einer Gruppe von 15 Patienten mit Heterotaxie (= atrialer, bronchopulmonaler oder viszeraler Isomerismus) und angeborenen Herz- und Gefäßfehlbildungen durch Sequenzierungen, ohne Nachweis von Mutationen im CONNEXIN43-Gen (Casey, 1995).

Splitt und Mitarbeiter untersuchten im gleichen Jahr die aus Vollblut gewonnene DNA von 12 Patienten mit Heterotaxie (= atrialer, bronchopulmonaler oder viszeraler Isomerismus) und angeborenen Herz- und Gefäßfehlbildungen durch Sequenzierungen, ohne Nachweis von Mutationen im CONNEXIN43-Gen (Splitt, 1995).

Eine dritte Arbeitsgruppe um Gebbia untersuchte 1995 die DNA aus Vollblut von 38 Patienten mit Heterotaxie (= atrialer, bronchopulmonaler oder viszeraler Isomerismus) und angeborenen Herz- und Gefäßfehlbildungen auf Mutationen im CONNEXIN43-Gen. 19 der Patienten wurden durch Sequenzierungen, die anderen 19 durch den Einsatz von Restriktionsenzymen, die das Vorhandensein der von Britz-Cunningham beschriebenen Mutationen durch Restriktion der DNA aufdecken, untersucht. Keiner der 38 Patienten wies die beschriebenen Mutationen auf (Gebbia, 1996).

Die Arbeitsgruppe von Debrus untersuchte 1997 eine Gruppe von 25 Patienten mit Heterotaxie (= atrialer, bronchopulmonaler oder viszeraler Isomerismus) und angeborenen Herz- und Gefäßfehlbildungen. Dabei beschränkten sie sich nicht auf den Nachweis der von Britz-Cunningham beschriebenen Mutationen, sondern untersuchten den kodierenden Bereich mittels SSCP („single strand conformation polymorphisms“) und anschließender Sequenzierung vollständig. Nachdem diese Untersuchungen keine Mutationen nachweisen konnten, untersuchten sie die Familien der 25 Patienten mittels Genkoppelungs-Analyse, wobei der Genlokus des CONNEXIN43 in fast allen Fällen als Ursache für die Vererbung ausgeschlossen werden konnte (Debrus, 1997).

Abschließend muss die Arbeitsgruppe um Tóth genannt werden, die 1998 eine Gruppe von 11 Patienten mit Heterotaxie und angeborenen Herz- und Gefäßfehlbildungen untersuchte, ohne Mutationen im CONNEXIN43-Gen nachweisen zu können (Tóth, 1998).

Die diskrepanten Ergebnisse von Britz-Cunningham und der genannten 5 Arbeitsgruppen konnten nicht abschließend geklärt werden:

Britz-Cunningham verwendete Herzmuskelgewebe für die DNA-Extraktion, während alle anderen Arbeitsgruppen DNA aus Lymphozyten isolierten. Die daraus resultierende Möglichkeit einer somatischen Mutation könnte durch die Untersuchung von DNA aus Lymphozyten der von Mutationen im CONNEXIN43-Gen betroffenen Patienten ausgeschlossen werden. Eine solche Untersuchung wurde jedoch nicht durchgeführt.

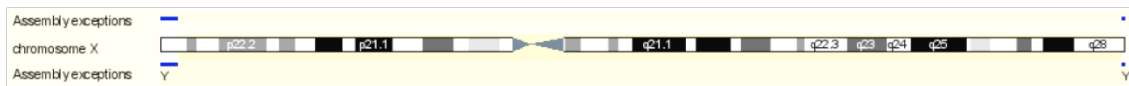
Der Einwand von Britz-Cunningham, es handle sich bei den von ihm untersuchten 6 Patienten um eine selektionierte Gruppe mit Heterotaxie und Pulmonalstenose / Pulmonalatresie konnte die Differenzen nicht ausreichend erklären. Zwar ist die Obstruktion des rechten Ausflusstraktes wichtiges phänotypisches Merkmal der Mäuse mit Nullmutation im Connexin43-Gen und Ursache des postnatalen Versterbens der Tiere, doch weisen diese keine Merkmale einer Heterotaxie auf. Desweiteren ist die Pulmonalstenose / Pulmonalatresie ein häufig mit der Heterotaxie assoziierter Herzfehler beim Menschen, und folglich bei vielen der durch die 5 Arbeitsgruppen untersuchten Patienten vorhanden.

Abschließend ist die Mutation des CONNEXIN43-Gens bei der Entwicklung von Lateralisationsdefekten in Assoziation mit angeborenen Herz- und Gefäßfehlbildungen als selten zu werten. Ob es sich bei den von Britz-Cunningham beschriebenen Mutationen um labortechnische Fehler handelt konnte nicht ausreichend geklärt werden.

### 1.3.3.6.ZIC3-Gen des Menschen

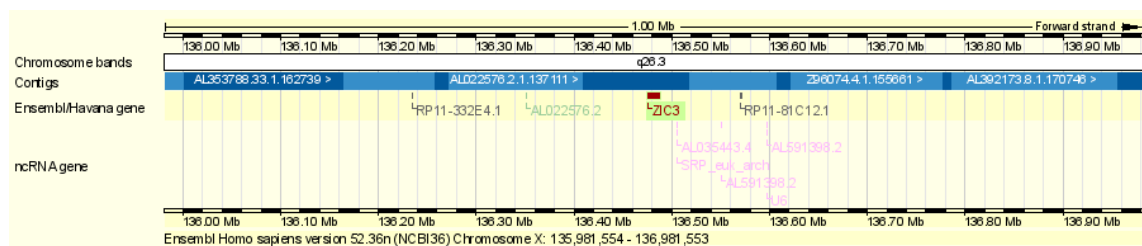
Das Zic3-Gen der Maus (Zic = „zinc finger protein of cerebellum“) ist eines von vier ähnlichen Genen die alle jeweils für Zink-Finger Proteine, (Aruga, 1994) bzw. Transkriptionsfaktoren kodieren. Zic3 wurde erstmals 1996 von Aruga und Mitarbeitern in der Maus identifiziert (Aruga, 1996). Es befindet sich auf Chromosom X und besitzt eine hohe Homologie zu den drei anderen Zic-Genen der Maus.

Der Entdeckung der Bedeutung der Zink-Finger Gene (Aruga, 1996) ging die Identifizierung und Lokalisierung des Heterotaxie-Lokus (HTX) auf dem humanen X-Chromosom (Xq24-q27.1) bei 39 Mitgliedern mit einer x-chromosomal vererbten Heterotaxie durch Casey und Mitarbeiter 1993 voraus (Casey, 1993).



**Abbildung 12 X-Chromosom des Menschen (Abbildung aus der „ensembl project“-Datenbank)**

In der Folge gelang Gebbia und Mitarbeitern 1997 die Identifizierung eines Gens im Heterotaxie-Lokus-Bereich (HTX) des X-Chromosoms (Xq26.2) (Gebbia, 1997). Das humane ZIC3-Gen weist eine 98%ige Homologie zu dem oben beschriebenen Zic3-Gen der Maus auf und kodiert wie dieses ebenfalls für einen Zink-Finger-Transkriptionsfaktor.



**Abbildung 13 Lokalisation des ZIC3-Gens auf dem X-Chromosom des Menschen (Abbildung aus der „ensembl project“-Datenbank)**

Der Abschluß der Arbeit von Gebbia war die erfolgreiche Mutationsanalyse des ZIC3-Gens bei Patienten mit familiärem oder sporadisch aufgetretenem Heterotaxie-Syndrom. Gebbia und Mitarbeiter inkludierten gemäß der zu diesem Zeitpunkt bestehenden Heterotaxie-Definition alle Patienten mit multiplen kongenitalen Fehlbildungen (insbesondere komplexen angeborenen Herz- und Gefäßfehlbildungen) sowie assoziierter Asplenie / Polysplenie, intestinaler Malrotation und Fehlbildungen des Gallengangsystems. In der Mutationsanalyse gelang Gebbia und Mitarbeitern der Nachweis von einer „frameshift“, zwei „missense“ sowie zwei „nonsense“ Mutationen. Mutationen im ZIC3-Gen konnten weder in einer Gruppe von 14 phänotypisch unauffälligen männlichen Familienangehörigen noch in einer Gruppe von 200 Kontrollchromosomen nachgewiesen werden. Das ZIC3-Gen ist das erste Gen, welches mit humanen Lateralisationsdefekten korreliert werden konnte (Gebbia, 1997).

Mégarbané und Mitarbeiter untersuchten 15 Mitglieder einer Familie (6 weiblich, 9 männlich), von denen 2 männliche Mitglieder Lateralisationsdefekte und angeborene Herz- und Gefäßfehlbildungen (linkspersistierende obere Hohlvene, Vorhofseptumdefekt, atrioventrikulärer Septumdefekt, hypoplastischer rechter Ventrikel, subvalvuläre und valvuläre Pulmonalstenose, D-Transposition der großen Arterien) aufwiesen. Ein weiteres männliches Familienmitglied war zyanotisch geboren und am dritten postpartalen Tag ohne Möglichkeit einer vorherigen Untersuchung des thorakalen und abdominalen Situs verstorben. In der Mutationsanalyse des ZIC3-Gens konnte bei einem der Patienten eine Mutation nachgewiesen werden. Zwei der weiblichen Familienangehörigen waren phänotypisch unauffällige Träger einer ZIC3-Mutation. Desweiteren wurde in der Arbeit von Mégarbané erstmals eine Mutation innerhalb des ZIC3-Gens bei einem männlichen Probanden ohne angeborene Herz- und Gefäßfehlbildung und ohne Lateralisationsdefekt beschrieben. Mégarbané und Mitarbeiter erklärten dies durch eine inkomplette Penetranz der Mutation (Mégarbané, 2000).

Purandare und Mitarbeiter untersuchten 2002 mit Hilfe eines Mausmodells die Funktion des Zic3-Gens. Nach Ausschalten des Zic3-Gens zeigten die Tochtergenerationen angeborene Herz- und Gefäßfehlbildungen sowie Lateralisationsdefekte die mit den humanen Fehlbildungen bei ZIC3-Mutationen vergleichbar waren: Vorhof- und Kammerseptumdefekte, komplette Lungenvenenfehlmündungen, D-Transposition der großen Gefäße, unterbrochene Aortenbogen, bilateral rechts-/linksseitige Lungenlappen, hypoplastische Milz (Purandare, 2002).

Desweiteren konnten die Arbeiten von Purandare sowie Ware und Mitarbeitern einen Einblick in die gegenseitige Abhängigkeit, im Bezug auf die embryonale Lateralisation, der beiden Hauptvertreter der während der frühen Embryogenese der Maus asymmetrisch exprimierten Gene, Zic3 und Nodal, geben. Experimente mit Zic3-Mäusen konnten zeigen, dass es bei Mäusen, denen das Zic3-Gen fehlte, während der Embryogenese initial zwar zu einer transitorischen Expression des Nodal-Gens kommt, dass diese jedoch nach kurzer Zeit aufhört und eine fehlerhafte Links-Rechts-Asymmetrie zur Folge hatte. Desweiteren wiesen „compound-heterozygote“ Mäuse (unterschiedliche Mutationen in beiden Allelen des gleichen Gens) für Zic3 und Nodal (Zic3<sup>+/-</sup> ; Nodal<sup>+/-</sup>) eine erhöhte Inzidenz von Lateralisationsdefekten und angeborenen Herz- und Gefäßfehlbildungen sowie eine deutliche erhöhte postpartale Mortalität auf (Purandare, 2002) (Ware, 2006) (Zhu, 2006) (Zhu, 2007).



Der Nachweis einer Abhängigkeit der Expression des Nodal-Gens von dem Vorhandensein des Zic3-Gens bei der Maus und der sich hieraus ergebenden Konsequenz für die Determination der Lateralität musste die Frage nach der Bedeutung der humanen Homologe des ZIC3- und NODAL-Gens bei Lateralisationsdefekten des Menschen implizieren.

Ware und Mitarbeiter erweiterten die Mutationsanalyse des humanen ZIC3-Gens 2004 in einer Gruppe von 194 Patienten mit angeborenen Herz- und Gefäßfehlern und Lateralisationsdefekten. Dabei wurden die Patienten in 3 Gruppen unterteilt:

**Klassische Heterotaxie:** familiär oder sporadisch auftretende angeborene Herz- und Gefäßfehlbildung in Assoziation mit Unterbrechung der Links-Rechts-Achsen Symmetrie in mindestens einem weiteren Organsystem (Asplenie, Polysplenie, Milzdysfunktion, intestinale Malrotation, abdominaler Situs inversus, bilateral zweilappige Lunge, bilateral dreilappige Lunge, Gallenwegsfehlbildungen, Lageanomalien von Leber oder Magen).

**Angeborene Herzfehler – Heterotaxie:** familiär oder sporadisch auftretende angeborene Herz- und Gefäßfehlbildung ohne assoziierte Unterbrechung der Links-Rechts-Achsen Symmetrie in den anderen Organsystemen.

**Situs inversus:** sporadisch auftretende spiegelbildliche Anordnung der asymmetrisch angelegten thorakalen und viszerale Organe.

Die untersuchte Patientengruppe bestand aus 20 familiären Fällen von Heterotaxie, 145 sporadischen Fällen von Heterotaxie sowie 29 Kontrollpatienten mit Vorhof- / Kammerseptumdefekten ohne Heterotaxie (Ware, 2004).

Ware und Mitarbeiter konnten insgesamt 5 Mutationen innerhalb des ZIC3-Gens nachweisen. In der Gruppe der 20 Patienten mit familiären angeborenen Herz- und Gefäßfehlbildungen sowie assoziierten Lateralisationsdefekten wiesen 3 Patienten eine Mutation innerhalb des ZIC3-Gens auf (2 „nonsense“- , 1 „missense“-Mutation). Bei allen Patienten konnte eine Asplenie nachgewiesen werden, die angeborenen Herz- und Gefäßfehlbildungen zeigten eine Kombination komplexer Fehlbildungen: unterbrochene untere Hohlvene, bilaterale obere Hohlvene, Vorhof- und Kammerseptumdefekte, singulärer Ventrikel, hypoplastisches Linksherzsyndrom, doppelter Auslass rechter Ventrikel, Pulmonalstenose /-atresie, Transposition der großen Arterien, komplette Lungenvenenfehlöffnung.

Aus der Gruppe der 145 Patienten mit sporadischer Heterotaxie und angeborenen Herz- und Gefäßfehlbildungen wies eine Patientin mit Ventrikelseptumdefekt, Pulmonalstenose und kompletter Transposition der großen Arterien mit L-Malpositionstellung eine Mutation innerhalb des ZIC3-Gens auf. Es handelte sich hierbei um die erste weibliche Patientin mit Lateralisationsdefekt und Mutation im ZIC3-Gen.

Eine weitere Mutation wurde bei einem Patienten mit nicht familiärem Vorhofseptumdefekt und Pulmonalstenose ohne assoziierte Heterotaxie nachgewiesen.

Die Arbeitsgruppe um Ware folgerte aus diesen Untersuchungen, dass bei etwa 1% der Patienten mit sporadischen Herz- und Gefäßfehlbildungen und assoziierter Heterotaxie Mutationen im ZIC3-Gen kausale Bedeutung haben (Ware, 2004).

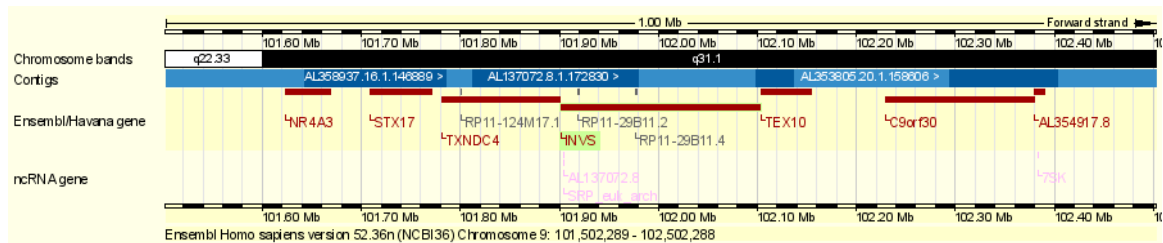
### 1.3.3.7.INV-Gen

Die Entdeckung des *inv*-Gens bei Mäusen durch Yokoyama und Mitarbeiter 1993 sowie die Identifizierung und Lokalisation innerhalb des Genoms durch Morgan und Mitarbeiter 1998 (siehe oben) stellte ein neues Kandidaten-Gen für die Mutationsanalyse von Patienten mit Lateralisationsdefekten und angeborenen Herz- und Gefäßfehlbildungen dar (Yokoyama et al. 1993) (Morgan et al. 1998).

Das humane INV-Gen wurde 2002 von Schön und Mitarbeitern identifiziert und auf Chromosom 9q22.3-q31.1 lokalisiert (Schön et al. 2002).

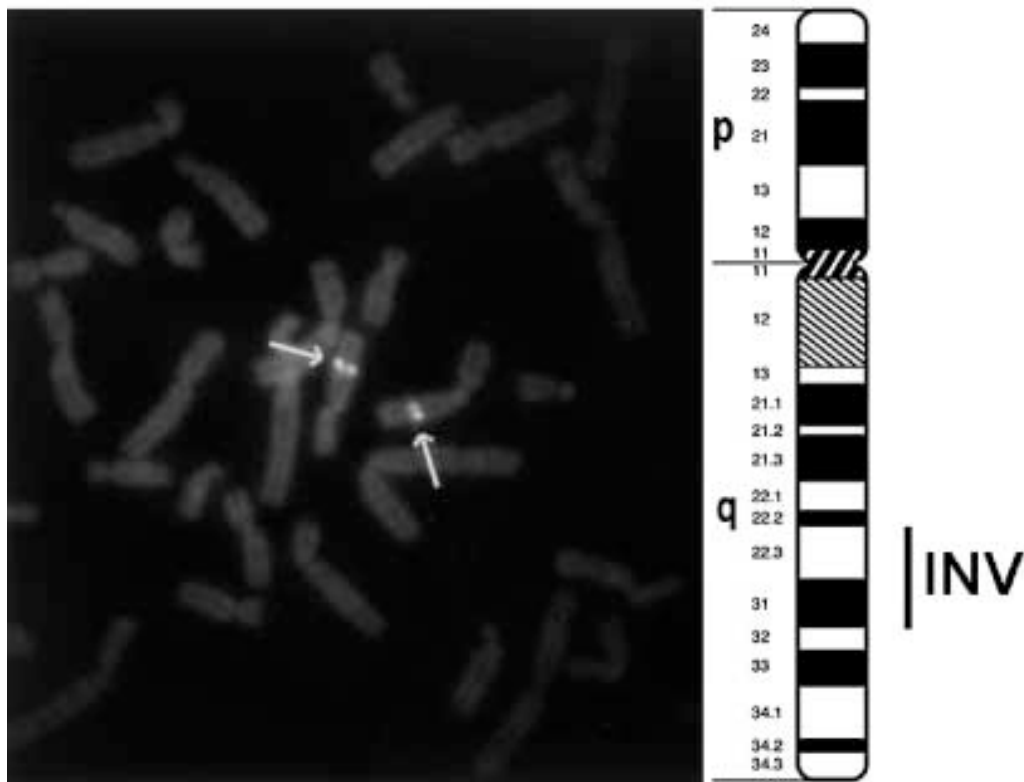


**Abbildung 14 Chromosom 9 des Menschen (Abbildung aus der „ensembl project“-Datenbank)**



**Abbildung 15 Lokalisation des INV-Gens auf Chromosom 9 des Menschen (Abbildung aus der „ensembl project“-Datenbank)**

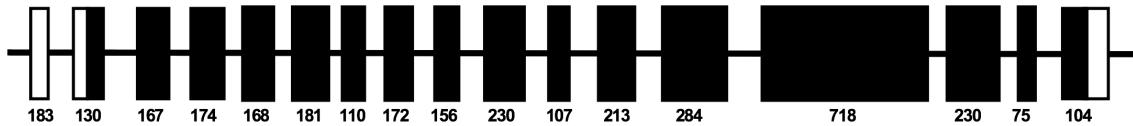
Das humane INV-Gen umfasst ca. 100kb mit zahlreichen nichtkodierenden Sequenzen (= Introns).



**Abbildung 16 Lokalisation des INV-Gens auf Chromosom 9 durch FISH**  
**Links: Lokalisation des INV-Gens auf beiden Chromosomen 9 mittels FISH („fluorescence in situ hybridisation“)**  
**Rechts: Ideogramm des Chromosom 9 mit Kennzeichnung der Lokalisation des INV-Gens innerhalb des Chromosoms (9q22.3-q31.1) (Schön et al. 2002)**

Das Gen besteht aus 16 kodierenden Exons. Alle Donorstellen (Ende des Exons) und Akzeptorstellen (Ende des Introns) zeigen eine Konsensus-Sequenz, das heißt die Donorstellen zeigen die bei allen höheren Organismen nachweisbaren, speziessübergreifend identischen GT- und alle Akzeptorstellen die identischen AG Sequenz.

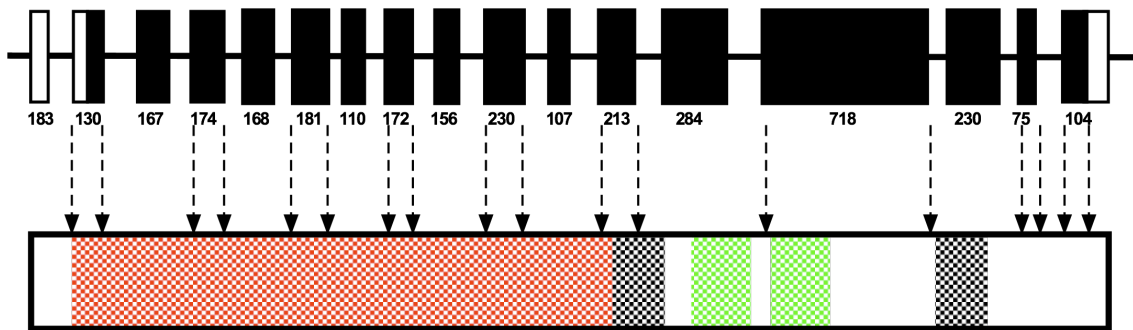
Die nach Translation entstehende INV-mRNA umfasst in einem offenen Leserahmen einen 3195bp langen Bereich, dessen Nukleotid-Basenpaare Sequenz für 1065 Aminosäuren kodiert.



**Abbildung 17 INV-Gen mit 16 Exon-Sequenzen**  
(Exon-Sequenzen schwarz eingefärbt, Nummer unterhalb des Exon bezeichnet die Größe in Nukleotiden)

Der offene Leserahmen des INV-Gens führt zur Synthese des INV-Proteins, in dessen Bereich zum N-Terminus gelegen ein Abschnitt mit 16 Ankyrin Abschnitten gefunden wurde.

Die zum C-Terminus gelegene Hälfte der Proteinstruktur enthält zwei IQ-Bereiche sowie zwei NLS-BP (=„nuclear localization signal-bipartite“) Bereiche.

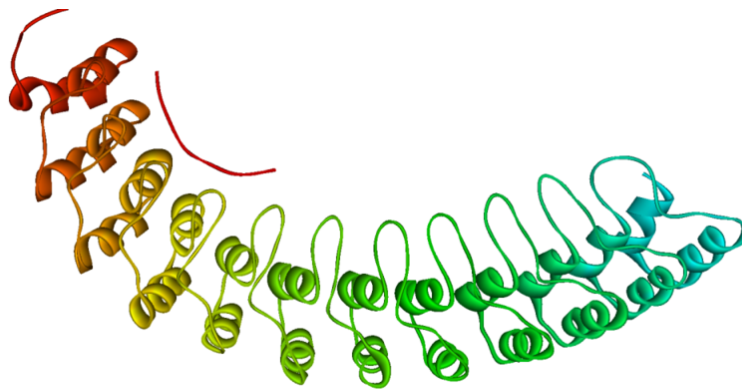


**Abbildung 18 INV-Protein mit den INV-Gen Domänen**  
(Ankyrin-Domänen = rot kariert, IQ-Domänen = schwarz kariert, NLS-BP-Domänen = grün kariert)

## Ankyrine

Ankyrine sind Repeat-Proteine die, wie Antikörper, zu den Bindungsproteinen gehören. Ankyrine, die über dynamische, nicht-kovalente Bindungen mit integralen Membranproteinen interagieren, können somit deren räumliche Verteilung innerhalb der Zellmembran beeinflussen. Die Sequenz des Ankyrin Motivs ist eines der häufigsten innerhalb von Proteinen. Die Entdeckung von 24 Kopien dieser Sequenz in dem Cytoskelett-Protein Ankyrin führte zu seinem Namen (Bartrukova et al. 2000) (Rubtsov et al. 2000).

Die Funktion der Ankyrine bei Protein-Protein Interaktionen wurde erstmals von Sedgwick und Smerdon 1999 beschrieben (Sedgwick et al. 1999). Ankyrine zeigen eine hohe Anzahl von Variationen, wie zum Beispiel die Anzahl der Wiederholungen („ankyrin-repeats“) innerhalb eines Proteins oder die Sequenz der Aminosäuren innerhalb der Wiederholungen. In jedem Ankyrin existieren dennoch Schlüsselpositionen, an denen die Aminosäuren nicht variieren. Durch diese Schlüsselposition wird die räumliche Anordnung des Proteins bestimmt. Im Falle der Ankyrine besteht diese aus Paaren von antiparallelen  $\alpha$ -Helices die nebeneinander liegen und über  $\beta$ -Haarnadel Motive miteinander verbunden sind.



*Abbildung 19 Ankyrin Motiv (Sedgwick et al. 1999)*

Das humane INV-Gen beinhaltet 16 Ankyrine und ist in diesem Bereich des Gens zu 100 % homolog zum inv-Gen der Maus.

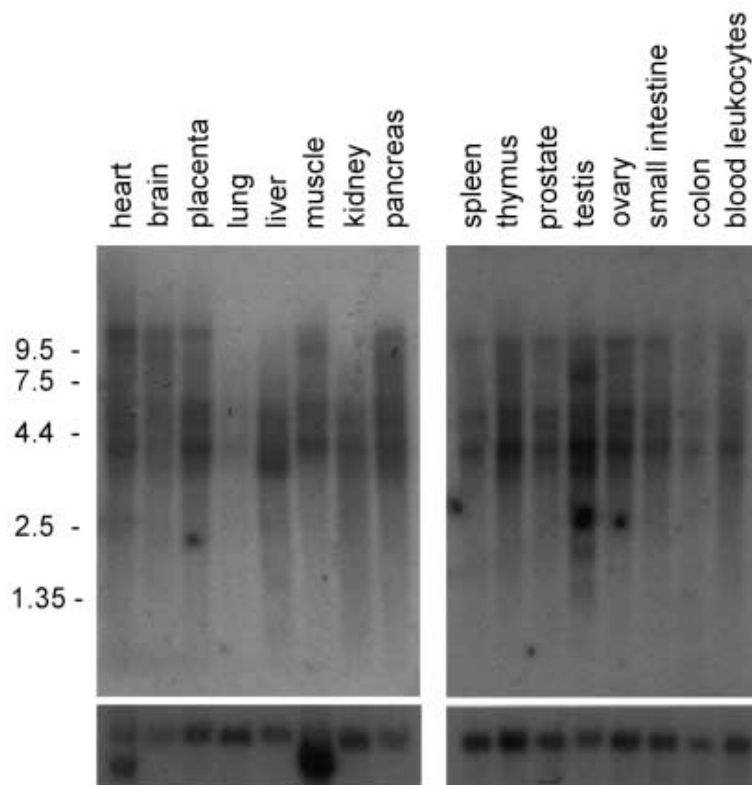
HSA-INV 1	MNKSENLIFAGSSSLASQVHAAAVNGDKGALQRLIVGNSALRDKEDDFGRTPLMYCVLADR
MMU-Inv 1	MNI SEDVLISTGSSSLASQVHAAAVNGDKGALQRLIVGNSALRDKEDDFGRTPLMYCVLADR
HSA-INV 61	LDCADALLKAGADVNTDHSORTALHLAAQKGNRYFMKLLLRANWMMQKDL EEMTPHLH
MMU-Inv 61	VDCADALLKAGADVNTDHSRRTALHLAAQKGNRYFMKLLLRANWMMQKDL EEMTPHLH
HSA-INV 121	ITRHRSPKCLALLLKFMAPGEVDTQDKNKQTALHWSAYYNNPEHVKLLIKHDSNIGIPDV
MMU-Inv 121	STRHRSPKCLALLLKFMAPGEVDTQDKNKQTALHWSAYYNNPEHAKLLIKHDSNIGIPDV
HSA-INV 181	EGKIPLHWAANHKDPSAVHTVRCILDAAPTESLLNWQDYEGRTPLHFAVADGNLTVVDVL
MMU-Inv 181	EGKIPLHWAANHKDPSAVHTVRCILDAAPTESLLNWQDYEGRTPLHFAVADGNLTVVDVL
HSA-INV 241	TSYESCNITSYDNLFRTPLHWAALLGHAQIVHLLLERNKSGTIPSDSQGATPLHYAAQSN
MMU-Inv 241	TSYESCNITSYDNLFRTPLHWAALLGHAQIVHLLLERNKSGTIPSDSQGATPLHYAAQSN
HSA-INV 301	FAETVKVFLKHPVSKDDSDLEGRTSFMWAAGKGSDDVLRMTLSLKSDIDINMADKYGGTA
MMU-Inv 301	FAETVKVFLQHPVSKDDSDLEGRTSFMWAAGKGNDDVLRMTLSLKSDIDINMSDKYGGTA
HSA-INV 361	LHAAALSGHVSTVKLLLENNAAQVDA TDVMKHTPLFRACEMGHKDV IQTLIKGGARVDLVD
MMU-Inv 361	LHAAALSGHVSTVKLLLDNDAQVDA TDVMKHTPLFRACEMGHRDVIQTLIKGGARVDLVD
HSA-INV 421	QDGHSLHWAALGGNADVQCILTIENKINPNVQDYAGRTPLQCAA YGGYINCMAVLMENNA
MMU-Inv 421	QDGHSLHWAALGGNADVQCILTIENKINPNVQDYAGRTPLQCAA YGGYINCMAVLMENNA
HSA-INV 481	DPNIQDKEGRTALHWSCNNGYLDAIKLLLDFAAFPQOMENNEERYTPLDYALLGERHEVI
MMU-Inv 481	DPNIQDKEGRTALHWSCNNGYLDAIKLLLDFAAFPQOMENNEERYTPLDYALLGERHEVI
HSA-INV 541	QFMLEHGALSTAAIQDIAAFKIQAVYKGYKVRKAFDRKRNLLMKHEQLRKDAAAKKREEE
MMU-Inv 541	QFMLEHGALSTAAIQDIAAFKIQAVYKGYKVRKAFDRKRNLLMKHEQLRKDAAAKKREEE
HSA-INV 601	NKRKEAEQOKGR-----RSPDSCRPOALPCLPSTQDVPSPQSRAPSKQPPAGNVAQGPPE
MMU-Inv 601	NKRKEAEQOKGQLDTPPRSHCSSSAPVLPQFPSPQNEGSKQDATPSKQPPASHTVQSPD
HSA-INV 655	PRDSRGSPPGSSLGGALQKEQHVSSDLQGTNSRRPNETAREHSGKQSACVHFRPNEGSDGS
MMU-Inv 661	PEHSR-LPGRCFGRASQGDS--SIDLOGTASRKPSETPIEHCRGPPSACVHFRPWEGGNS
HSA-INV 715	RHPGVPSVEKSRGETAG-DERCAKGKGFVKQFSCIRVAGPDEKGEDSRRAAASLPHPDSH
MMU-Inv 718	KNQGTSSVEKRRGETNCKHRCQEEGPSSARQPLCTGSGRPAEKGEDSSPAVASAQQDHP
HSA-INV 774	WKPSRRHDTPEPKAKCAPQKRRTQELRGGRCSPAGSSRPGSARGEAVHAGONPPHRTPRN
MMU-Inv 778	RKPNKRODRAARPRGASQKRRTHQLR-DRCS PAGSSRPGSAKGEVACADQSSLHRTPRS
HSA-INV 834	KVTQAKLITGGLYSHLPQSTBELRSGARRLETSTLSLSEDFQVSKETDPAPGPLSGQSVNIDL
MMU-Inv 837	KVTQDKLITGGVSSGLPLSTEA SRSGCKO-----LYEDICASPETGVAHGPPGQCMNHL
HSA-INV 894	LPVELRLQTIQRERRRRELFRKNKAAAVIQRAWRSYQLRKHLSHLRHMQLGAGVDVDRW
MMU-Inv 892	LPVEQRLITIQRRSRRELFRKNKAAAVIQRAWRSYQLRKHLSRLHLKQLGAREVLRRC
HSA-INV 954	ROESTALLQVWRKELELKFPTTAVSKAPKSPSKGTSSTKSTKHSVLRQIYGCSEHGKI
MMU-Inv 952	TVQCTALLQVWRKELELKFPSISVSRTSKSPSKGSSATKYARHSVLRQIYGCSEGKGI
HSA-INV 1014	HHFTRSVKASSVLRNLNSVSNLOCIHLENSGRSKNFSYNLQSATQPKNKPK 1064
MMU-Inv 1012	HHFIKSKAPAVLHLSVNSLQSIHLDNSGRSKKFSYNLQPSQSKNKPK 1061

**Abbildung 20 Vergleich der Homologie der Aminosäuren zwischen INV (Mensch) und inv (Maus)**  
**Identische Aminosäuren sind schwarz, ähnliche grau hinterlegt. Die 16 Ankyrin Wiederholungen sind durch horizontale Markierungen gekennzeichnet. Die IQ Domänen sind durch horizontale Markierungen mit geschlossenen Pfeilenden, NLS-BP Domänen durch horizontale Markierungen mit offenen Pfeilenden gekennzeichnet (BLAST Sequence Similarity Search). Zu beachten ist die hohe Konservierung im Bereich der ersten Hälfte der Peptide, die den gesamten Ankyrin Bereich beinhaltet (Schön et al. 2002)**

Das INV-Gen beinhaltet somit eine speziesübergreifende hochkonservierte Funktion

zur Steuerung von Protein-Protein Interaktionen wie sie zum Beispiel bei Transkriptionsfaktoren nachweisbar ist.

In Northern Blots konnte eine Expression des INV-Gens auf einem geringen Niveau in einer Vielzahl von adulten Geweben gezeigt werden. Dies lässt eine Beteiligung des INV-Gens bei der Steuerung von Protein-Protein Interaktion in einer Vielzahl von adulten Geweben vermuten.



**Abbildung 21 Expression von INV in adulten Geweben**  
 Northern Blot von adultem Gewebe hybridisiert mit INV-cDNA Proben. Unterschiedlich starke Banden mit ca. 4kb in nahezu allen Geweben nachweisbar. Die kürzere Bande in der Leber deutet auf eine Splicing-Isoform. Als Kontrolle wurde derselbe Blot mit einer beta-actin Probe hybridisiert. Linksseitig ist die Position der Banden markiert. (Schön et al. 2002)

Eine mögliche Kontrollfunktion des INV-Proteins ist somit nicht auf die Phase der embryonalen Lateralisation beschränkt.

## IQ-Domäne

IQ-Domänen finden sich wiederholt in verschiedenen calmodulin-bindenden Proteinen. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Modulation der Eigenschaft zur Kalziumbindung dieser Proteine und somit für Bedeutung bei der Aktivierung calmodulin-abhängiger Proteine, wie sie zum Beispiel bei der Muskelkontraktion und der Herzscheifenbildung von Bedeutung sind (Putkey et al. 2003) (Putkey et al. 2008).

In Versuchen mit *Xenopus*-Froschembryos, die eine der *inv*-Maus homologe Gen-Sequenz aufweisen, wurde gezeigt, dass die oben genannten Calmodulin-Bindungsstellen (IQ-Domäne) eine wichtige Rolle in der Steuerung der Aktivität von Maus und *Xenopus inv*-Proteinen spielen. Eine fehlende Bindung von Calmodulin im Bereich dieser IQ-Domäne resultiert in einer fehlerhaften Lateralisation (Yasuhiko, et al. 2001) (Yasuhiko et al. 2006).

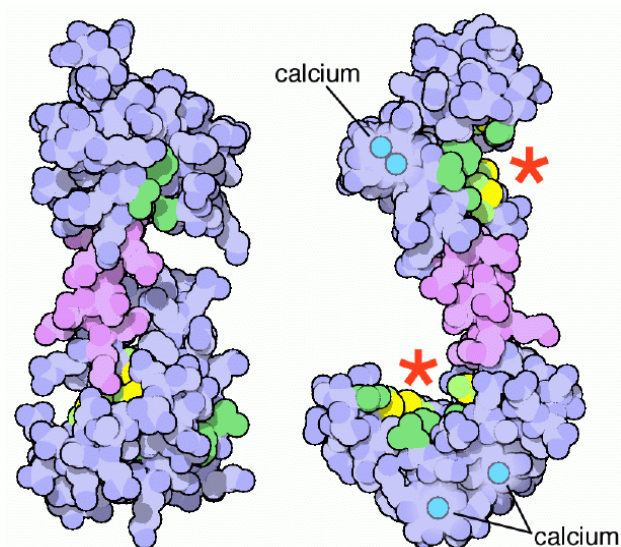
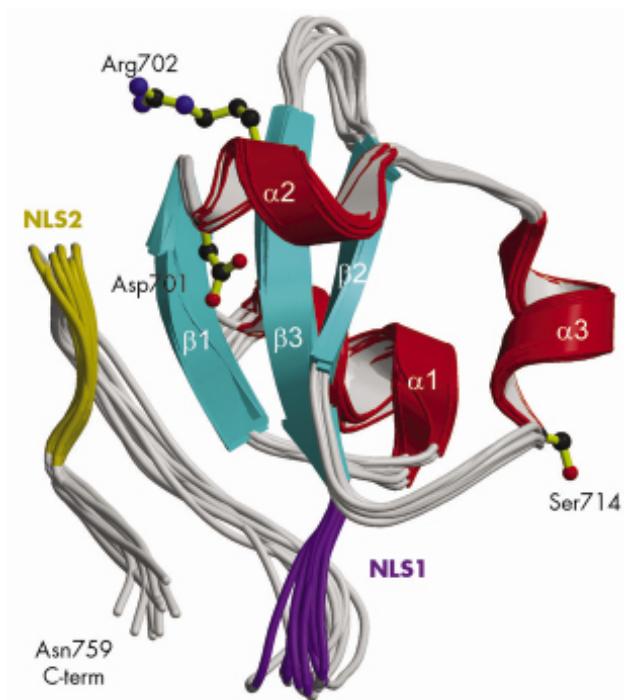


Abbildung 22 Calmodulin (links ohne Ca-Bindung; rechts mit Ca-Bindung; David S. Goodsell of The Scripps Research Institute)



### NLS-BP („nuclear localization signal bipartite“)

NLS-BP Bereiche dienen im Zytoplasma gebildeten Proteinen als Signal für die Einschleusung in den Zellkern. Sie haben somit eine wichtige Funktion für die Einschleusung von z.B. Transkriptionsfaktoren in den Zellkern und somit für die Steuerung von zellulären Prozessen (Benditt et al 1989).



**Abbildung 23 NLS-BP Bindungsstellen NLS1 und NLS2 ("nuclear localization signal bipartite" aus „Structure and nuclear import function of the C-terminal domain of influenza virus polymerase PB2 subunit“, Tarendeau et al)**

Um die Funktion des INV-Gens besser zu verstehen, ist die Durchführung weiterer Experimente, insbesondere die Untersuchung der Funktion und Interaktion mit Bindungspartner (zum Beispiel die Steuerung und Interaktion mit Proteinen bei der Entstehung der Lateralisation) von entscheidender Bedeutung.

## 2. Fragestellung

Die von Yokoyama und Mitarbeitern 1993 erzeugte transgene *inv*-Maus wies bei homozygoten Trägern der *inv*-Mutation auf Chromosom 4 in 90 % der Fälle eine segmentale Diskordanz, nach aktueller Definition als Heterotaxie bezeichnet und in 72 % der Mäuse eine angeborene Herz- und Gefäßfehlbildung auf (Yokoyama et al. 1993). Untersuchungen von Schön und Mitarbeitern 2002 konnten eine Homologie zwischen dem *inv*-Gen der Maus und dem *INV*-Gen des Menschen bis zu 100 % in speziesübergreifend hochkonservierten Bereichen zeigen. Das *INV*-Gen stellt somit einen geeigneten Kandidaten für die Mutationssuche bei Patienten mit Lateralisationsdefekten mit oder ohne angeborene Herz- und Gefäßfehlbildungen dar (Schön et al. 2002).

### Hypothese

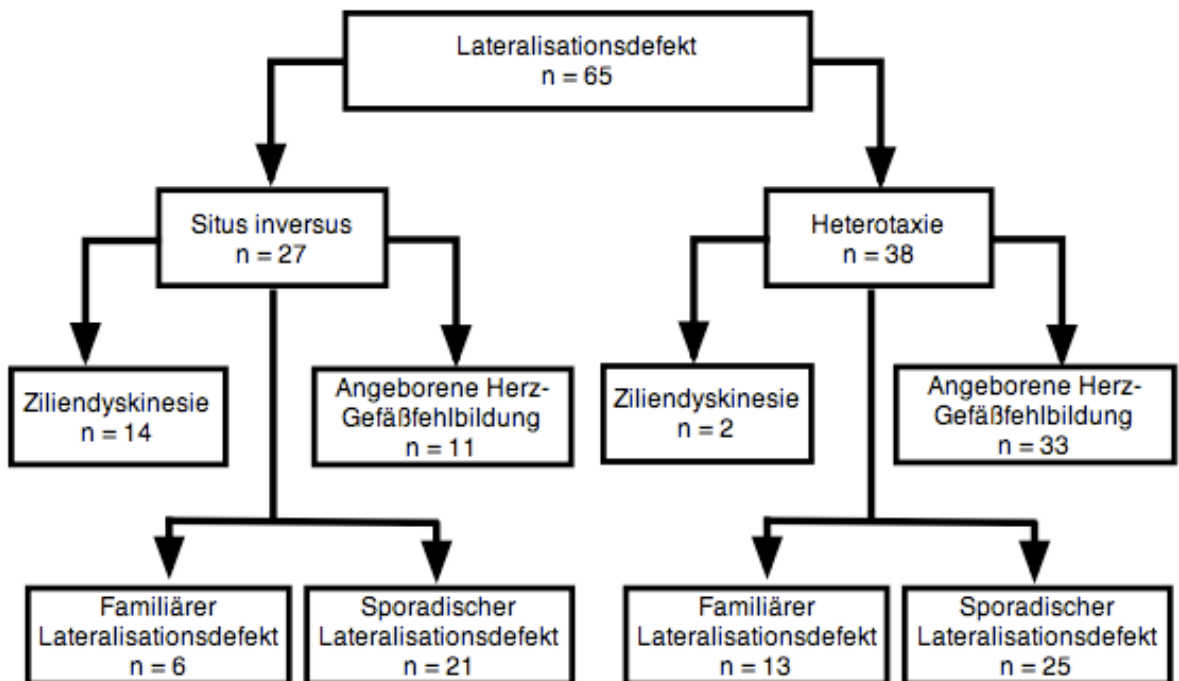
Mutationen im *INV*-Gen des Menschen (Chromosom 9q31) führen zu einer Dysregulation der Lateralisationsentwicklung und resultieren in Lateralisationsdefekten mit oder ohne angeborene Herz- und Gefäßfehlbildungen.

Aufgabenstellung dieser Arbeit war die Extrahierung von DNA und anschließender experimenteller Mutationssuche mittels SSCP und DNA-Sequenzierung im humanen *INV*-Gen des Menschen bei Patienten mit Lateralisationsdefekten mit oder ohne angeborene Herz- und Gefäßfehlbildungen.

### 3. Patienten und Methodik

#### 3.4. Patientengruppe

In die Mutationsanalyse des humanen INV-Gens (Chromosom 9q31) wurden 65 Patienten mit Lateralisationsdefekten eingeschlossen. 19 dieser Patienten (29 %) waren Kinder konsanguiner Eltern, bei weiteren 19 Kindern (29 %) gab es in der Familie mindestens einen zweiten Patienten mit Lateralisationsdefekt. Zusätzlich zu den Lateralisationsdefekten wiesen 44 Patienten (68 %) angeborene Herz- und Gefäßfehlbildungen auf. In 14 Fällen (22 %) bestand eine Kombination von Lateralisationsdefekt und Ziliendyskinesie im Bereich des Respirationsepithels mit Analogie zum Kartagener-Syndrom. Weitere 7 Patienten (11 %) hatten eine Polysplenie in Assoziation mit einer viscerotaxialen Heterotaxie und einer zusätzlichen extrahepatischen Gallengangsatriesie. Bemerkenswerterweise entsprach diese Fehlbildungs-Kombination exakt dem Phänotypus der inv-Maus.



Auf der folgenden Seite sind tabellarisch alle eingeschlossenen Patienten aufgezeigt.

<b>Tabellenlegende</b>	
Pat	Patientennummer
Sex	Geschlecht des Patienten
Kon	Konsanguinität der Eltern
Fam	Familiär auftretender Lateralisationsdefekt
SI	Situs inversus
SD	Segmentale Diskordanz (= Heterotaxie)
Poly	Polysplenie
EGA	Extrahepatische Gallengangsatresie
ZD	Ziliendyskinesie
CHD	Angeborene Herz- und Gefäßfehlbildung
<b>Abkürzungen der assoziierten Fehlbildungen</b>	
ASD	Vorhofseptumdefekt
AVD	Atrio-ventrikuläre Diskordanz
CA	Gemeinsamer Vorhof
CAVSD	Gemeinsame atrio-ventrikuläre Verbindung
CCTGA	Atrio-ventrikuläre und ventrikulo-arterielle Diskordanz
CIV	Gemeinsamer Einlass Ventrikel (gemeinsamer Vorhof + gemeinsames Ostium)
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DIRV	Doppelter Einlass rechter Ventrikel
DILV	Doppelter Einlass linker Ventrikel
DORV	Doppelter Auslass rechter Ventrikel
HLH	Hypoplastisches Linksherz
LPSVC	Links persistierende obere Hohlvene
MA	Mitralklappenatresie
MGA	Malpositionsstellung der großen Gefäße
PA	Pulmonalklappenatresie
PAPVC	Inkomplette Lungenvenenfehlkonnektion
PFO	Persistierendes Foramen ovale
PS	Pulmonalklappenstenose
ReAoBo	Rechter Aortenbogen
SV	Singulärer Ventrikel
SVC	Obere Hohlvene
TA	Trikuspidalklappenatresie
TAPVC	Totale Lungenvenenfehlkonnektion
TGA	Komplette Transposition der großen Gefäße
VAD	Ventrikulo-arterielle Diskordanz
VSD	Ventrikelseptumdefekt

**Tabelle 6 Tabellenlegende Patientengruppe**

Mutationsanalyse des INV-Gens bei Patienten mit Lateralisationsdefekten

Pat	Sex	Kon	Fam	Situs		Poly	EGA	ZD	CHD	Beschreibung der assoziierten Fehlbildungen
				SI	SD					
1	w	+	+	+	-	-	-	-	+	TGA, VSD, PFO, Dextrokardie
2	m	+	+	+	-	-	-	-	+	PAPVC, ASD, VSD
3	m	+	-	+	-	-	-	+	-	Kartagener Syndrom
4	m	+	-	+	-	-	-	+	-	Kartagener Syndrom
5	m	-	-	-	+	-	-	-	+	TGA, VSD, PFO
6	m	-	-	+	-	-	-	-	+	ASD, VSD
7	m	-	-	+	-	-	-	+	-	Kartagener Syndrom
8	m	+	-	-	+	-	-	-	+	CAVSD, atrialer Rechtsisomerismus, Asplenie
9	w	-	-	+	-	-	-	+	-	Kartagener Syndrom
10	w	-	-	-	+	-	-	-	+	CCTGA
11	w	-	-	+	-	-	-	+	-	Kartagener Syndrom
12	w	-	-	-	+	-	-	-	+	CA, PA, Dextrocardie
13	m	-	-	-	+	-	-	-	+	TGA, PA
14	m	-	-	+	-	-	-	-	+	MA, SV, PA
15	w	+	-	-	+	-	-	-	-	Rechtsisomerismus, Asplenie
16	m	+	-	-	+	-	-	-	-	Rechtsisomerismus, Asplenie, Dextrocardie
17	w	-	+	-	+	+	+	-	-	Polysplenie, extrahepatische Gallengangsatresie
18	w	-	-	-	+	+	+	-	+	TAPVC, extrahepatische Gallengangsatresie, Polysplenie
19	m	-	-	-	+	-	-	-	+	TGA, Dextrocardie
20	w	-	-	-	+	-	-	-	+	TGA, Dextrocardie
21	m	-	-	-	+	-	-	-	-	Rechtsisomerismus, Asplenie
22	m	-	-	-	+	-	-	-	-	Rechtsisomerismus, Asplenie
23	m	-	-	-	+	-	-	-	+	VSD, Rechtsisomerismus, Asplenie
24	m	-	-	-	+	+	+	-	+	VSD, DORV, MGA, extrahepatische Gallengangsatresie, PS, Polysplenie
25	w	+	-	-	+	-	-	-	+	MA, SV, DORV, atrialer Linksisomerismus
26	w	-	+	-	+	-	-	-	+	CA, MA, VSD, HLH, bilaterale obere Hohlvene, TGA, Rechtsisomerismus, Asplenie
27	m	+	+	-	+	-	-	-	+	CA, AVD, VAD, VSD, TGA, Rechtsisomerismus, Asplenie
28	w	-	-	+	-	-	-	+	-	Kartagener Syndrom
29	w	-	-	-	+	-	-	-	+	CA, Dextrocardie
30	w	-	-	-	+	+	+	-	+	PA, V. azygos, Linksisomerismus, Polysplenie
31	m	-	-	+	-	-	-	-	+	ASD, VSD, Dextrocardie
32	w	-	-	-	+	-	-	+	+	CIV, HLH, TAPVC, Dextrocardie, Asplenie, Ziliendyskinesie
33	m	-	+	-	+	+	+	-	+	CIV, DORV, V. azygos, Polysplenie

Patienten und Methodik

Pat	Sex	Kon	Fam	Situs		Poly	EGA	ZD	CHD	Beschreibung der assoziierten Fehlbildungen
				SI	SD					
34	m	-	+	-	+	-	-	-	+	CCTGA, TGA, PA, Dextrocardie
35	m	+	-	+	-	-	-	-	+	DCM, chron. Sinusitis/Bronchitis, Ziliendyskinesie ?
36	m	-	-	-	+	-	-	-	+	Dextrocardie, Rechtsisomerismus, Asplenie
37	w	+	+	-	+	-	-	-	+	CA, AVD, VSD, TA, LPSVC, TGA, V. azygos
38	w	-	+	-	+	-	-	-	+	VSD, LPSVC + SVC, DORV + MGA, Dextrocardie
39	w	-	+	-	+	+	+	-	+	CIV, SV, V. azygos, Polysplenie, extrahepatische Gallengangsatresie
40	w	-	-	+	-	-	-	-	+	DILV
41	w	-	+	+	-	-	-	-	+	Dextrocardie, VSD
42	w	-	-	+	-	-	-	-	+	CIV, PA, Dextrocardie
43	m	+	+	-	+	+	+	-	+	CA, SV, TGA, PA, V. azygos, Linksisomerismus, Polysplenie
44	w	+	+	-	+	-	-	-	+	MA, SV, TGA, PA, LPSVC, Rechtsisomerismus, Asplenie
45	m	+	-	+	-	-	-	+	-	Kartagener Syndrom
46	w	-	-	-	+	-	-	-	+	ASD, VSD, TGA, PA
47	m	-	-	-	+	-	-	+	+	SV, TGA, PS, Dextrocardie, Ziliendyskinesie
48	m	-	-	+	-	-	-	+	-	Kartagener Syndrom
49	w	-	-	+	-	-	-	-	-	chron. Sinusitis / Bronchitis, Ziliendyskinesie ?
50	w	-	-	-	+	-	-	-	+	ReAoBo, ASD, CCTGA, VSD, MA, HLH, PS
51	m	+	+	+	-	-	-	+	-	Kartagener Syndrom
52	w	-	+	+	-	-	-	+	-	Kartagener Syndrom
53	m	-	-	+	-	-	-	+	-	Kartagener Syndrom
54	w	-	+	-	+	-	-	-	+	CA, DIRV, PS, ReAoBo, Dextrocardie
55	w	+	+	-	+	-	-	-	+	ASD, CA, AVD, ventrikulo-arterielle Konkordanz, VSD, PS, V. azygos, Dextrocardie
56	m	-	-	-	+	-	-	-	+	CIV, TGA
57	m	-	-	-	+	-	-	-	+	ASD, PS, TGA
58	m	-	-	+	-	-	-	-	-	chron. Sinusitis / Bronchitis, Ziliendyskinesie ?
59	m	-	-	+	-	-	-	-	+	SV
60	w	-	+	+	-	-	-	-	+	Dextrocardie, SV
61	w	-	+	-	+	-	-	-	+	SV, PA, TGA
62	w	+	-	+	-	-	-	-	-	chron. Sinusitis / Bronchitis, Ziliendyskinesie ?
63	m	+	-	+	-	-	-	+	-	Kartagener Syndrom
64	w	-	-	+	-	-	-	-	-	chron. Sinusitis / Bronchitis, Ziliendyskinesie ?
65	m	+	-	-	+	-	-	-	+	ASD, DORV, MGA, VSD, PS

Tabelle 7 Patientengruppe

## 3.5. Material und Methodik

### 3.5.1. Isolierung des genetischen Materials

#### 3.5.1.1. Desoxyribonukleinsäure (DNA)

##### Blutproben der Patienten

Unter sterilen Bedingungen Entnahme von heparinisiertem Vollblut, 5ml bei Kindern, 10ml bei Erwachsenen. Versand der Blutproben in Röhrchen mit Leibovitz L-15 Medium der Firma GIBCO-BRL mittels Sonderkurieren innerhalb von 48 Stunden an das Labor von Dr. Patrice Bouvagnet, Lyon, Frankreich. Die weitere Verarbeitung der Blutproben erfolgte im Labor von Dr. P. Bouvagnet unter seiner Anleitung.

##### Isolierung der DNA

###### Abtrennen des Serum

Zentrifugieren des Vollbluts bei 2000 U/min für 5 Minuten, Serumüberstand abpipettieren und verwerfen.

###### Lysierung der roten Blutkörperchen

- Lysierung der roten Blutkörperchen durch Zugabe von LRB (= Lösung zur Lysierung der roten Blutkörperchen; *Angaben beziehen sich auf die Herstellung von 1000 ml LRB*)
- 10 ml 1 molaren Tris-Puffers (pH=7,6)
- 5 ml 1 molarer MgCl<sub>2</sub> – Lösung
- 3,3ml 3 molarer NaCl-Lösung zusammengeben und mit H<sub>2</sub>O auf 1000 ml auffüllen
- Nach Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes 25 ml der LRB zur verbleibenden festen Phase hinzufügen und vermengen
- Nach 10 Minuten Inkubationszeit 10 Minuten bei 2000 U/min zentrifugieren hämolytischen Überstand abpipettieren und das verbliebene Präzipitat mit 15 ml LBR resuspendieren. Zentrifugation für 5 Minuten bei 2000 U/min, erneut abpipettieren des Überstandes und Resuspension des Präzipitats in 1 ml LRB

### Lysierung der weißen Blutkörperchen

- Nach Lysierung und Entfernung der roten Blutkörperchen folgte die Lysierung der weißen Blutkörperchen und somit Freisetzung der Desoxyribonukleinsäuren.
- Die Lysierung der weißen Blutkörperchen erfolgte durch Zugabe einer zweiten Lysierungslösung (Lösung zur Lysierung der weißen Blutkörperchen = LWB; *Angaben beziehen sich auf die Herstellung von 250 ml LWB*)
- 2,5 ml 1 molaren Tris-Puffers (pH=7,6)
- 5 ml 0,5 molarer EDTA-Lösung,
- 4,2 ml 3 molarer NaCl-Lösung
- 5 ml 10%iger SDS zusammengeben und mit H<sub>2</sub>O auf 250 ml auffüllen
- Zu oben genanntem resuspendiertem Präzipitat 10ml LWB sowie 0,4 ml Proteinase K (10 mg/ml) hinzugeben.
- Durchmischung für 12 Stunden mit elektronischer Wippe bei 37°C.

### Ausfällung der Proteine

- Nach Durchmischung der oben genannten Suspension hinzufügen von Phenol im Verhältnis 1:1 und mittels elektrischem Rührstäbchen für 15 Minuten mischen. Anschliessend Zentrifugation bei 3000 U/min für 5 Minuten.
- Durch die Zentrifugation entstehen drei Phasen:
- obere Phase enthält DNA
- mittlere Phase enthält extrahiertes Protein
- untere Phase enthält Phenol
- Abpipettieren der oberen Phase und erneute Suspension der enthaltenen DNA in 5 ml Phenol und 1 ml Sevaq (1000 ml Sevaq = 960 Chloroform + 40 ml Isoamylalkohol 100 %)
- Mischen der Suspension mittels Rührstäbchen für 15 Minuten, zentrifugieren mit 3000 U/min für 5 Minuten, anschließend abpipettieren der oberen DNA-haltigen Phase
- Wiederholung der genannten Schritte bis nach dem Zentrifugieren keine mittlere Phase mehr zu erkennen ist und die Proteine vollständig eliminiert sind
- DNA-haltige Phase erneut abpipettieren, 10 ml Sevaq hinzufügen, mittels Rührstäbchen für 10 Minuten durchmischen, 5 Minuten mit 3000 U/min zentrifugieren und die obere Phase abpipettieren (hierdurch werden restliche Phenol Bestandteile aus der DNA-Phase entfernt)



#### Präzipitation der DNA

- Nach Isolierung der DNA Zugabe von 500  $\mu$ l 3 molarer NaCl-Lösung und 20 ml 100 % Ethanol. Durch vorsichtige Durchmischung kommt es zum sichtbaren Ausfallen der DNA
- Ausgefällene DNA mittels Pipette vorsichtig ansaugen und in 3 ml 70 % Ethanol geben. Vorsichtiges Durchmischen und Entfernen der DNA mittels Pipette aus dem Ethanol und Überführung in ein leeres Eppendorf-Röhrchen. Das restliche Ethanol verdunstet aus dem offenen Eppendorf-Röhrchen. Gefällte DNA niemals völlig trocknen lassen, weil sie danach kaum wieder in wässrigen Lösungen aufgenommen werden kann.

#### Resuspension der DNA

- Die isolierte und gereinigte DNA in 500  $\mu$ l TE-Puffer 10x resuspendieren (Lagerung der DNA in Wasser führt zur Hydrolyse) und anschließend für 48 Stunden mittels elektrischem Rotor vorsichtig vollständig in Lösung bringen; *Angaben beziehen sich auf die Herstellung eines TE-Puffers 10x*
- 100 ml 1 molarem Tris-Puffers
- 20 ml 0,5 molarer EDTA-Lösung.
- Nach Vermischung der beiden Flüssigkeiten, das Gemisch mit Hilfe von HCl und eines pH-Meters auf einen pH-Wert von 8,0 einstellen.
- Quantifikation der DNA
- Die DNA-Konzentration wird mittels Photometer bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen (260 nm, 280 nm) bestimmt.
- Hinzugeben von 5  $\mu$ l DNA-Lösung in 1 ml H<sub>2</sub>O (Verdünnung 1:200), messen der optischen Dichte mit 260 nm und 280 nm. Durch die Berechnung des Quotienten zwischen der Dichte bei 260 nm und 280 nm kann eine Verunreinigung der DNA-Lösung ausgeschlossen werden (Quotient kleiner 1,8 = Verunreinigung durch Proteine).
- Eine Einheit der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht einer Konzentration der DNA in der untersuchten Lösung von 50  $\mu$ g/ml.

Rechenbeispiel:

Wellenlänge:            260 nm                    280 nm

Messwert:                0,118                        0,063

Der Quotient aus beiden Messung beträgt 1,87, eine Verunreinigung durch Proteine ist ausgeschlossen die Bestimmung der DNA-Konzentration kann durchgeführt werden.

1 Einheit                = 50 µg/ml

0,118 Einheiten        = 5,9µg/ml (bei einer Verdünnung von 1:200)

Konzentration der DNA-Lösung = 5,9µg/ml \* 200 = 1180 µg/ml

DNA-Konzentration: 1,18 mg/ml

Die Stammlösung der DNA, aus der die Probe für die Messung entnommen wurde, wird bei einer Temperatur von – 20°C gelagert.

### 3.5.1.2. Ribonukleinsäure (RNA)

#### Lymphozytenkulturen

Neben der Gewinnung von DNA wurden bei ausreichender Menge an verfügbarem Vollblut zusätzlich Lymphozytenkulturen für die Gewinnung von RNA gezüchtet.

#### Isolierung der Lymphozyten

- In steriler Umgebung werden mittels Pipette 5 ml Vollblut mit 5 ml 1 molarer NaCl-Lösung gemischt und das Gemisch vorsichtig auf eine Phase von 4 ml MSL (= Ficoll hypag) gegeben. Anschließend Zentrifugation mit 1700 U/min für 30 Minuten.
- Durch das Zentrifugieren entstehen 4 Phasen:
  - oberste Phase: Serum
  - obere-mittlere Phase: Lymphozyten
  - untere-mittlere Phase: MSL
  - unterste Phase: Erythrozyten
- Lymphozytenschicht vorsichtig abpipettieren ohne Flüssigkeit aus einer anderen Schicht in die Pipette mit aufzunehmen. Zu den Lymphozyten 15 ml L-15 Medium hinzufügen, das Gemisch für 10 Minuten bei 1500 U/min zentrifugieren, den Überstand verwerfen, erneut 5 ml L-15 Medium hinzugefügen und für 10 Minuten, diesmal mit 1000 U/min zentrifugieren. Den Überstand vorsichtig abpipettieren und mittels 5 ml RPMI-X resuspendieren.
- Zur Herstellung von RPMI-X benötigt man folgende Substanzen:
  - 40 ml RPMI 1640
  - 10 ml SVF (Kälberserum)
  - 0,5 ml 2millimolares L-Glutamin
  - 0,5 ml von 10.000 U/ml Penicillin und
  - 0,5 ml von 10 mg/ml Streptomycin
- Alle Substanzen zusammengenommen und mischen. Als Nährmedium für die Lymphozyten dient das zugegebene Kälberserum SVF. Anschließend 0,5 ml einer Epstein-Barr-Virus-Suspension B 95,8 hinzufügen (B 95,8 ist die Bezeichnung einer Nierenzelllinie von Pinseläffchen, aus der die Epstein-Barr-Viren isoliert werden).
- Abschließend 1,6 ml der hergestellten Lösung mit einer Pipette entnehmen und jeweils 0,2 ml in 8 Löcher einer 96-Löcher-Platte eingefügen.

### Impfen mit Epstein – Barr - Virus

- Das Impfen der Lymphozytenkulturen mit Epstein-Barr-Viren führt zur Aktivierung eines Onkogen innerhalb der Lymphozyten-DNA, wodurch eine beschleunigte Vermehrung der Lymphozyten resultiert und das Absterben der Zelle verhindert wird.
- Nachtrag: nach Abschluß der experimentellen Arbeit wurde das Beimpfen von Lymphozytenkulturen mit Epstein-Barr Viren nicht mehr im Labor von Dr. P. Bouvagnet angewendet, nachdem es zu nicht reproduzierbaren Polymorphismen in der isolierten mit EBV vorbehandelten RNA gekommen war.

### Zellkulturen

- Die befüllte 96-Loch-Kulturplatte sowie der Rest der Lösung werden bei 37° C in einem Inkubatorschrank mit 5% CO<sub>2</sub> angereicherter Luft für sieben Tage inkubiert. Das Wachstum der Kultur wird regelmäßig kontrolliert. Eine Färbung (rosa) des Kulturmediums, erzeugt durch den enthaltenen Phenolphthalein Indikator, zeigt den geforderten alkalischen pH-Wert der Kultur an. Eine erneute Entfärbung des Kulturmediums bestätigt die Bildung saurer Stoffwechselprodukte der Zellen, eine Übersäuerung wird durch die CO<sub>2</sub> angereicherte Luft und einer dadurch möglichen Pufferung durch Bikarbonat-Bildung verhindert.
- Bei ungestörter Vermehrung der Lymphozyten kann innerhalb von einigen Tagen mikroskopisch eine Clusterbildung (Fibrin und T-Lymphozyten Cluster) nachgewiesen werden.
- Eine Anzahl von 4000 bis 8000 Lymphozyten pro mm<sup>3</sup> stellen optimale Wachstumsbedingungen dar, bei stärkerem Wachstum ist es erforderlich, die Lymphozyten in grössere Loch-Platten zu transferieren. Nach Abschluss der Proliferationsphase der Lymphozyten können diese tiefgefroren gelagert oder unverzüglich für die RNA-Extraktion verwendet werden.

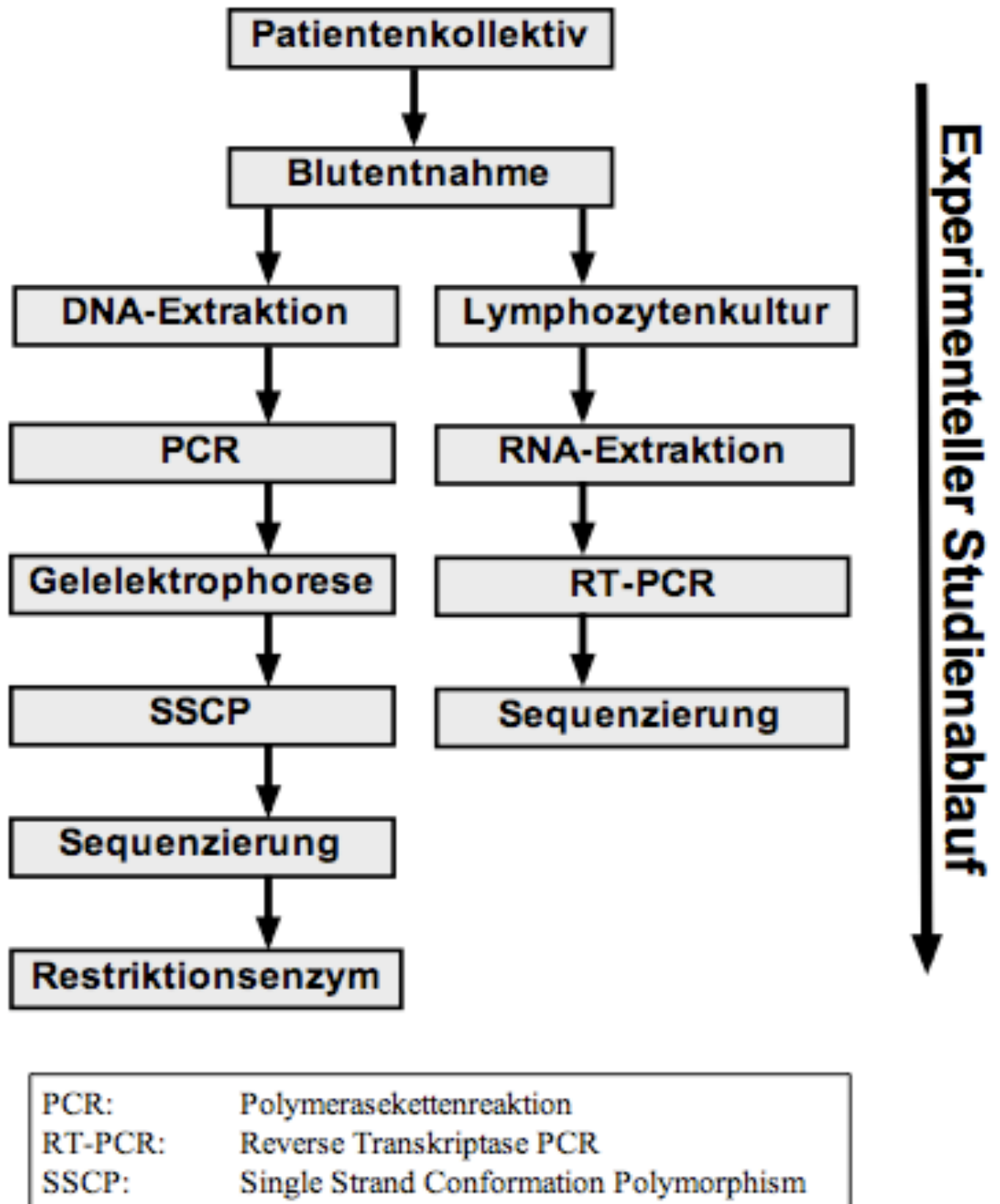


Abbildung 24 Experimenteller Studienablauf

## Mutationscreening

### 3.5.1.3.DNA-Mutationscreening

#### Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht es *in vitro* von bestimmten Nukleotidsequenzen enzymatisch millionenfache Kopien herzustellen. Durch diesen als Amplifikation bezeichneten Vorgang ist es möglich, auch sehr geringe Mengen von DNA einer Analyse zugänglich zu machen.

Zur Durchführung einer PCR benötigt man neben der DNA des zu untersuchenden Probanden und den beiden Oligonucleotid-Primern die den zu untersuchenden Bereich von beiden Seiten flankieren, ein Gemisch aller Desoxynucleotidtriphosphate, das Enzym Taq-Polymerase sowie den von dem jeweiligen Hersteller mitgelieferten 10 X Puffer. Außerdem kann es erforderlich sein, Magnesiumchlorid zuzugeben. Zur Durchführung wird ein Thermocycler verwendet. Die Analyse der Produkte erfordert geeignete Gelelektrophorese-Systeme (die genaue Zusammensetzung der einzelnen für die Durchführung einer PCR notwendigen Substanzen muss für jedes Labor getestet und dann in einem entsprechenden Protokoll festgehalten werden).

#### Durchführung einer Polymerase-Kettenreaktion

Ein PCR-Zyklus beginnt mit der thermischen Denaturierung des zu amplifizierenden DNA-Doppelstranges, indem bei etwa 90-94°C die zu amplifizierende DNA aufgeschmolzen wird. Es entstehen einzelsträngige DNA-Matrizenmoleküle. Danach erfolgt die Primer-Hybridisierung an die einzelsträngige DNA, hierbei binden sich die zuvor synthetisch hergestellten Oligonucleotide (Primer) bei Temperaturen von etwa 50°C an die komplementären Sequenzen der Matrizen-DNA. Auf diesem Weg wird die Amplifikation des dazwischen gelegenen Sequenzabschnittes eingeleitet, die normalerweise bei 72°C durch das Enzym Taq-Polymerase erfolgt. Durchgeführt werden diese Zyklen in Thermocyclern, wobei die jeweilige Temperatur und Zeit pro Reaktionsschritt sowie die Zyklenzahl individuell programmierbar sind (eine detailliertere Beschreibung findet sich in der entsprechenden Fachliteratur).

## Gelelektrophorese

Die Durchführung der Gelelektrophorese erfolgte mittels Agarosegel.

### Herstellung eines Agarose-Gels

- Agarose (Menge richtet sich nach der gewünschten Dichte des Gels, wobei höherprozentige Gele kleine Amplifikationsprodukte und niedrigprozentige Gele große Amplifikationsprodukte besser aufzutrennen vermögen)
- TAE-Puffer 1x
- Zusammenfügen beider Substanzen
- Erhitzen des Gemisches
- Zumischung von Ethylenbromid zum abkühlenden Gemisch
- Einführen des flüssigen Gemisches in Gelelektrophoresegefäß
- Abkühlen und Erstarren der Flüssigkeit

Rechenbeispiel: Es ist erforderlich 50 ml eines 1,2 %igen Agarosegels anzufertigen:  
 $50 \text{ ml} * 0,012 = 0,6 \text{ g Agarosegel} + 50 \text{ ml TAE 1x}$

- Mischen der PCR-Proben mit Färbelösung (Bromophenol)
- Auffüllen der Gelkammer mit TAE 1X Puffer
- Hinzufügen von Bromophenol in TAE 1X Puffer
- Eingabe des PCR-Färbelösung-Proben-Gemisches in die Gelelektrophoresetaschen
- Anlegen einer elektrischen Spannung an die Gelelektrophoresekammer (DNA wandert von Minus nach Plus)
- Kontrolle der Amplifikationsprodukte mittels UV-Licht

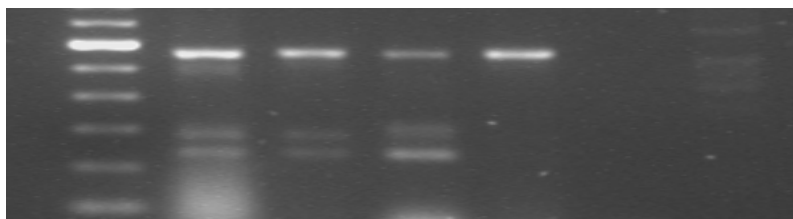


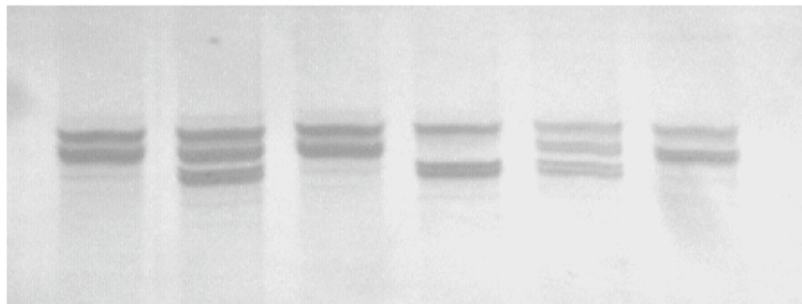
Abbildung 25 Agarose Gelelektrophorese

## Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)

Diese Technik ermöglicht die Untersuchung der DNA auf kleinere Mutationen bis zur Punktmutation. Bei dieser Methode wird die DNA thermisch denaturiert, wodurch es zu einer von der Nukleotidsequenz abhängigen räumlichen Anordnung (Konformation) des Einzelstranges kommt. In einer anschließenden Auftrennung der Einzelstränge in einem Polyacrylamidgel richtet sich die Laufgeschwindigkeit nach der räumlichen Konformation und somit nach der Nukleotidsequenz des Einzelstranges. Um die Sensitivität dieser Methode noch zu erhöhen, führt man die Auftrennung im Polyacrylamidgel bei unterschiedlichen Temperaturen durch, da auch die Temperatur einen Einfluß auf die räumliche Anordnung des DNA-Einzelstranges hat.

### Durchführung einer SSCP

- Amplifikation der DNA mittels PCR



**Abbildung 26 SSCP Polyacrylamid Gel**

- Kontrolle des Amplifikationsproduktes mit Gelelektrophorese
- Füllen der Gelelektrophoresetaschen mit „loading-buffer“ (siehe unten)
- Thermische Denaturierung der amplifizierten DNA (Denaturierung bei 95°C für 5 Minuten, anschliessend Lagerung auf Eis für 15 Minuten)
- Hinzufügen der Amplifikationsprodukte in die Gelelektrophoresetaschen
- Als „loading-buffer“ stehen zwei Substanzen zur Verfügung:
  - Blau-SSCP
  - Formamid 1 X



Herstellung eines Polyacrylamidgels für die Verwendung im Mighty Small Gel Caster von der Firma Amersham Pharmacia Biotech

- H<sub>2</sub>O 8 ml
- Acrylamid 40% 3,15 ml
- TBE Puffer 10X 1,25 ml
- (Vorsicht: Acrylamid ist neurotoxisch, deshalb bei der Verwendung unbedingt Hautkontakt sowie Inhalation vermeiden!)
- Das Polymerisationsgemisch durch einen Milliporefilter geben, um vorhandene Blasen zu entfernen und anschließend folgende Substanzen hinzufügen, um die Polymerisation einzuleiten:
- APS 10% 87,5 µl (Initiator der Polymerisation)
- Temed 10 µl (Katalysator der Reaktion)
- Polymerisationsgemisch zügig in die Gelkammer einbringen, Bläschenbildung vermeiden. Nach dem Abschluß der Polymerisation, Gele in die SSCP-Kammern transferieren und die denaturierte DNA in die Probenkammern einfüllen. Anlegen der Spannung um die Migration zu beginnen.
- Nach Ablauf der Migrationszeit, Gele aus den SSCP-Kammern entfernen.

#### Silberfärbung

- Zur Fixation der DNA-Banden Einlegen der Gele in 10 %ige Essigsäure für 20 Minuten
- Anfärbung der DNA-Banden mittels „silver-staining-kit“ von der Firma Promega. Für die Herstellung der Färbeflüssigkeit werden folgende Stoffe benötigt:
- Silbernitrat 0,5 g
- Formaldehyd 37 % 0,75 ml
- H<sub>2</sub>O destilliert 500 ml
- (Achtung: Lichteinfall führt zur Schwärzung der Lösung, Aufbewahrung in lichtgeschütztem Behältnis)
- Herstellung der Entwicklerflüssigkeit:
- Natriumkarbonat 3 g
- H<sub>2</sub>O dest. 100 ml
- Formaldehyd 37 % 0,15 ml
- Natriumthiosulfat 20 µl
- Nach Abschluß der DNA-Fixation in Essigsäure 10 %, Gele dreimal für jeweils 2 Minuten mit destilliertem H<sub>2</sub>O waschen und anschließend für 30 Minuten in die Färbelösung einbringen. Anschließend erneut zweimal für jeweils 10-15 Sekunden waschen und Gele in eisgekühlte Entwicklerflüssigkeit einbringen. Sobald die DNA-Banden deutlich sichtbar sind, Reaktion mittels Essigsäure 10 % stoppen. Abschliessend dreimal für je 2 Minuten mit destilliertem H<sub>2</sub>O waschen. Die sehr empfindlichen Gele werden mit Celuphanfolie versiegelt und getrocknet, um die Haltbarkeit zu verlängern.

## DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung ermöglicht die Darstellung der Nukleotidsequenz eines DNA-Abschnittes. Diese ermöglicht die Untersuchung der Erbinformation auf einzelne Nukleotidveränderungen, die bei anderen Mutationsscreeningverfahren nicht erkannt werden können.

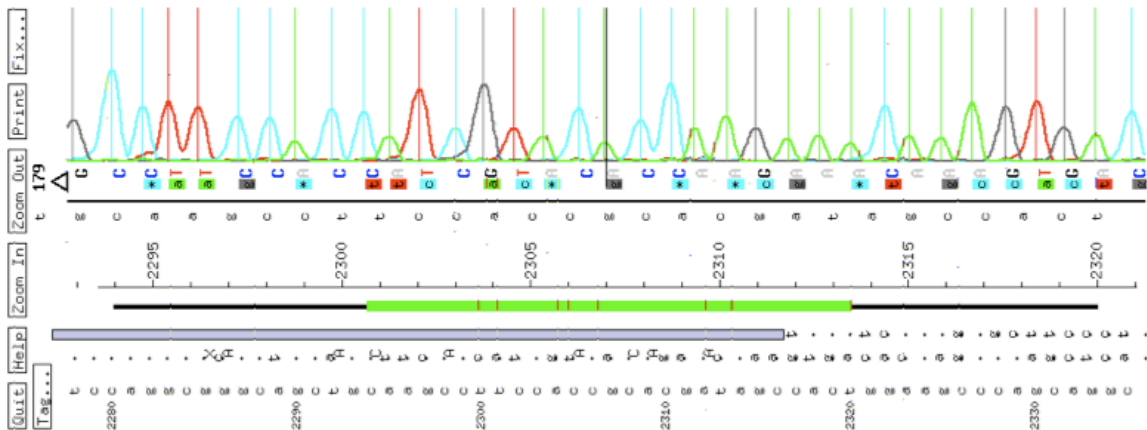


Abbildung 27 Beispiel einer DNA-Sequenzierung

Die Vorbereitung der DNA-Sequenzierung erfolgt heutzutage mittels kommerzieller Sequenzierungs-Kits.

### Durchführung einer DNA-Sequenzierung

- Durchführung einer PCR
- 40µl des PCR-Produktes mit 200µl PB-Puffers in einem Quiagen-Röhrchen zusammenfügen (das Röhrchen sowie die benötigten Puffer werden mit dem Sequenzierungs-Kit, in diesem Fall von der Firma Quiagen, mitgeliefert)
- Röhrchen in ein geeignetes Eppendorfgefäß stellen und für 1 Minute bei 14000 U/min zentrifugieren
- Die abzentrifugierte Flüssigkeit verwerfen und 750µl des PE-Puffers in das Quiagen-Röhrchen geben

- 
- Erneut für 1 Minute bei 14000 U/min zentrifugieren und die abzentrifugierte Flüssigkeit verwerfen (da 750µl die maximale Aufnahmekapazität des Quiagen-Röhrchens darstellen wird in diesem Schritt erneut für 1 Minute bei 14000 U/min zentrifugiert, um sicherstellen zu können, dass der gesamte Puffer aus dem Quiagen-Röhrchen entfernt wurde). Mit Hilfe dieser Schritte wird die DNA im Filter des Quiagen-Röhrchens gebunden, während störende Nebenprodukte wie einzelne Nukleotide oder Proteine ausgewaschen werden
- Quiagen-Röhrchen in eine neue große Eppendorf-Küvette stellen
- 30µl destilliertes Wasser in die Mitte des Quiagen-Röhrchens applizieren und für 1 Minute bei 14000 U/min zentrifugieren (durch diesen Schritt wird die am Filter gebundene DNA gelöst und gelangt mit dem destilliertem Wasser in das Auffangröhrchen)
- Quiagen-Röhrchen verwerfen und die in der Eppendorfküvette enthaltene gereinigte DNA lagern

Vor Durchführung der Sequenzierungsreaktion wird die Konzentration der DNA-Lösung bestimmt. Zur Eichung wird eine Nulllösung hergestellt.

### Herstellung der Nulllösung

- 100 ml Nulllösung = 90 ml destilliertes Wassers + 10 ml 10x TNE-Puffers + 10 µl Stammlösung (in unserem Fall H 33258 von Hoefer; Stammlösung enthält nach Angaben des Herstellers 0,2 molares NaCl, 10 millimolares Tris-Cl, 1millimolares EDTA, bei einem pH-Wert von 7,4. Die Nulllösung ist nicht sehr stabil und sollte deshalb nur in kleinen Mengen angefertigt und anschließend im Kühlschrank max. 24 – 48 Stunden gelagert werden).

### Eichung und Bestimmung der DNA-Konzentration

- 2 ml Nulllösung in eine Meßküvette geben und Nullpunkt des Messgerätes bestimmen
- hinzugeben von 2 µl Standardlösung (100 ng/µl) in die 2 ml Nulllösung und Eichung des Messgerätes auf 100 ng/µl
- Erneute Nullpunktbestimmung mittels Nulllösung
- hinzugeben von 2 µl DNA-Probe in die Nulllösung und Bestimmung der Konzentration

Für die Sequenzierungsreaktion wird die Konzentration der DNA durch eine Sequenzierungs-PCR nochmals erhöht.

#### Durchführung einer Sequenzierung-PCR

- in einem PCR-Röhrchen mischen: 1  $\mu$ l des 3,2 pikomolaren Primers + 4  $\mu$ l des mitgelieferten „Premix“ + Probe der DNA in einer Gesamtmenge von 100 ng, Auffüllen auf eine Gesamtmenge von 20  $\mu$ l pro Röhrchen mit destilliertem Wasser (bei der Durchführung der Sequenzierungs-PCR fügt man im Gegensatz zu einer normalen PCR nur jeweils einen Primer, also den „forward“ oder „reward“ Primer, pro Röhrchen hinzu. Für jede DNA-Probe entstehen so zwei Röhrchen mit je einem Primer)
- Durchführung der PCR mit folgendem Programm: 25 Zyklen mit jeweils 1 Minute bei 96°C, 1 Minute bei 50°C und 4,5 Minuten bei 60°C.
- Nach Abschluß der Sequenzierungs-PCR hinzufügen von 50  $\mu$ l 95 %igen Ethanol sowie 2  $\mu$ l 3 molaren Natrium-Azetats in jedes PCR-Röhrchen
- Inkubation für 10 Minuten in Eis
- Nach Abschluß der Inkubation, 20 Minuten bei 14000 U/min zentrifugieren
- Überstand abpipettieren
- 250  $\mu$ l 70 %iges Ethanol hinzufügen und erneut für 5 Minuten bei 14000 U/min zentrifugieren
- Überstand abpipettieren und für 30 Minuten mit geöffnetem Gefäß zum Trocknen stellen
- Die anschließende Sequenzierungsreaktion erfolgt mittels vollautomatischer Sequenzierungsmaschinen.

### 3.5.1.4.RNA-Mutationsscreening

Die instabile Ribonukleinsäure (RNA) muß vor der Mutationssuche in eine stabile komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden.

Das Umschreiben in cDNA erfolgt mittels RT-PCR (= „reverse-transkriptase“-PCR).

Durchführung einer RT-PCR

- RNA bei -80°C in Alkohol-Präzipitation gelagert
- 52 µl dieser Präzipitation in ein eisgekühltes Eppendorf-Gefäß geben
- 15 Minuten bei 14000 U/min zentrifugieren
- Überstand vorsichtig abpipettieren
- Zur RNA im Eppendorf-Gefäß 200 µl eisgekühltes Ethanol 75 % zufügen
- 5 Minuten bei 14000 U/min zentrifugieren
- Überstand vorsichtig abpipettieren
- 2 Minuten bei 14000 U/min zentrifugieren
- Überstand vorsichtig abpipettieren.
- Zur RNA im Eppendorf Gefäß 12 µl destilliertes Wasser hinzufügen und durch vorsichtiges auf- und abpipettieren (Cave: Kontamination der Pipette !!!) mischen
- Hinzufügen von 1 µl eines 2 pikomolaren Primers
- Inkubation im Wasserbad für 10 Minuten bei 70° C (die Inkubation ermöglicht eine optimale Anheftung des Primers an die RNA)
- Eppendorf-Gefäß für 1 Minute in Eis geben und dann folgende Substanzen hinzugeben:
  - 4 µl 5x First Strand Puffer
  - 2 µl 0,1 molare DTT
  - 1 µl 10 millimolare dNTP
- Inhalt des Gefäßes durchmischen und erneut für 2 Minuten bei 42°C im Wasserbad erhitzen
- Aus dem Wasserbad entfernen und unverzüglich 1 µl SuperScript II hinzufügen und durch vorsichtiges auf- und abpipettieren vermischen
- Erneutes erhitzen für 50 Minuten bei 42° C im Wasserbad
- Abschließendes erhitzen für 15 Minuten bei 70° C im Wasserbad, um die Reaktion zu beenden
- Die stabile cDNA kann für weitere Untersuchungen verwendet werden

### 3.5.2. Weitere Methoden

#### Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, welche DNA innerhalb einer spezifischen von der jeweiligen Restriktionsendonuklease abhängigen Nukleotidsequenz schneiden können.

Das Restriktionsenzym EcoRI (ein Enzym aus dem Bakterium *E. coli*) schneidet zum Beispiel immer innerhalb der Nukleotidsequenz: GATTC (siehe Abbildung)

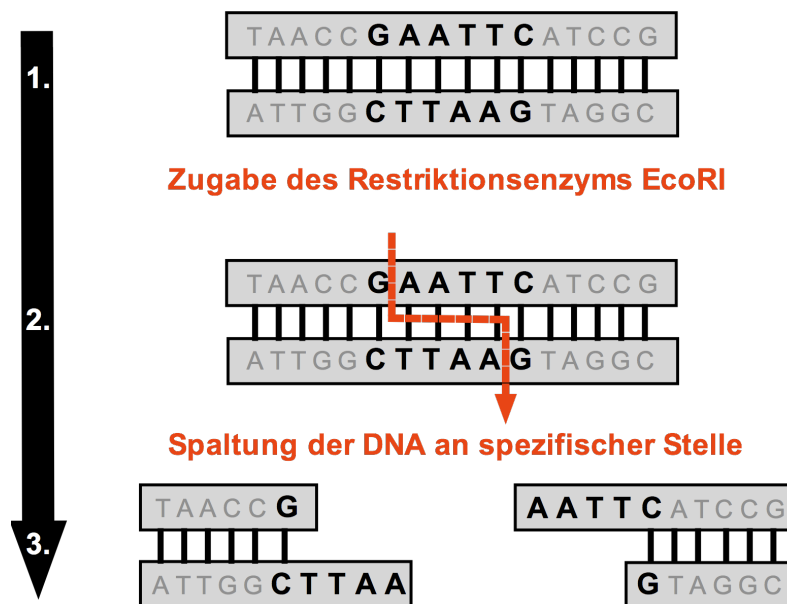


Abbildung 28 DNA-Spaltung durch Restriktionsenzym; 1. die dargestellte DNA-Sequenz enthält die für EcoRI spezifische Schnittstellensequenz der Nukleotide GAATTC, 2. Spaltung der DNA durch das Restriktionsenzym EcoRI an spezifischer Stelle, 3. gespaltene DNA

Entsprechend der Häufigkeit der vorhandenen Schnittstellensequenz eines spezifischen Restriktionsenzym wird ein 500 Basenpaare-langes DNA-Fragment in mehrere kleinere Fragmente zerschnitten.

Restriktionsendonukleasen können daher zur Bestätigung gefundener Punktmutationen verwendet werden. Durch eine Punktmutation kann die Schnittstelle einer spezifischen Restriktionsendonuklease erzeugt oder aufgehoben und die aufgetretene oder ausbleibende Schnittstelle somit als Marker für die Unterscheidung der unveränderten oder der mutierten DNA dienen.

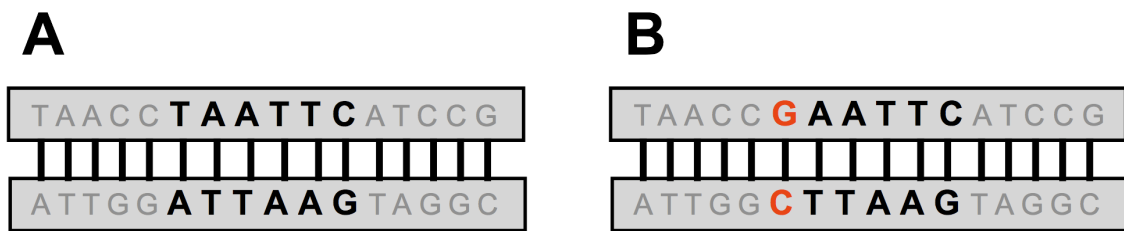


Abbildung 30 A Normale Nukleotidsequenz ohne Schnittstelle für EcoRI B Durch Punktmutation (Basenaustausch T→G) neu entstandene Schnittstelle für EcoRI

Durchführung einer DNA-Digestion mittels Restriktionsendonuklease

- Durchführung einer Polymerasekettenreaktion
- Zugabe von 1 – 2 µl der spezifischen Restriktionsendonuklease und deren spezifischen Puffer in das PCR-Produkt
- Durch vorsichtiges auf- und abpipettieren mischen
- Inkubation für 5 Stunden im Wasserbad (Temperatur ist abhängig von dem verwendeten Restriktionsenzym)
- Nach Abschluß der Inkubationszeit Kontrolle der Restriktion mittels Gelelektrophorese

Es kann bei der Verwendung von Restriktionsenzymen zu Problemen kommen, wenn der in der PCR verwendete Puffer nicht für das gewählte Restriktionsenzym geeignet ist. In diesem Fall muss der eigentlichen PCR-Digestion eine Ethanol-Präzipitation vorausgehen.

- Zugabe von 2,5 µl Ethanol pro 1 µl PCR-Produkt in jedes PCR-Röhrchen
- Substanzen durch vorsichtiges auf- und abpipettieren mischen
- 2 Stunden bei –20°C inkubieren
- Zentrifugieren für 20 Minuten bei 14000 U/min
- Überstand abpipettieren
- Zugabe von 250 µl 75 %igen Ethanol
- Substanzen durch vorsichtiges auf- und abpipettieren mischen
- Zentrifugieren für 5 Minuten bei 14000 U/min
- Überstand vorsichtig abpipettieren
- Bodensatz bei Raumtemperatur für 15 Minuten trocknen lassen
- DNA in 10 µl destillierten Wassers resuspendieren
- 2 µl des geeigneten (meist mitgelieferten) Puffers hinzufügen und das Reaktionsgemisch auf ein Gesamtvolumen von 20 µl auffüllen
- Anschließend Durchführen der Restriktion

## 4. Ergebnisse der Mutationsanalyse

Die Mutationsanalyse des INV-Gens des Menschen bei 65 Patienten mit Lateralisationsdefekten mit oder ohne angeborene Herz- und Gefäßfehlbildung ergab folgende Resultate :

### 4.6. Polymorphismen

#### 4.6.1. Basenaustausch an Position 2402

Innerhalb der kodierenden Sequenz des INV-Gens wurden zwei Polymorphismen innerhalb des Exons 14 gefunden.

Der erste Polymorphismus zeigte einen Basenaustausch an Position 2402 (Guanin → Adenin), was zu einer Änderung der kodierten Aminosäure von Glycin zu Glutamin an Position 801 führte. Der Basenaustausch befand sich in einem spezieübergreifend, nicht hoch konservierten Bereich und konnte wiederholt in der Kontroll-DNA von gesunden Probanden nachgewiesen werden. Die Veränderung der Nukleotidsequenz wurde daraus resultierend als Polymorphismus gewertet.

#### 4.6.2. Basenaustausch an Position 2412

Ein zweiter Basenaustausch an Position 2412 (Cytosin → Thymin) führte nicht zu einer Änderung der kodierten Aminosäure und konnte wiederholt in der Kontroll-DNA von gesunden Probanden nachgewiesen werden. Die Veränderung der Nukleotidsequenz wurde daraus resultierend als Polymorphismus gewertet.



## 4.7. Mutationen

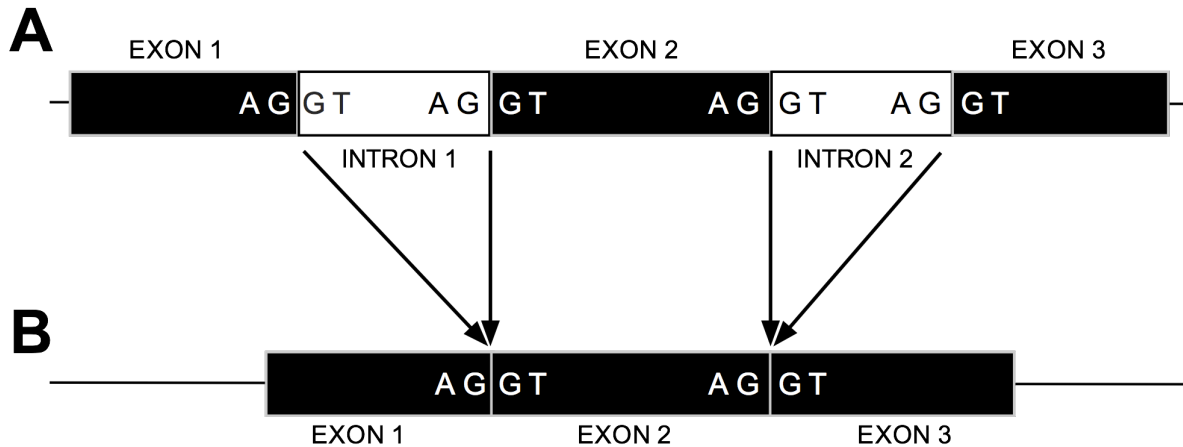
### 4.7.1. Splice-Junction Mutation

Die Mutationsanalyse des INV-Gens bei 65 Patienten mit Lateralisationsdefekt mit oder ohne angeborene Herz- und Gefäßfehlbildung wies eine Mutation innerhalb der Intron-Sequenz zwischen Exon 13 und Exon 14 nach.

Erstmals auffällig wurde die Mutation während der SSCP-Untersuchungen, in der sich eine Veränderung der Laufstrecke des mutationstragenden DNA-Abschnittes (=Amplifikationsprodukt) zeigte.

In der sich anschließenden Sequenzierung des auffälligen Amplifikationsproduktes konnte ein Basenaustausch innerhalb der Intronsequenz nachgewiesen werden. Es handelte sich um den Austausch von Thymin → Cytosin. Unabhängig von der Lokalisation innerhalb der nicht kodierenden Intron-Sequenz befand sich der Basenaustausch im Bereich der sogenannten „splice-junction“. Nach Transkription eines DNA-Stranges in eine vorläufige mRNA erfolgt vor Verlassen des Zellkerns die Entfernung der nicht kodierenden Sequenzen (= Intron) und das anschließende Zusammenfügen der benachbarten kodierenden Sequenzen (= Exon), dieser Vorgang wird als Splicing bezeichnet. Um eine Verschiebung des Leserasters zu vermeiden, muß das Herausschneiden des Introns präzise erfolgen. Ein Intron beginnt deshalb stets mit GT (Donorstelle) und endet mit AG (Akzeptorstelle). Diese Sequenzen sind bei allen höheren Organismen identisch und werden als Konsensus-Sequenz (=“splice-junction“) bezeichnet.

Die gefundene Mutation lag innerhalb der GT-Donorstelle.



**Abbildung 31 Splicing; A** DNA mit kodierenden (= Exon) und nicht kodierenden (= Intron) Sequenzen, normale Lage der Konsensussequenzen (Donor- und Akzeptorstellen); **B** nach Umschreiben der DNA in ein primäres RNA-Transkript erfolgt vor Verlassen des Zellkerns das Splicing mit Herausschneiden der nicht kodierenden Sequenzen (= Intron) und zusammenfügen der kodierenden Sequenzen (= Exon) an den Konsensus-Sequenzen (GT – AG)

Um die vermuteten Störungen des Splicings durch die Mutation innerhalb der Konsensus-Sequenz darzustellen, waren weitere Untersuchungen auf RNA-Ebene indiziert.

Für die Untersuchung auf RNA-Ebene war das Anlegen von Lymphozytenkulturen notwendig, aus denen die RNA isoliert werden konnte (siehe Material und Methodik). Die für Mutationsanalysen zu instabile RNA wurde mittels „reverse-transkriptase“-PCR (= RT-PCR) in die stabilere komplementäre DNA (= cDNA) umgeschrieben.

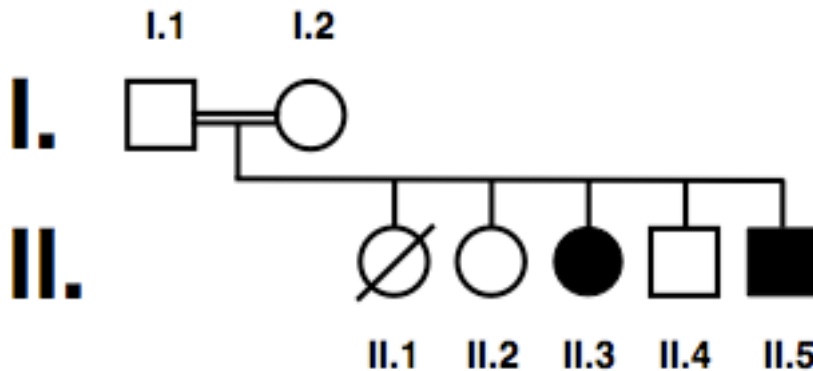
Durch die fehlenden Intron-Sequenzen hat das humane INV-Gen in cDNA-Form eine Größe von ca. 3500 bp.

Für die weitere Untersuchung wurden 14 verschiedene Primerpaare entworfen, die eine Amplifikation der cDNA des humanen INV-Gens in 14 ca. 200 – 400 bp große Fragmente ermöglichten.

Ergebnis:

Nachgewiesen werden konnte eine Mutation innerhalb der Konsensus-Sequenz bei einem Kind einer in Deutschland lebenden Familie türkischer Herkunft.

Beschreibung der mutationstragenden Familie:



**Abbildung 32 Stammbaum der mutationstragenden Familie (Legende: Quadrat = männlich, Kreis = weiblich, Doppelstrich = konsanguinität, Querstrich = Patient verstorben, schwarze Füllung = Träger der Mutation)**

Bei den Eltern handelte es sich um gesunde, konsanguine Partner, deren Mütter Schwestern waren. Die Eltern hatten 5 Kinder, davon 3 Töchter und 2 Söhne.

Die erste Tochter (II.1) verstarb im Neugeborenenalter aus unklarer Ursache, die Möglichkeit einer Bildgebung zum Ausschluß eines Lateralisationsdefektes oder eines komplexen angeborenen Herzfehlers bestand zum Zeitpunkt des Todes nicht. Eine Gewinnung von Blutproben für weitere DNA- / RNA-Analysen wurde nicht durchgeführt.

Die zweite Tochter (II.2) wurde gesund geboren und zeigte keine phänotypischen Hinweise auf einen Lateralisationsdefekt oder eine angeborene Herz- und Gefäßfehlbildung.

Die dritte Tochter (II.3) hatte einen Lateralisationsdefekt (Situs inversus) sowie angeborene Herz- und Gefäßfehlbildungen (Komplette Transposition der großen Arterien, Ventrikelseptumdefekt, persistierendes Foramen ovale, Dextrokardie).

Das vierte Kind, ein Sohn (II.4), war gesund und zeigte keine phänotypischen Hinweise auf einen Lateralisationsdefekt oder eine angeborene Herz- oder Gefäßfehlbildung.

Das fünfte Kind, ein weiterer Sohn (II.5), hatte einen Lateralisationsdefekt (Situs inversus) und eine angeborene Herz- und Gefäßfehlbildung (Vorhof- und Ventrikelseptumdefekt, partielle Lungenvenenfehlmündung).

Die weitere Untersuchung der RNA war nur bei 3 der Familienmitgliedern möglich (II.2, II.4, II.5), von den restlichen Familienmitgliedern stand keine RNA zur Untersuchung zur Verfügung.

## 4.7.2. Splice Mutante

Nach RNA Isolierung und Umwandlung in cDNA erfolgte die Amplifikation mittels der genannten 14 Primerpaare.

Eine Analyse der Nukleotidsequenz des Amplifikationsproduktes im Bereich der Bindungssequenz des Primers ist nicht möglich, weshalb die Primer für Exon 13 überlappend mit Exon 12 und Exon 14 gewählt wurden. Das Amplifikationsprodukt des gewählten Primers umfasst 572 bp. In der sich anschließenden Gelelektrophorese zeigten sich zusätzlich zu der erwarteten Bande von 572 bp zwei weitere Banden mit geringerer Größe.

Um die Nukleotidsequenz dieser Banden zu untersuchen, wurden sie mit Hilfe einer Gelpurifikation aufgetrennt, aus dem Gel herausgeschnitten und nach anschließender erneuter Amplifikation sequenziert.

Ergebnis:

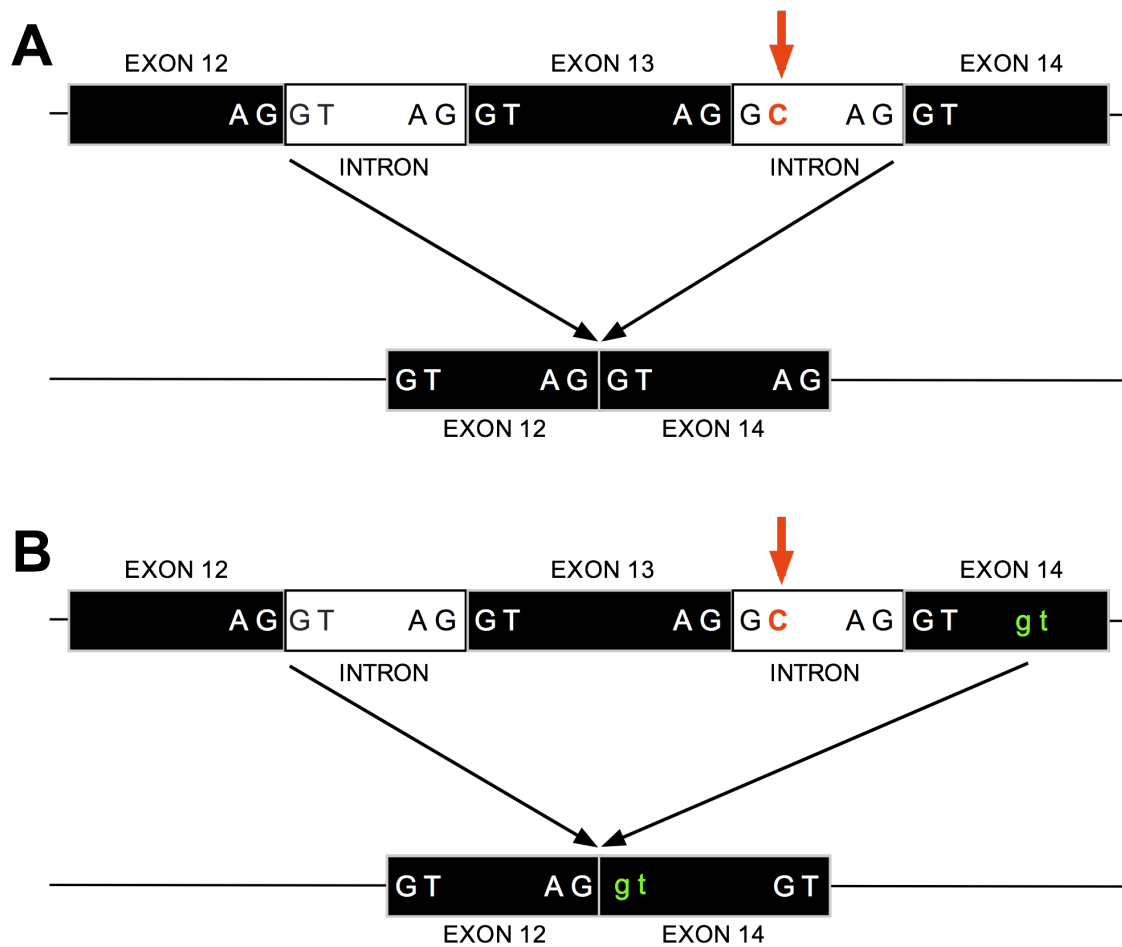
- bei der größten Bande handelte es sich um das erwartete 572 bp große Amplifikationsprodukt
- bei der mittleren Bande handelte es sich um ein 288 bp großes Fragment des erwarteten Amplifikationsproduktes
- bei der kleinsten Bande handelte es sich um ein 239 bp großes Fragment des erwarteten Amplifikationsproduktes

Beide zusätzlichen kürzeren Banden waren Fragmente, die der Nukleotidabfolge des erwarteten Amplifikationsproduktes entsprachen, jedoch je nach Größe des Fragmentes eine entsprechend großen Verlust von Nukleotiden (= Deletion) aufwiesen.

Die Mutation innerhalb der Donorstelle des Introns zwischen Exon 13 und Exon 14 des INV-Gens führte zum Verlust der Funktion der Konsensus-Sequenz (= „splice-junction“) beim „Splicing“.

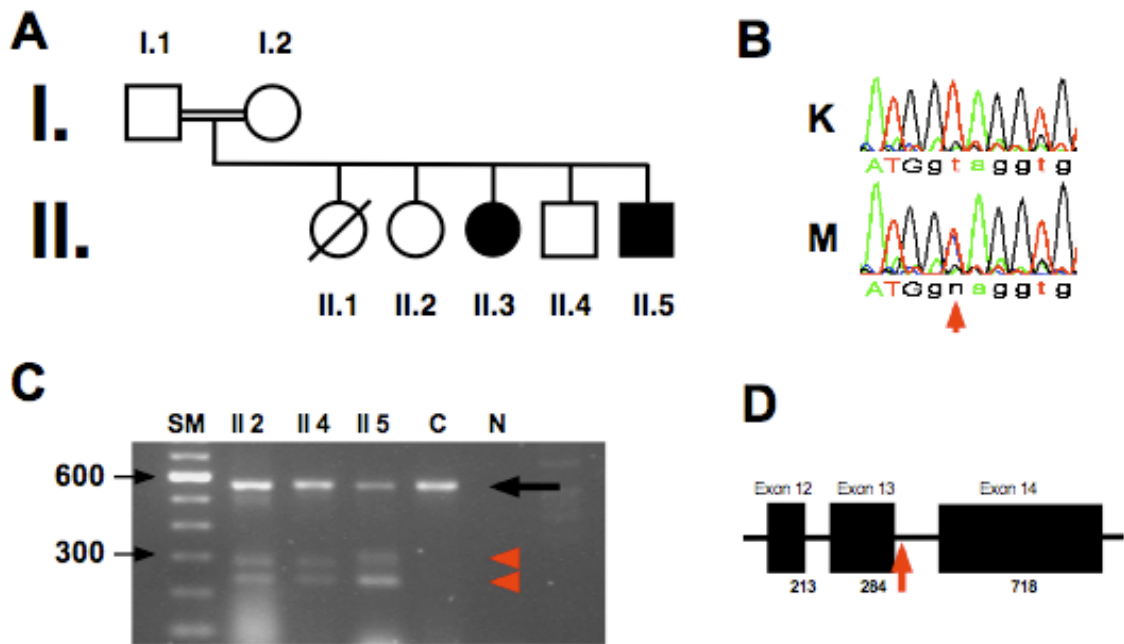
Die Aufhebung der Donorstelle resultierte in zwei alternative „Splicing“ Formen:

- Verbindung der Donorstelle von Exon 12 und der Akzeptorstelle von Exon 14 führte zum Verlust von Exon 13 und den beidseits angrenzenden Intron-Sequenzen und zur Bildung des 288bp Fragments
- Verbindung der Donorstelle von Exon 12 und einer artifizialen Akzeptorstelle innerhalb des Exons 14 (AG-Sequenz) führte zum Verlust von Exon 13 und einem Teil von Exon 14 und zur Bildung des 239bp Fragments



**Abbildung 33** Alternative Splicingformen durch Punktmutation (roter Pfeil); **A** Alternative 1: durch die Punktmutation (Basenaustausch T → C) kommt es zum Verlust der Konsensus-Sequenz (= Donorstelle) zwischen Exon 13 und Exon 14, beim folgenden Splicing wird zusätzlich zu den flankierenden Intron-Sequenzen Exon 13 vollständig entfernt und Exon 12 mit Exon 14 verbunden; **B** Alternative 2: beim folgenden Splicing wird zusätzlich zu den flankierenden Intron-Sequenzen Exon 13 und ein Teil von Exon 14 vollständig entfernt und Exon 12 mit einer artifiziellen Donorstelle (grün) innerhalb Exon 14 verbunden

Das Auftreten der Bande mit normaler Größe von 572 bp, konnte durch die Sequenzierung auf DNA-Ebene erklärt werden. Die Sequenzierung erfolgte bei allen Familienmitgliedern, mit Ausnahme der verstorbenen ersten Tochter (II.1), von der keine DNA zur Verfügung stand. Durch die Sequenzierung konnten alle 6 Familienmitglieder als heterozygote Träger der Konsensus-Sequenz (= „splice – junction“) Mutation identifiziert werden. Somit ist die Bande mit 572 bp Produkt des gesunden Allels.



**Abbildung 34** A Stammbaum der mutationstragenden Familie; B Darstellung der Mutation (Basenaustausch T → C = roter Pfeil) durch Sequenzierungsreaktion (K=Kontroll-DNA, M=mutationstragende DNA; dass „n“ in der mutationstragenden DNA ist technisch bedingt und bezeichnet nicht das Nukleotid, sondern weist auf einen Unterschied zwischen beiden angezeigten DNA-Sequenzen hin); C Gelelektrophorese nach PCR auf DNA-Ebene mit Darstellung der unterschiedlichen DNA-Fragmente durch alternatives Splicing (normale Bande mit 572 bp = schwarzer Pfeil, alternative Banden mit 288 bp und 239 bp = rote Pfeile); D Lokalisation der Punktmutation zwischen Exon 13 und Exon 14 (roter Pfeil)

Ergebnis der durchgeführten Untersuchungen in der mutationstragenden Familie:

- Das normale Allel der Probanden produziert die Bande mit 572 bp
- Das Allel mit Mutation im Bereich der Konsensus-Sequenz produziert zwei alternative Splicing-Produkte mit 288 bp und 239 bp
- In beiden alternativen Splicing-Produkten kommt es durch die Mutation zur Verschiebung des Leserasters und daraus resultierend zum vorzeitigen Auftreten eines Stop-Codons
- Durch das vorzeitige Auftreten eines Stop-Codons weisen beide alternativen Splicing-Produkte den Verlust einer unterschiedlichen Anzahl kodierender Nukleotide und dadurch den Verlust einer IQ-Domäne sowie von zwei NLS-BP Motiven innerhalb des INV-Gens auf.



**Abbildung 35** Verlust von Domänen durch alternatives Splicing; **A** Alternative 1: durch die alternative Splicingform und Verlust von Exon 13 kommt es zum Verlust einer IQ-Domäne (schwarz kariert) und beider NLS-BP-Domänen (grün kariert); **B** Alternative 2: durch Verlust von Exon 13 und partiell Exon 14 kommt es zum Verlust einer IQ-Domäne (schwarz kariert) und beider NLS-BP-Domänen (grün kariert).

Um eine andere Ursache als die Mutation der Konsensus-Sequenz (= „splice – junction“) für die zwei auftretenden Splicing-Alternativen auszuschließen, wurden Exon 12 und Exon 14 sowie deren flankierende Intronsequenzen sequenziert. Weitere Mutationen neben der Mutation der Konsensus-Sequenz konnten nicht gefunden werden.

Untersuchungen von 300 Kontroll-Chromosomen konnten keine vergleichbaren Mutationen im Bereich der Konsensus-Sequenz nachweisen.

Neben der Mutation innerhalb der Konsensus-Sequenz konnten im untersuchten Studien-Patientenkollektiv keine weiteren Mutationen innerhalb des INV-Gens gefunden werden.

## 5. Diskussion

### 5.8. Wahl der Studiengruppe

Durch die Versuche mit transgenen Mäusen von Yokoyama und Mitarbeitern 1993 entstand ein neues Tiermodell für die Untersuchung von Lateralisationsdefekten (Yokoyama, 1993). Die homozygoten Tochtergenerationen der *inv*-Mutationen wiesen in 90% einen Lateralisationsdefekt und in 72% eine zusätzliche angeborene Herz- und Gefäßfehlbildung auf (Morishima, 1998). Durch den Nachweis einer Homologie zwischen dem *inv*-Gen der Maus und dem *INV*-Gen des Menschen von bis zu 100% in den spezieübergreifend hochkonservierten Bereichen durch Schön und Mitarbeiter war das *INV*-Gen ein geeignetes Kandidaten-Gen für die Suche nach Mutationen bei Patienten mit Lateralisationsdefekten (Schön, 2002).

Während die Kenntnisse über die Regulationsmechanismen der Lateralisation im Tiermodell in den vergangenen Jahren deutlich zugenommen haben, ist die Entstehung von Lateralisationsdefekten beim Menschen weiterhin weitestgehend ungeklärt.

Aufgrund der mangelnden Kenntnisse über den Ablauf der Lateralisation beim Menschen ist eine Klassifikation unterschiedlicher Lateralisationsdefekte gemäß ihrer Entstehung derzeit nicht durchführbar.

Um eine hohe Sensitivität bei der Suche nach der genetischen Ursache von Lateralisationsdefekten zu erreichen, ist jegliche phänotypische Ausprägung eines Lateralisationsdefektes mögliches Einschlußkriterium bei der Wahl der Studienpatientengruppe. Im Vergleich zu vorhergehenden Definitionen von Lateralisationsdefekten scheint dies ungenau, folgt jedoch der oben genannten Empfehlungen der „The International Nomenclature Committee for Pediatric and Congenital Heart Disease“ aus dem Jahr 2007 (Jacobs, 2007). Diese scheinbar unspezifische Auswahl von Studienpatienten führt dennoch zu einer geringen Spezifität bezüglich der zugrundeliegenden viszeralen, thorakalen oder kardialen Lateralisationsdefekte.

Einschlußkriterium bei der Auswahl der Patientengruppe für diese Studie war somit das Auftreten eines viszeralen- und/oder thorakalen und/oder kardialen Lateralisationsdefektes.



## 5.9. Vergleich der Studiengruppe mit Studiengruppen aus der Literatur der Lateralisationsdefekte

Die Gegenüberstellung der hier gewählten Studienpatientengruppe mit Patientengruppen anderer Lateralisationsdefektstudien zeigt ähnliche phänotypische Merkmale der untersuchten Studienpatienten.

Ein genauer Vergleich der Patientengruppen unterschiedlicher Lateralisationsdefektstudien ist aus folgenden Gründen kaum möglich:

Die untersuchten Patienten in genetischen Lateralisationsdefektstudien weisen oftmals komplexe angeborene Fehlbildungen der thorakalen und viszeralen Organe auf. Insbesondere die assoziierten Herz- und Gefäßfehlbildungen erschweren eine international vergleichbare Klassifikation.

Schwerpunkt der Untersuchungen bei genetischen Lateralisationsdefektstudien sind die Suche nach genetischen Ursachen für die Entstehung von Lateralisationsdefekten und die detaillierte Beschreibung der durchgeführten Methodik. Eine detaillierte und umfassende Beschreibung der Pathomorphologie der untersuchten Patienten wird meistens nicht gegeben.

Aufgrund der noch geringen Kenntnisse über die genetischen Ursachen bei der Entstehung von Lateralisationsdefekten beim Menschen erscheint eine Fokussierung auf spezifische Lateralisationsdefektsubgruppen nicht sinnvoll. Erst nach Entschlüsselung der genetisch kausalen Faktoren bei der Entstehung von Lateralisationsdefekten kann eine differenzierte genetische Untersuchung der unterschiedlichen Ausprägungen von Lateralisationsdefekten durchgeführt werden.

## 5.10. Bedeutung der Splice-Junction Mutation

Ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal zwischen eukaryoten und prokaryoten Genen ist das alleinige Vorhandensein nicht-kodierender Sequenzen (= Intron) innerhalb der eukaryoten Gene. Diese Introns werden im Rahmen des Splicings mittels hochspezifischer enzymatischer Abläufe durch die sogenannten Splicisomen herausgeschnitten. Speziesübergreifend werden die Übergänge zwischen Exon- und Intronsequenz (= Splice-Junction) durch eine hochkonservierte Nukleotidabfolge gekennzeichnet (5'GT, 3'AG). Mutationen im Bereich dieser Splice-Junction führen zu fehlerhaften Splicing-Abläufen. Krawczak und Mitarbeiter zeigten in ihren Untersuchungen von 1992 und 2007, dass 10% der bisher nachgewiesenen und für humangenetische Erkrankungen verantwortlichen Punktmutationen zu Splicing-Mutationen führen (Krawczak, 2007), (Krawczak, 1992).

Häufiges Ausgangsmaterial für genetische Mutationsanalysen ist mRNA, indem die nicht-kodierenden Sequenzen bereits entfernt wurden. Mögliche Splice-Junction Mutationen können in diesen Untersuchungen übersehen werden. Splice-Junction Mutationen als Ursache phänotypischer Fehlbildungen sind daher vermutlich häufiger als bisher nachweisbar (Krawczak, 2007).

### Mutation des INV-Gens als Beispiel einer Splice – Junction Mutation

Wie in den oben ausführlich dargestellten Untersuchungen, führte die Mutation im Bereich der Splice – Junction des INV-Gens zu einem fehlerhaften Splicing und nachfolgend zu unterschiedlich umfangreich ausgeprägten Verlusten von Nukleotiden und somit genetischer Information. Die aus diesem Verlust genetischer Information resultierenden Funktionsverluste des INV-Gens werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit ausführlich dargestellt. Die Mutation im Bereich der Splice – Junction des INV-Gens zeigt somit beispielhaft die möglichen Auswirkungen einer Splice – Junction Mutation.

## 5.11. Lateralisationsdefekte durch Mutationen des INV-Gens

Die hier nachgewiesene Mutation der Intronsequenz des INV-Gens führt durch das resultierende fehlerhafte Splicing zum Verlust von genetischen Informationen. Die verbleibenden Nukleotide kodieren weiterhin für ein Protein, das in seiner Funktion jedoch erheblich verändert ist.

Das aus den zwei alternativen Splicing Prozessen resultierende Protein behält seine Proteinbindungseigenschaften, da die Bereiche der Ankyrin-Motive unbeschadet sind.

Jedoch kam es zum Verlust beider NLS-BP Motive und der distal davon gelegenen IQ-Motive, die speziessübergreifend beim *Xenopus* Frosch eine bedeutende Rolle bei der Steuerung der Lateralisation übernehmen.

Wenn es zur Synthese des kodierenden Proteins kommt, besteht die Möglichkeit einer Bindung des gebildeten Proteins, ohne die wichtige Funktion der IQ-Motive, Modulation der Eigenschaft zur Kalziumbindung, erfüllen zu können.

Die Untersuchung der Chromosomen von 300 gesunden Probanden, die zum Teil ethnisch vergleichbare Ursprünge wie die mutationstragende Familie türkischer Herkunft in oben genannten Untersuchungen aufwiesen, wies keine vergleichbare Mutation der Konsensus-Sequenz („splice – junction“) auf.

Einerseits sprechen diese Daten für die hypothetische Kausalität der Mutation bei der Entstehung der Lateralisationsdefektes.

Andererseits spricht gegen diese Hypothese das heterozygote Auftreten der Mutation bei allen, auch den phänotypisch unauffälligen, Familienmitgliedern (I.1, I.2, II.2, II.4). Bei ihnen hatten die klinische Untersuchung, Röntgen-Thoraxaufnahme, Elektrokardiogramm sowie eine Abdomensonographie keine phänotypischen Hinweise auf einen Lateralisationsdefekt ergeben. Ein subklinischer Lateralisationsdefekt ist dadurch dennoch nicht auszuschließen. Die heterozygote Mutation könnte daher auch bei den bisher als phänotypisch unauffällig bezeichneten Familienmitgliedern einen nicht erkannten Lateralisationsdefekt verursacht haben.

## 5.12. Lateralisationsdefekt trotz heterozygoter Mutation?

Grundsätzlich kann das gleichzeitige Vorliegen einer genetischen Mutation bei phänotypisch auffälligen und unauffälligen Familienmitgliedern durch eine inkomplette Penetranz erklärt werden (Mégarbané, 2000).

Mégarbane und Mitarbeiter berichteten 2000 über die Möglichkeit einer inkompletten Penetranz in einer Familie mit Lateralisationsdefekten. In der betroffenen Familie wiesen drei männliche Mitglieder eine nonsense-Mutation auf dem Chromosom X innerhalb des ZIC3-Gens auf. Zwei der Mutationsträger zeigten Lateralisationsdefekte in Kombination mit komplexen angeborenen Herz- und Gefäßfehlbildungen, die zum Tode der Betroffenen im Kindesalter führten. Ein dritter Träger der Mutation zeigte weder Lateralisationsdefekte noch angeborene Herz- und Gefäßfehlbildungen. Mégarbane und Mitarbeiter erklärten diese Tatsache durch eine inkomplette Penetranz der X-chromosomalen Mutation, die bei dem phänotypisch unauffälligen Träger der Mutation eine Entstehung der Fehlbildungen verhinderte (Mégarbané, 2000).

Weiterhin ist speziesübergreifend die phänotypische Ausprägung einer Mutation oftmals nicht von der Mutation innerhalb eines einzelnen Gens, sondern von gleichzeitig auftretenden Mutationen in mehreren Genen verantwortlich (Casey, 1998) (Collignon, 1996) (Gebbia, 1997).

Casey und Mitarbeiter formulierten 1998 die Hypothese, dass ein für die Vererbung von Lateralisationsdefekten möglicher Vererbungsweg di- oder trigenische Vererbungsmodalitäten beinhalten könnte (Casey, 1998). In der Literatur finden sich Untersuchungen von Mäusen (Collignon, 1996) und Menschen (Gebbia, 1997), auf die sich diese Hypothese stützt.

Bei einer digenischen Vererbung kommt es zu einer genetischen Nichtkomplementierung rezessiver Mutationen zweier Gene. Liegt eine digenisch vererbte Mutation heterozygot bei einem Träger vor, kommt es daher zu keiner phänotypischen Ausprägung der Mutation. Erst das gleichzeitige Vorhandensein einer weiteren heterozygoten Mutation in einem zweiten Gen führt zur Ausprägung des Phänotypus (Kajiwara, 1994).

Als Beispiel sei hier die Mutation in den Genen Peripherin/RDS und ROM1 genannt. Bei doppelt heterozygoten Trägern führen Mutationen in diesen Genen zu einer progressiven Degeneration der Photorezeptoren im Sinne einer Retinitis pigmentosa (Kajiwara, 1994).

Bei der digenischen Vererbung kann die Stammbaumanalyse den Verdacht einer autosomal-dominanten Vererbung mit inkompletter Penetranz nahelegen, da der Anteil erkrankter Nachkommen statt 50% nur 25% beträgt. In anderen Stammbäumen mit digenischer Vererbung kann der Verdacht auf einen autosomal-rezessiven Vererbungsmodus gestellt werden, weil beide Elternteile merkmalsfrei sind.



Di- oder trigenische Vererbungen finden sich auch bei der Vererbung vertebraler Anomalien bei Mutationen innerhalb der Hox Gene.

Hierbei kommt es bei mehrfach heterozygoten Trägern zu deutlich schwereren Ausprägungen der Mutationen und einer höheren Penetranz (Condie, 1994). Nach Rancourt und Mitarbeitern bestehen bei einigen dieser digenisch vererbten Gene für mehrfach heterozygote Träger die gleiche Konsequenz wie bei Vorliegen einer Homozygotie (Rancourt, 1995).

Dennoch sind bei Menschen familiäre Fälle von digenischer Vererbung selten und finden sich in der Literatur zum Beispiel bei der bereits oben genannten Retinitis pigmentosa (Kajiwara, 1994) und okulärem Albinismus vom Typ Waardenburg 2 (Morell, 1997).

Um eine solche di- oder trigenische Ursache für die Ausprägung der hier aufgetretenen Lateralisationsdefekte zu untersuchen, wurden die bisher bekannten für Lateralisationsdefekte verantwortlichen Gene auf zusätzliche Mutationen untersucht:

- ZIC3 (Gebbia, 1997)
- NODAL (Gebbia, 1997)
- LEFTY1, LEFTY2 (Kosaki R. , 1999)
- ACVR2B (Kosaki R. , 1999)
- CFC1 (Bamford, 2000)

Keines der beiden phänotypisch auffälligen Kinder (II.3, II.5) zeigte eine zusätzliche Mutation im Bereich der untersuchten Gene. Eine digenische Mutation als Ursache der Lateralisationsdefekte innerhalb der mutationstragenden Familie in unserer Untersuchungen konnte mit den untersuchten Gene nicht gezeigt werden.

Kosaki und Mitarbeiter konnten 1999 bei Untersuchungen von LEFTY A und LEFTY B bei 126 Patienten mit Lateralisationsdefekten und angeborenen komplexen Herz- und Gefäßfehlbildungen bei zwei Patienten jeweils eine Mutationen in LEFTY A zeigen (eine „nonsense“-Mutation, eine „missense“-Mutation). Die Eltern der mutationstragenden Patienten mit Lateralisationsdefekt waren heterozygot für die gefundenen Mutationen, zeigten phänotypisch jedoch keine Auffälligkeiten.

Kosaki und Mitarbeiter erklärten diesen Befund mit der Möglichkeit einer inkompletten Penetranz sowie dem möglichen zugrunde liegen einer di- oder trigenischen Vererbung (Kosaki K. , 1999).

### 5.13. Lateralisationsdefekt durch INV-Mutation bei multigenischer Vererbung

Das heterozygote Auftreten der INV-Mutation bei unseren Patienten mit Lateralisationsdefekt (II.3, II.5) und den phänotypisch unauffälligen Familienangehörigen (I.1, I.2, II.2, II.4) lässt nicht ausschließen dass die INV-Mutation, bei Vorkommen weiterer Mutationen in für die Ausbildung der Lateralisation wichtigen Genen, ursächlichen Zusammenhang mit Lateralisationsdefekten hat. Unsere Untersuchungen der bisher bekannten Gene für Lateralisationsdefekte wiesen keine zusätzlichen Mutationen bei den betroffenen Patienten auf.

Phänotypische Auffälligkeiten bei der betroffenen Tochter (II.3) bei gleichzeitig phänotypisch unauffälliger Mutter (I.2) schließt die Kombination der INV-Mutation mit einem zusätzlichen X-chromosomal gebundenen Faktor aus. In diesem Fall würde der X-chromosomale Faktor von der Mutter an die Tochter vererbt werden, und beide müssten den gleichen Genotypus aufweisen.

Eine Kombination der INV-Mutation mit einem zweiten autosomalen Faktor erklärt die unterschiedliche phänotypische Ausprägung der Mutation bei unserer mutationstragenden Familie ebenfalls nicht ausreichend: der zusätzliche autosomale Faktor müsste von einem der Eltern (I.1, I.2) auf die phänotypisch auffälligen Kinder (II.3, II.5) vererbt worden sein, ohne jedoch zu einer Ausprägung der INV-Mutation bei dem betroffenen Elternteil zu führen.

Hypothetisch zu erklären wären unsere Beobachtungen hingegen durch die Annahme eines trigenischen Vererbungsmodus, der erstmals von Beckmann 1996 beschrieben wurde (Beckmann, 1996).

Danach würde zusätzlich zur bestehenden INV-Mutation beider gesunden Eltern (I.1, I.2) unserer mutationstragenden Familie, je ein weiterer, bei Vater und Mutter unterschiedlicher, prädisponierender Faktor vorrauszusetzen sein. Erst die Kombination von INV-Mutation und beider zusätzlicher Mutationen bei Vater (I.1) und Mutter (I.2) (= dreifach heterozygot) würden den nachgewiesenen Lateralisationsdefekt bei den betroffenen Kindern hinreichend erklären.

Eine weitere Möglichkeit bestünde in der Konsanguinität der Eltern (I.1, I.2) unserer mutationstragenden Familie. Wären beide Eltern Träger eines einzelnen mutierten Allels eines Supressorgens, die bei unseren betroffenen Kindern (II.3, II.5) in homozygoter Form vorlägen, dann würde theoretisch die Mutation des Ziel-Gens des Supressorgens (Ziel-Gen = INV-Gen) zu einer phänotypischen Ausprägung der INV-Mutation aufgrund der aufgehobenen Suppression der Mutation führen.

Formuliert wurde dieses Modell erstmals von Beckmann und Mitarbeitern 1996 (Beckmann, 1996).



## 6. Zusammenfassung

Lateralisationsdefekte stellen einen wichtigen Faktor bei der Entstehung von komplexen angeborenen Herzfehler dar. Der Vorgang der Lateralisation beim Menschen ist noch weitestgehend unverstanden. Hingegen konnten in den letzten Jahren deutliche Fortschritte im Verständnis der physiologischen Lateralisation in Tiermodellen erreicht werden.

Durch Tiermodelle war es weiterhin möglich, genetische Faktoren für die Steuerung von Lateralisationsvorgängen und somit auch für die Entstehung von Lateralisationsdefekten zu identifizieren. Eines dieser Tiermodelle ist die *inv*-Maus. Bei dieser transgenen Maus ist es durch Mutation innerhalb des *inv*-Gens zur Entstehung von Lateralisationsdefekten gekommen.

In weiteren Untersuchungen konnte eine hohe Homologie zwischen der genetischen Sequenz des *inv*-Gens der Maus (= *inv*) und einem entsprechenden Bereich im Genom des Menschen nachgewiesen werden, das entsprechend als humanes INV-Gen (= INV) bezeichnet wird. Das INV-Gen in Analogie zur *inv*-Maus schien somit ein geeignetes Kandidaten-Gen zu sein für die Mutationsanalyse von Patienten mit Lateralisationsdefekten.

In der vorliegenden Studie wurden 65 Patienten mit Lateralisationsdefekten auf Mutationen im Bereich des INV-Gens untersucht.

Dabei konnte in einer türkischen Familie mit 2 Kindern, bei denen ein Lateralisationsdefekt und eine assoziierte angeborene Herz- und Gefäßfehlbildung diagnostiziert worden war, eine Mutation im Bereich der Intronsequenzen des INV-Gens nachgewiesen werden. Die Mutation verursachte ein fehlerhaftes Splicing mit Verlust von genetischen Informationen und resultierend einem verkürzten Protein. Diese Verkürzung des Proteins hatte den Verlust wichtiger Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren zur Folge mit der Möglichkeit des Ausfalls von entscheidenden Faktoren.

Alle untersuchten Mitglieder der türkischen Familie waren heterozygot für diese spezifische INV-Mutation.

Zur Erklärung für das heterozygote Auftreten dieser Mutation sowohl bei den gesunden ohne phänotypische Charakteristika, als auch bei den Erkrankten mit den phänotypischen Merkmalen, werden verschiedene Hypothesen diskutiert:

Einerseits könnte das Vorliegen einer inkompletten Penetranz den unterschiedlichen Phänotypus, wie der in unserer mutationstragenden Familie nachgewiesene, bei genetisch gleicher Mutation erklären.

Andererseits wäre hypothetisch eine trigenische Vererbung der in unserer türkischen Familie nachgewiesenen INV-Mutation als Ursache für die Entstehung der Lateralisationsdefekte denkbar.

Die Konsanguinität der Eltern und der damit möglichen Vererbung eines mutierten Supressorgens, die nur bei Vorliegen zwei mutierter Kopien des Supressorgens und gleichzeitig vorliegender Mutation des Ziel-Gens zu einer phänotypischen Ausprägung führen, ist eine weitere mögliche Hypothese bei der Diskussion der vorliegenden Ergebnisse.

Um eine Kausalität zwischen dem Vorliegen der INV-Mutation und dem Auftreten von Lateralisationsdefekten nachweisen zu können, sind weitere Untersuchungen von Patienten mit Lateralisationsdefekten erforderlich. Erst das vollständige Verständnis des Ablaufs der Lateralisation beim Menschen wird erklären können, ob das humane INV-Gen eine wichtige Funktion bei der Steuerung der Lateralisation beim Menschen besitzt.

## Glossar

### Allele

Als Allele bezeichnet man alternativ auftretende Formen eines Gens, die an homologen Chromosomen vorkommen. Das Auftreten verschiedener Allele innerhalb der Bevölkerung ist als normal zu betrachten. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Allelen entstehen durch Sequenzvariationen, welche die Funktion des Gens nicht notwendigerweise beeinflussen müssen. Bei der Entstehung neuen Lebens wird meist ein Allel eines Gens vom Vater und ein Allel eines Gens von der Mutter an den Nachkommen weitergegeben. Von homozygoten Allelen spricht man, wenn diese von Vater und Mutter vererbten Allele identisch sind. Als heterozygot hingegen bezeichnet man die Allele, wenn sie unterschiedlich sind.

### Direkte Diagnostik

Ist das für eine Erbkrankheit verantwortliche Gen mit seiner Lokalisation und Nukleotidsequenz bekannt, kann bei Patienten, die diese Erbkrankheit aufweisen, der molekulare Defekt (Mutation) direkt nachgewiesen werden.

### Deletion

Unter einer Deletion versteht man das Fehlen von einzelnen oder mehreren Nukleotiden innerhalb eines Gens. Dabei kann es durchaus zur Deletion von gesamten Genen kommen. Man unterscheidet desweiteren eine interstitielle Deletion, bei der das fehlende Segment innerhalb eines Chromosoms auftritt, von der terminalen Deletion, bei der das fehlende Segment am Ende eines Chromosoms liegt.

### De novo Mutation

Eine de novo Mutation wurde nicht durch Vererbung von den Eltern an die Nachkommen weitergegeben, sondern ist im betroffenen Individuum neu aufgetreten.

### DNA-Replikation

Bei der DNA-Replikation handelt es sich um den Vorgang der exakten Duplikation der DNA. Eine Reihe spezieller Enzyme spalten den DNA-Doppelstrang auf, um dann entlang des Einzelstranges in 5'-3' Richtung einen neuen komplementären DNA-Strang zu synthetisieren. Nach der Synthese liegen 2 komplementäre DNA-Doppelstränge vor.

### Erbgänge

#### autosomal dominanter Erbgang

Der Begriff autosomal dominanter Erbgang enthält zwei wichtige Informationen. Die erste Information beschreibt die Lokalisation des vererbten Gens: autosomal bedeutet das Gen liegt auf einem Autosom und nicht auf einem Geschlechtschromosom, es wird also unabhängig vom Geschlecht vererbt. Die zweite Information beschreibt die Ausprägung des vererbten Gens, dominant bedeutet, daß das Merkmal des Gens bereits ausgeprägt wird, wenn es nur auf einem der beiden Allele des homologen Chromosoms liegt. Folglich sind die zwei auftretenden Allele nicht identisch, also heterozygot. Für die Nachkommen des Trägers eines autosomal dominant vererbten Allels besteht eine Wahrscheinlichkeit von 50%, dieses Allel zu erben und dadurch ebenfalls Merkmalsträger zu werden.

### Autosomal rezessiver Erbgang

Der Begriff autosomal rezessiver Erbgang beinhaltet ebenfalls zwei wichtige Informationen. Das verantwortliche Allel liegt, wie schon oben erwähnt, auf einem Autosom und wird somit nicht geschlechtsgebunden vererbt. Desweiteren wird das Merkmal, welches von dem betroffenen Allel kodiert wird, nur dann auftreten, wenn es auf beiden Allelen vorkommt, wenn der Träger also homozygot für das betreffende Allel ist. Ist der Träger heterozygot für das betreffende Allel, so wird das entsprechende Merkmal in der Regel nicht ausgeprägt, der Träger bleibt klinisch unauffällig. Man bezeichnet ihn jedoch als Anlagenträger, da er die Anlage weiter vererben kann. Für die Nachkommen von heterozygoten klinisch gesunden Eltern besteht eine Wahrscheinlichkeit von 25%, das Merkmal aufzuweisen.

### X-chromosomal dominant

In diesem Fall liegt das für die Merkmalsausprägung verantwortliche Allel auf dem X-Chromosom, es wird also geschlechtsgebunden vererbt. Die dominante Vererbung beschreibt, daß das Merkmal auch bei Vorliegen nur eines Allels (heterozygot) auftritt. Betroffen sind bei diesem Vererbungsmodus sowohl heterozygote Männer als auch Frauen.

### X-chromosomal rezessiv

Wie oben beschrieben, liegt auch hier das verantwortliche Allel auf dem X-Chromosom und wird somit geschlechtsgebunden vererbt. Da bei Männern das X-Chromosom nur einfach vorliegt und daher keine anderen Allele eines zweiten homologen X-Chromosoms fehlen, kommt es bei männlichen Trägern auch schon bei heterozygotem Vorliegen des verantwortlichen Gens zur Merkmalsausprägung. Bei Frauen hingegen, die bekanntermaßen über zwei X-Chromosome in ihrem Genom verfügen, kommt es nur bei homozygotem Vorliegen des betroffenen Allels auf beiden X-Chromosomen zur Ausprägung des Merkmals. Bei heterozygoten Frauen kommt es in der Regel nicht zur klinischen Ausprägung des Merkmals. Sie sind jedoch Überträgerinnen des betreffenden Merkmals und vererben dieses mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% an ihre Söhne und Töchter.

### Exon

Als Exon bezeichnet man einen informationstragenden Abschnitt auf der DNA. Die einzelnen Exons werden durch nicht-informationstragende Abschnitte, den sogenannten Introns, voneinander getrennt. Bei der späteren Verarbeitung der DNA nach der Translation in die mRNA werden die Introns herausgeschnitten und die Exons End-zu-End miteinander verbunden, um dann in dieser Form die Vorlage für die spätere Transkription darzustellen.

### Expression

Unter Expression (=Genexpression) versteht man die Abschrift der Nukleotidsequenz der DNA in einen komplementären messengerRNA-Strang (=Transkription) und die anschließende Übersetzung der messengerRNA in die jeweilige Aminosäureabfolge des entstehenden Proteins (=Translation), welches das eigentliche Genprodukt darstellt.

### Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH)

Molekularzytogenetische Methode zum Nachweis von chromosomalen Rearrangements, (Mikro-)Deletionen, chromosomaler Lokalisation eines bestimmten Gens oder seiner Kopien. Im ersten Schritt werden hierzu biotinylierte Nukleotide in spezifische DNA-Sonden eingebaut. Nach anschließender Hybridisierung von, auf einem Objektträger fixierten Metaphasezellen mit diesen Sonden, werden diese mit Fluorescein-Isothiocyantmarkiertem Avidin sichtbar gemacht. Die Zahl und Lokalisation der detektierbaren fluoreszierenden Punkte stimmt mit der Anzahl der Genkopien (normalerweise 2) und deren chromosomaler Lokalisation überein.

### Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Gelelektrophorese nutzt man die negative Ladung von DNA-Molekülen, um sie mit Hilfe eines elektrischen Feldes in einer dafür geeigneten Matrix (Agarose oder Polyacrylamid) trennen zu lassen. Durch die verwendete Matrix wandern die DNA-Moleküle entsprechend ihres Molekulargewichtes schneller oder langsamer innerhalb des elektrischen Feldes und können nach ihrer Größe aufgetrennt werden.

### Genexpression

Unter Genexpression (=Expression) versteht man die Abschrift der Nukleotidsequenz der DNA in einen komplementären messengerRNA-Strang (=Transkription) und die anschließende Übersetzung der messengerRNA in die jeweilige Aminosäureabfolge des entstehenden Proteins (=Translation), welches das eigentliche Genprodukt darstellt.

### Haplotypanalyse

Bei der Haplotypanalyse kann mit Hilfe von sogenannten polymorphen DNA-Markern die Vererbung eines chromosomalen Bereiches innerhalb einer Familie verfolgt werden. Auch wenn innerhalb dieses Bereiches die genaue Lokalisation und Sequenz des die Krankheit verursachenden Gens unbekannt ist, kann durch die Kenntnis der Vererbung des Chromosomenbereichs indirekt auf die Vererbung der Mutation geschlossen werden. Ebenso kann bei bekanntem Gen eine unbekannt Mutation indirekt nachgewiesen werden. Diese Vorgehensweise wird beispielsweise gewählt, wenn die direkte Mutationssuche im entsprechenden Gen zu aufwendig ist. Die Haplotypanalyse ist eine Familienuntersuchung, daher ist es notwendig, daß neben dem/den Betroffenen selbst, möglichst viele Familienmitglieder an der Untersuchung teilnehmen.

### Imprinting, genomisches

Das genomische Imprinting ist eine in der frühen Embryonalentwicklung stattfindende Prägung von bestimmten Genen, die mütterlicher oder väterlicher Herkunft sein können. Das Imprinting bewirkt in Abhängigkeit von der elterlichen Herkunft der Gene deren unterschiedliche Genaktivität. Entsprechend sind einige wenige Gene nur auf den von der Mutter vererbten Chromosomen aktiv, andere Gene nur auf den vom Vater vererbten Chromosomen. Auf biochemischer Ebene beruht das Imprinting vermutlich auf Methylierung der DNA.

### Imprinting-Mutation

Bei manchen Krankheitsbildern läßt sich eine verminderte oder verstärkte Methylierung der DNA nachweisen, die vermutlich krankheitsverursachend ist. Die Mutationen, die zu einer gestörten Methylierung führen, werden als Imprinting-Mutationen bezeichnet.

### Indirekte Diagnostik

Ist die chromosomale Position des verursachenden Gens einer genetischen Erkrankung bekannt, das Gen selbst jedoch noch nicht isoliert, oder ist ein bekanntes Gen so groß, daß nicht jede Mutation direkt nachgewiesen werden kann, dann besteht die Möglichkeit, den Gendefekt indirekt zu diagnostizieren, beispielsweise mit der Haplotypanalyse.

### Intron

Bei einem Intron handelt es sich um einen nicht-informationstragenden Abschnitt auf der DNA. Die einzelnen Introns werden durch Exons voneinander getrennt. Bei der Übersetzung der genetischen Information in Proteine, werden nach der Umwandlung der DNA in messengerRNA die Introns herausgeschnitten, und die Exons End-zu-End miteinander verbunden. Die Informationen der Exons werden dann in die jeweilige Abfolge der Aminosäuren innerhalb der Proteine übersetzt (=Translation), welche das eigentliche Genprodukt darstellen.

### Karyotyp

Der Karyotyp stellt den individuellen Chromosomensatz eines Individuums dar, der sowohl durch die Anzahl der Chromosomen, wie auch deren mikroskopische Morphologie in der mitotischen Phase geprägt wird.

### Karyogramm

Zur systematischen mikroskopischen Analyse der Chromosomen wird ein Karyogramm erstellt. In diesem werden die homologen Chromosomen paarweise angeordnet, nach ihrer Länge, Lage des Zentromers und nach dem Muster der Chromosomenbänder.

### Keimbahnmutation

Wie der Name besagt, handelt es sich hierbei um eine Mutation, die in der Keimbahn eines der Elternteile entstanden ist (Eizelle bzw. Spermium). Es besteht eine Wahrscheinlichkeit von 50%, dass die Mutation auf die Kinder weitervererbt wird. Ist dies der Fall, so ist die Mutation in allen Zellen des Kindes (auch in den Zellen der Keimbahn) nachweisbar.

### Konduktorin = Anlageträgerin

Bei X-chromosomal rezessiven Erbgängen weist eine Frau, bei der das betroffene Allel nur heterozygot vorliegt, keine klinischen Merkmale auf. Es besteht jedoch eine Wahrscheinlichkeit von 50%, dass sie das Allel an ihre Kinder weitergibt. Bei ihren Söhnen würde dies, aufgrund des fehlenden zweiten gesunden X-Chromosoms und damit des fehlenden zweiten normalen Allels, zur klinischen Ausprägung des Merkmals kommen. Während es bei ihren Töchtern nicht zur klinischen Ausprägung des Merkmals kommt, würden sie jedoch wie ihre Mutter zu Konduktorinnen (=Anlageträgerinnen).

### Kopplungsanalyse

Die **indirekte Kopplungsanalyse** ist eine Haplotypanalyse, wobei mit Hilfe von polymorphen Mikrosatelliten-Markern die Vererbung eines chromosomalen Bereichs innerhalb einer Familie verfolgt werden kann. Auch wenn innerhalb dieses Bereichs die genaue Lokalisation und Sequenz des die Krankheit verursachenden Gens unbekannt ist, kann durch die Kenntnis der Vererbung des Chromosomenbereichs indirekt auf die Vererbung der Mutation geschlossen werden. Ebenso kann bei einem bekannten Gen eine unbekannte Mutation indirekt nachgewiesen werden. Diese Vorgehensweise wird speziell dann gewählt, wenn die direkte Mutationsuche im entsprechenden Gen zu aufwändig ist.

Eine Kopplungsanalyse kann insbesondere sinnvoll sein, wenn eine direkte DNA-Diagnostik derzeit noch nicht möglich, oder ohne Ergebnis geblieben ist. Im folgenden werden Beispiele für einen sinnvollen Einsatz einer Kopplungsanalyse dargestellt.

1. Es liegt eine eindeutige klinische Diagnose vor, und die Lokalisation des entsprechenden Gens ist bekannt:

a.) Durch eine direkte Mutationsanalyse konnte die zugrunde liegende Mutation beim Indexpatienten nicht identifiziert werden. Beispiel: nach der Geburt eines Kindes mit einer Muskeldystrophie Duchenne, bei dem keine pathogene Mutation identifiziert werden konnte, kann bei einer künftigen Schwangerschaft eine pränatale Diagnostik durch eine Kopplungsanalyse durchgeführt werden.

b.) Das entsprechende Gen ist noch nicht identifiziert, oder eine Mutationsanalyse ist zu aufwändig. Beispiel: nach der Geburt eines Kindes mit einer autosomal rezessiv vererbten polyzystischen Nierenerkrankung wird die pränatale Diagnostik bei einer nachfolgenden Schwangerschaft durch eine Kopplungsanalyse möglich.

2. Bei X-chromosomalen Erkrankungen:

Gen und seine Lokalisation sind bislang nicht bekannt, aber mehrere Familienmitglieder sind von der gleichen Erkrankung betroffen. Beispiel: Familien mit mehreren Betroffenen mit Verdacht auf eine X-chromosomal vererbte mentale Retardierung. Es wird untersucht, welche Abschnitte des X-Chromosoms die Betroffenen teilen. Gegebenenfalls kann dann gezielt eine molekulargenetische Untersuchung eines Gens, das in dem entsprechenden Abschnitt liegt, durchgeführt werden.

Im Gegensatz zu einer direkten molekulargenetischen Diagnostik, ergibt eine Kopplungsanalyse in der Regel nur eine Wahrscheinlichkeit als Aussage. Je nach Art der zur Verfügung stehenden Marker, und insbesondere bei Verwendung intragenischer Marker kann die Aussage-Sicherheit dieser Methode wesentlich verbessert werden.

### Mikrodeletion

Als Mikrodeletion bezeichnet man zytogenetisch in der Regel nicht erkennbare kleine Deletionen (<2Mb). Diese können jedoch mittels FISH oder anderen molekulargenetischen Methoden nachgewiesen werden.

### Missense-Mutation

Der Basenaustausch an einer Position der DNA-Sequenz kann zum Einbau einer falschen Aminosäure in das entsprechende Protein führen.

### Monogen

Erkrankungen, die durch Mutationen in einem bestimmten Gen verursacht werden, bezeichnet man als monogene Erberkrankungen. Es existieren zur Zeit ca. 6000 solcher Erkrankungen.

## Monosomie

Der normale menschliche Chromosomensatz liegt diploid vor, das heißt, es existieren jeweils zwei homologe Chromosomen. Bei der Monosomie fehlt eines oder mehrere Chromosomen im ansonsten normalen Chromosomensatz. Bei der ebenfalls bekannten interstitiellen Monosomie fehlt nur ein Bruchstück innerhalb eines Chromosoms.

## Mutationen

### Missense-Mutation

Bei einer „missense“ Mutation kommt es zum Basenaustausch an einer Position der DNA-Sequenz, der zum Einbau einer falschen Aminosäure in das entsprechende Protein führen kann.

### Neumutation

Bei einer Neumutation ist diese Mutation nach der Befruchtung der Eizelle neu aufgetreten. Je nach dem Zeitpunkt und Stadium der Embryo- / Organogenese an dem die Mutation auftritt, resultieren unterschiedlichen Erscheinungsformen. Kommt es zu einem sehr frühen Auftreten der Mutation, werden fast alle Zellen des sich entwickelnden Individuums betroffen, einschließlich der Keimbahnzellen. In diesem Fall resultiert meistens das Vollbild der klinischen Manifestation. Bei einem späteren Auftreten der Mutation werden nur die Zellen bestimmter Gewebe betroffen. Man bezeichnet dies als eine somatische Mutation, dabei kommt es zu einem Mosaik für bestimmte. In diesem Fall sind klinisch alle Variationen von schwer bis nicht betroffen möglich.

### Nonsense-Mutation

Die Termination der Proteinbiosynthese erfolgt durch sogenannte Stop-Codons, in der abgelesenen mRNA. Erreicht der Proteinsyntheseapparat ein solches Stop-Codon, kommt es zur Termination der Proteinbiosynthese. Wird durch eine Mutation im kodierenden Bereich eines Gens ein Stop-Codon neu generiert, so kommt es zu einer vorzeitigen Termination der Proteinbiosynthese und somit zu einem verkürzten und unter Umständen funktionslosen Protein.

### Punktmutation

Beschreibt die Mutation an einem bestimmten Punkt innerhalb der DNA. Der Umfang der Mutation kann dabei den Austausch einzelner Nukleotide bis zur Deletionen oder Insertion gehen.

### Splice-Site-Mutation

Nach der Abschrift der DNA in die für die Proteinbiosynthese als Vorlage dienende messengerRNA, werden in einem Vorgang, den man als Splicing bezeichnet, die nicht informationstragenden Introns herausgeschnitten und die Exons End-zu-End miteinander verbunden. Die jeweilige genaue Schnittstelle erkennt der Splicing Apparat anhand von definierten Nukleotidabfolgen am Anfang und am Ende eines jeden Exons. Kommt es im Bereich dieser definierten Nukleotidabfolge zu einer Mutation, ist der Splice Apparat unter Umständen nicht mehr in der Lage, die reguläre Schnittstelle zu erkennen. Folglich kommt es zur Veränderung der normalen Nukleotidabfolge in der entstehenden messengerRNA und als Resultat zu einem veränderten Protein.

## Nukleotidtriplett

Folge von drei Nukleotiden (zum Beispiel CAG)

## PCR, Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR stellt eine Methode dar, bestimmte DNA in vitro zu amplifizieren. Um diese Methode durchführen zu können, müssen kleine Sequenzen von Nukleotiden (10 bis 30 Basenpaare) am Anfang und am Ende des zu amplifizierenden DNA Abschnittes bekannt sein. Mit Hilfe dieser bekannten Sequenz ist es möglich, sogenannte Primer herzustellen. Diese Primer weisen die komplementäre Sequenz von Nukleotiden zur bekannten DNA Sequenz auf und ermöglichen es so, sich im Einzelstrangstadium an die DNA zu binden. Einmal dort gebunden, bieten sie sogenannten DNA-Polymerasen die Möglichkeit von dieser



Stelle beginnend den DNA-Einzelstrang neu zu synthetisieren und dadurch einen DNA-Doppelstrang herzustellen. Während eines Durchganges wird dadurch der zwischen den zwei Primern liegende DNA-Abschnitt verdoppelt. Durch sogenannte PCR-Maschinen wird dieser Vorgang in mehreren Zyklen durchlaufen, bis ein ausreichend hoher Anteil an dem zu untersuchenden DNA-Abschnitt vorhanden ist, um weitere Experimente durchführen zu können.

### Penetranz

Beschreibt die Häufigkeit in Prozent, mit der sich ein Gen bzw. eine Mutation eines Gen im Phänotyp des Individuums manifestiert.

### Polymorphismus

Unter einem genetischen Polymorphismus versteht man das Vorkommen von zwei oder mehr unterschiedlichen Genotypen in einer Population. Der Unterschied zur Mutation liegt in diesem Fall jedoch in der Tatsache, dass es durch diesen unterschiedlichen Genotyp nicht zur Ausprägung von pathologischen Merkmalen kommt. Die unterschiedlichen Genotypen lassen sich auf DNA-Sequenzvariationen zurückführen, die zu einem gewissen Prozentsatz in der Bevölkerung vorgefunden werden und kein pathogenetisches Korrelat besitzen.

### Punktmutation

Beschreibt die Mutation an einem Punkt innerhalb der DNA. Der Mutationsmechanismus kann dabei vom Austausch einzelner Nukleotide über Deletionen bis hin zu Insertionen gehen.

### Replikation

Bei der DNA-Replikation handelt es sich um den Vorgang der exakten Duplikation der DNA. Eine Reihe spezieller Enzyme spalten den DNA-Doppelstrang auf, um dann entlang des Einzelstranges in 5'-3' Richtung einen neuen komplementären DNA-Strang zu synthetisieren. Nach der Synthese liegt die DNA dann wieder in 2 Doppelsträngen vor, so daß je ein Doppelstrang für die Mutterzelle und ein Doppelstrang für die Tochterzelle zur Verfügung steht.

### Restriktionsenzyme

Hierbei handelt es sich um DNA-Endonukleasen, also Enzymen, die innerhalb eines DNA-Stranges an eine für das jeweilige Enzym typische Nukleotidsequenz binden und an dieser Stelle den DNA-Strang durchtrennen.

### Sequenzanalyse, Sequenzierung

Automatisiertes Verfahren zur Analyse der Nukleotidabfolge von DNA-Fragmenten.

### Sequenzgelelektrophorese

Bei der Sequenzgelelektrophorese handelt es sich um eine Sonderform der Gelelektrophorese zur Analyse der Nukleotidabfolge von DNA-Fragmenten. Hierbei werden sehr kurze, einzelsträngige DNA-Fragmente (denaturierte DNA-Stränge) in einem Polyacrylamidgel, entsprechend ihrer Länge und Nukleotidsequenz aufgetrennt und nachgewiesen.

### Somatische Mutation

Kommt es nach der Befruchtung einer Eizelle zu einer Mutation, so sind in den meisten Fällen nicht alle Gewebe des entstehenden Individuums von dieser Mutation betroffen. Laut der Definition sind bei einer somatischen Mutation die Zellen der Keimbahn nicht von der Mutation betroffen.

### Somit

Bläschenartige Zellkomplexe, aus denen die Wirbel sowie große Teile der Skelettmuskulatur hervorgehen. Der Somite besteht aus einer epithelialen Wand und einem zentralen Raum, in welchem mesenchymal angeordnete Zellen liegen. Nach der Anzahl der Somiten kann man das Alter eines Embryos bestimmen.

### Southern-Blot-Hybridisierung

Die Southern-Blot-Hybridisierung ist eine Technik, um spezifische DNA-Fragmente zu detektieren und deren Größe zu analysieren. Hierzu wird meist genomische DNA mit Restriktionsenzymen in Fragmente gespalten, die mittels Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und anschließend auf eine Membran übertragen werden (Southern-Blot). Diese Membran wird dann mit einer spezifischen, radioaktiv markierten DNA-Sonde inkubiert. Bei Vorhandensein der komplementären DNA-Sequenz auf der Membran, lagert sich die Sonde an diese Sequenz an (Hybridisierung) und kann anschließend mit einer Autoradiographie dargestellt werden.

### SSCP-Analyse (single-stranded conformation polymorphism-analysis)

Die Einzelstrang-Konformationspolymorphismus-Analyse ist ein Screeningverfahren zum Nachweis von Mutationen, das auf dem unterschiedlichen elektrophoretischen Laufverhalten von Einzelstrang-DNA mit minimal unterschiedlichen Nukleotidsequenzen beruht. Für diese Untersuchung wird zunächst der interessierende DNA-Bereich (meistens einzelne Exons von Genen, die beispielsweise bei bestimmten Erkrankungen mutiert sind) mittels PCR amplifiziert. Nach der Amplifikation werden die doppelsträngigen PCR-Produkte denaturiert, um Einzelstränge zu erhalten, die dann in einer Gelelektrophorese auf ihr Laufverhalten untersucht werden. Ein Unterschied von einem einzigen Nukleotid führt schon zu einer veränderten Konformation des Einzelstranges und zu einem veränderten Laufverhalten im Gel.

### Transgene Mäuse

Transgene Mäuse sind Tiere, bei denen gentechnisch ein fremdes Gen eingepflanzt wurde. Das fremde Gen ist dann entweder in speziellen Geweben des transgenen Tieres, beispielsweise einer Maus oder eines Schafes enthalten, oder in allen Körperzellen des Tiermodells. Dies wird dadurch erreicht, daß das Fremd-Gen in die Zellen der Keimbahn eingeschleust wird, am häufigsten über die befruchtete Eizelle. Nicht immer gelingt es, daß die fremde DNA stabil von den Zellen aufgenommen wird. Dies ist nur bei etwa 15 Prozent der behandelten Tiere der Fall. Transgene Tiere werden geschaffen, um die Wirkung von Genen erforschen zu können, etwa von Krebsgenen.

### Transkription

Die Transkription ist der erste Schritt bei der Expression von Genen. Hierbei wird im Zellkern, durch einen RNA-Polymerase-Enzymkomplex, eine messengerRNA-Kopie von einem informationstragenden DNA-Abschnitt (Gen) synthetisiert. Im Zytosol der Zelle erfolgt anschließend der zweite Schritt der Gen-Expression, die Translation.

### Transkriptionsfaktor

Ein Transkriptionsfaktor ist vergleichbar einem „Schalter“ für die Aktivierung von Genen. Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die sich an bestimmte Sequenzen auf der DNA heften und dadurch das Ableasen ermöglichen. Häufig wird durch die Bindung die Raumstruktur der DNA so verändert, dass die Gene erst für die Enzymkomplexe in den Ribosomen zugänglich werden.

### Translation

Zweiter Schritt bei der Expression von Genen. Hierbei wird die bei der Transkription auf messenger-RNA übertragene Information am ribosomalen Proteinsyntheseapparat abgelesen und in die entsprechende Aminosäuresequenz übersetzt.

### Zink-Finger-Protein

Zink-Finger-Protein ist die Bezeichnung für Eiweißmoleküle mit charakteristischen Untereinheiten, die Zinkionen binden. Wie andere Metallionen-enthaltende Proteine auch, sind sie an der Zellproliferation, Gefäßneubildung, am programmierten Zelltod und an der Entstehung von Virusinfektionen beteiligt. Viele dieser Proteine sind in der Lage, an die DNA im Zellkern zu binden, und damit die Expression von Genen zu steuern. Solche Proteine werden auch als Transkriptionsfaktoren bezeichnet: sie regeln die Übertragung der genetischen Information in die Struktur von Eiweißmolekülen. Innerhalb eines Proteins sind meist mehrere Zink-Finger-Strukturen vorhanden.

Verschiedene Genforschungsgruppen versuchen inzwischen besondere Zink-Finger-Proteine zu synthetisieren, die bestimmte Regionen auf der Doppelstrang-DNA erkennen und daran binden. Solche Proteine könnten gentherapeutisch genutzt werden.

Andere Zink-Finger-Proteine heften sich nicht an Gene, sondern an Eiweißmoleküle und beeinflussen dadurch deren Aktivität. Chelatbildende, also komplexbildende Moleküle, könnten in Zukunft als pharmakologisch wirksame Substanzen genutzt werden, etwa zur Prävention und Behandlung von Krebs oder Virusinfektionen, beispielsweise mit dem AIDS-Erreger HIV. Möglicherweise lassen sich Virusübertragungen ganz verhindern, indem die viralen Zink-Finger-Proteine beeinflusst werden.

TABELLE 1 INZIDENZ ANGEBORENER HERZ- UND GEFÄßFEHLBILDUNGEN BEI 38 PATIENTEN MIT HETEROTAXIE (COHEN, 2007).....	11
TABELLE 2 MORPHOLOGIE DER HERZ- UND GEFÄßFEHLBILDUNGEN BEI HOMOZYGOTEN IV-MÄUSEN (ICARDO, 1991).....	14
ABBILDUNG 1 DURCH ZILLENROTATION ERZEUGTER "NODAL-FLOW".....	15
ABBILDUNG 2 KASKADENARTIGE AKTIVIERUNG UND ASYMMETRISCHE EXPRESSION DER „KRITISCHEN GENE“ BEI DER ENTSTEHUNG DER LATERALISATION BEI MAUS UND HUHN (ZHU, 2006).....	16
ABBILDUNG 3 LOKALISATION DES INV-GENS AUF CHROMOSOM 4 DER MAUS.....	18
TABELLE 3 INZIDENZ DER HERZ- UND GEFÄßFEHLBILDUNGEN BEI HOMOZYGOTEN (INV / INV) INV-MÄUSEN (MORISHIMA, 1998).....	19
VERGLEICH DER HOMOLOGIE ZWISCHEN DEN GENPRODUKTEN INV (MENSCH, OBERE ZEILE) UND INV (MAUS, UNTERE ZEILE) AUF PROTEINEBENE. STERNE UNTERHALB DER ZEILEN MARKIEREN HOMOLOGIE ZWISCHEN DEN PROTEINEN VON MENSCH UND MAUS. ....	21
ABBILDUNG 4 LOKALISATION DES NODAL-GENS AUF CHROMOSOM 10 DES MENSCHEN.....	22
ABBILDUNG 5 CHROMOSOM 1 DES MENSCHEN (ABBILDUNG AUS DER „ENSEMBL PROJECT“-DATENBANK).....	24
ABBILDUNG 6 LOKALISATION DER LEFTY1 (=LEFTYA)- UND LEFTY2 (=LEFTYB)-ANALOGEN GENE AUF DEM CHROMOSOM 1 DES MENSCHEN (ABBILDUNG AUS DER „ENSEMBL PROJECT“-DATENBANK).....	24
TABELLE 4 INZIDENZ DER HERZ- UND GEFÄßFEHLBILDUNGEN BEI MÄUSEN MIT HOMOZYGOTER "CRYPTIC"-MUTATION (YAN, 1999).....	26
ABBILDUNG 7 CHROMOSOM 2 DES MENSCHEN (ABBILDUNG AUS DER „ENSEMBL PROJECT“-DATENBANK).....	27
ABBILDUNG 8 LOKALISATION DES CFC1-GENS AUF CHROMOSOM 2 DES MENSCHEN (ABBILDUNG AUS DER „ENSEMBL PROJECT“-DATENBANK).....	27
TABELLE 5 INZIDENZ DER HERZ- UND GEFÄßFEHLBILDUNGEN BEI MUTATION DES CFC1-GENS DES MENSCHEN (BAMFORD, 2000).....	28
ABBILDUNG 9 CHROMOSOM 3 DES MENSCHEN (ABBILDUNG AUS DER „ENSEMBL PROJECT“-DATENBANK).....	29
ABBILDUNG 10 LOKALISATION DES HACTR-IIB-GENS (=ACVR2B-GEN) AUF CHROMOSOM 3 DES MENSCHEN (ABBILDUNG AUS DER „ENSEMBL PROJECT“-DATENBANK).....	29
ABBILDUNG 11 CHROMOSOM 6 DES MENSCHEN (ABBILDUNG AUS DER „ENSEMBL PROJECT“-DATENBANK).....	31
ABBILDUNG 12 LOKALISATION DES CONNEXIN43-GENS AUF CHROMOSOM 6 DES MENSCHEN (ABBILDUNG AUS DER „ENSEMBL PROJECT“-DATENBANK).....	31
ABBILDUNG 13 X-CHROMOSOM DES MENSCHEN (ABBILDUNG AUS DER „ENSEMBL PROJECT“-DATENBANK).....	35
ABBILDUNG 14 LOKALISATION DES ZIC3-GENS AUF DEM X-CHROMOSOM DES MENSCHEN (ABBILDUNG AUS DER „ENSEMBL PROJECT“-DATENBANK).....	35
ABBILDUNG 15 CHROMOSOM 9 DES MENSCHEN (ABBILDUNG AUS DER „ENSEMBL PROJECT“-DATENBANK).....	38
ABBILDUNG 16 LOKALISATION DES INV-GENS AUF CHROMOSOM 9 DES MENSCHEN (ABBILDUNG AUS DER „ENSEMBL PROJECT“-DATENBANK).....	38
ABBILDUNG 17 LOKALISATION DES INV-GENS AUF CHROMOSOM 9 DURCH FISH.....	39
LINKS: LOKALISATION DES INV-GENS AUF BEIDEN CHROMOSOMEN 9 MITTELS FISH („FLOURESCENCE IN SITU HYBRIDISATION“)......	39
RECHTS: IDEOGRAMM DES CHROMOSOM 9 MIT KENNZEICHNUNG DER LOKALISATION DES INV-GENS INNERHALB DES CHROMOSOMS (9q22.3-q31.1) (SCHÖN ET AL. 2002).....	39
ABBILDUNG 19 INV-GEN MIT 16 EXON-SEQUENZEN.....	40
(EXON-SEQUENZEN SCHWARZ EINGEFÄRBT, NUMMER UNTERHALB DES EXON BEZEICHNET DIE GRÖÖE IN NUKLEOTIDEN).....	40
ABBILDUNG 20 INV-PROTEIN MIT DEN INV-GEN DOMÄNEN.....	40
(ANKYRIN-DOMÄNEN = ROT KARIERT, IQ-DOMÄNEN = SCHWARZ KARIERT, NLS-BP-DOMÄNEN = GRÜN KARIERT).....	40
ABBILDUNG 20 ANKYRIN MOTIV (SEDGWICK ET AL. 1999).....	41
ABBILDUNG 21 VERGLEICH DER HOMOLOGIE DER AMINOSÄUREN ZWISCHEN INV (MENSCH) UND INV (MAUS).....	42
IDENTISCHE AMINOSÄUREN SIND SCHWARZ, ÄHNLICHE GRAU HINTERLEGT. DIE 16 ANKYRIN WIEDERHOLUNGEN SIND DURCH HORIZONTALE MARKIERUNGEN GEKENNZEICHNET. DIE IQ DOMÄNEN SIND DURCH HORIZONTALE MARKIERUNGEN MIT GESCHLOSSENEN PFEILENDE, NLS-BP DOMÄNEN DURCH HORIZONTALE MARKIERUNGEN MIT OFFENEN PFEILENDE GEKENNZEICHNET (BLAST SEQUENCE SIMILARITY SEARCH). ZU BEACHTEN IST DIE HOHE KONSERVIERUNG IM BEREICH DER ERSTEN HÄLFTE DER PEPTIDE, DIE DEN GESAMTEN ANKYRIN BEREICH BEINHÄLTET (SCHÖN ET AL. 2002).....	42
ABBILDUNG 22 EXPRESSION VON INV IN ADULTEN GEWEBEN.....	43
NORTHERN BLOT VON ADULTEM GEWEBE HYBRIDISIERT MIT INV-cDNA PROBEN. UNTERSCHIEDLICH STARKE BANDEN MIT CA. 4KB IN NAHEZU ALLEN GEWEBEN NACHWEISBAR. DIE KÜRZERE BANDE IN DER LEBER	

DEUTET AUF EINE SPLICING-ISOFORM. ALS KONTROLLE WURDE DERSELBE BLOT MIT EINER BETA-ACTIN PROBE HYBRIDISIERT. LINKSSEITIG IST DIE POSITION DER BANDEN MARKIERT. (SCHÖN ET AL. 2002).....	43
ABBILDUNG 23 CALMODULIN (LINKS OHNE CA-BINDUNG; RECHTS MIT CA-BINDUNG; DAVID S. GOODSSELL OF THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE).....	44
ABBILDUNG 24 NLS-BP BINDUNGSSTELLEN NLS1 UND NLS2 ("NUCLEAR LOCALIZATION SIGNAL BIPARTITE" AUS „STRUCTURE AND NUCLEAR IMPORT FUNCTION OF THE C-TERMINAL DOMAIN OF INFLUENZA VIRUS POLYMERASE PB2 SUBUNIT“ TARENDEAU ET AL.....	45
TABELLE 6 TABELLENLEGENDE PATIENTENGRUPPE.....	48
TABELLE 7 PATIENTENGRUPPE.....	50
ABBILDUNG 26 EXPERIMENTELLER STUDIENABLAUF.....	57
ABBILDUNG 27 AGAROSE GELELEKTROPHORESE.....	59
ABBILDUNG 28 SSCP POLYACRYLAMID GEL.....	60
ABBILDUNG 28 BEISPIEL EINER DNA-SEQUENZIERUNG.....	62
ABBILDUNG 30 DNA-SPALTUNG DURCH RESTRIKTIONSENZYM; 1. DIE DARGESTELLTE DNA-SEQUENZ ENTHÄLT DIE FÜR ECORI SPEZIFISCHE SCHNITTSTELLESEQUENZ DER NUKLEOTIDE GAATTC, 2. SPALTUNG DER DNA DURCH DAS RESTRIKTIONSENZYM ECORI AN SPEZIFISCHER STELLE, 3. GESPALTENE DNA.....	66
ABBILDUNG 32 A NORMALE NUKLEOTIDSEQUENZ OHNE SCHNITTSTELLE FÜR ECORI B DURCH PUNKTMUTATION (BASENAUSTAUSCH T→G) NEU ENTSTANDENE SCHNITTSTELLE FÜR ECORI.....	67
ABBILDUNG 32 SPLICING; A DNA MIT KODIERENDEN (= EXON) UND NICHT KODIERENDEN (= INTRON) SEQUENZEN, NORMALE LAGE DER KONSENSUSSEQUENZEN (DONOR- UND AKZEPTORSTELLEN); B NACH UMSCHREIBEN DER DNA IN EIN PRIMÄRES RNA-TRANSKRIPT ERFOLGT VOR VERLASSEN DES ZELLKERNS DAS SPLICING MIT HERAUSSCHNEIDEN DER NICHT KODIERENDEN SEQUENZEN (= INTRON) UND ZUSAMMENFÜGEN DER KODIERENDEN SEQUENZEN (= EXON) AN DEN KONSENSUS-SEQUENZEN (GT – QUENY0	
ABBILDUNG 34 STAMMBAUM DER MUTATIONSTRAGENDEN FAMILIE (LEGENDE: QUADRAT = MÄNNLICH, KREIS = WEIBLICH, DOPPELSTRICH = KONSANGUNITÄT, QUERSTRICH = PATIENT VERSTORBEN, SCHWARZE FÜLLUNG = TRÄGER DER MUTATION).....	71
ABBILDUNG 35 ALTERNATIVE SPLICINGFORMEN DURCH PUNKTMUTATION (ROTER PFEIL); A ALTERNATIVE 1: DURCH DIE PUNKTMUTATION (BASENAUSTAUSCH T → C) KOMMT ES ZUM VERLUST DER KONSENSUS-SEQUENZ (= DONORSTELLE) ZWISCHEN EXON 13 UND EXON 14, BEIM FOLGENDEN SPLICING WIRD ZUSÄTZLICH ZU DEN FLANKIERENDEN INTRON-SEQUENZEN EXON 13 VOLLSTÄNDIG ENTFERNT UND EXON 12 MIT EXON 14 VERBUNDEN; B ALTERNATIVE 2: BEIM FOLGENDEN SPLICING WIRD ZUSÄTZLICH ZU DEN FLANKIERENDEN INTRON-SEQUENZEN EXON 13 UND EIN TEIL VON EXON 14 VOLLSTÄNDIG ENTFERNT UND EXON 12 MIT EINER ARTIFIZIELLEN DONORSTELLE (GRÜN) INNERHALB EXON 14 VERBUNDEN.....	73
ABBILDUNG 36 A STAMMBAUM DER MUTATIONSTRAGENDEN FAMILIE; B DARSTELLUNG DER MUTATION (BASENAUSTAUSCH T → C = ROTER PFEIL) DURCH SEQUENZIERUNGSREAKTION (K=KONTROLL-DNA, M=MUTATIONSTRAGENDE DNA; DASS „N“ IN DER MUTATIONSTRAGENDEN DNA IST TECHNISCH BEDINGT UND BEZEICHNET NICHT DAS NUKLEOTID, SONDERN WEIST AUF EINEN UNTERSCHIED ZWISCHEN BEIDEN ANGEZEIGTEN DNA-SEQUENZEN HIN); C GELELEKTROPHORESE NACH PCR AUF DNA-EBENE MIT DARSTELLUNG DER UNTERSCHIEDLICHEN DNA-FRAGMENTE DURCH ALTERNATIVES SPLICING (NORMALE BANDE MIT 572 BP = SCHWARZER PFEIL, ALTERNATIVE BANDEN MIT 288 BP UND 239 BP = ROTE PFEILE); D LOKALISATION DER PUNKTMUTATION ZWISCHEN EXON 13 UND EXON 14 (ROTER PFEIL).....	74
ABBILDUNG 37 VERLUST VON DOMÄNEN DURCH ALTERNATIVES SPLICING; A ALTERNATIVE 1: DURCH DIE ALTERNATIVE SPLICINGFORM UND VERLUST VON EXON 13 KOMMT ES ZUM VERLUST EINER IQ-DOMÄNE (SCHWARZ KARIERT) UND BEIDER NLS-BP-DOMÄNEN (GRÜN KARIERT); B ALTERNATIVE 2: DURCH VERLUST VON EXON 13 UND PARTIELL EXON14 KOMMT ES ZUM VERLUST EINER IQ-DOMÄNE (SCHWARZ KARIERT) UND BEIDER NLS-BP-DOMÄNEN (GRÜN KARIERT).....	75

## 7. Literaturverzeichnis

1. Afzelius, B. A. (1976). A human syndrome caused by immotile cilia. *Science* , 193 (4250), 317-319.
2. Afzelius, B. A. (1981). Genetical and ultrastructural aspects of the immotile-cilia syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* , 33 (6), 852-864.
3. Afzelius, B. A. (1978). Kartageners syndrome does exist. *Lancet* , 2 (8096), 950.
4. Afzelius, B. A. (1979). The immotile-cilia syndrome and other ciliary diseases. *International review of experimental pathology* , 19, 1-43.
5. Alonso, S. (1995). Heterotaxia syndrome and autosomal dominant inheritance. *Am J Med Genet* , 56 (1), 12-15.
6. Andelfinger, G. (2008). Genetic factors in congenital heart malformation. *Clin Genet* , 73 (6), 516 - 527.
7. Aruga, J. (1994). A novel zinc finger protein, zic, is involved in neurogenesis, especially in the cell lineage of cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* , 63 (5), 1880-1890.
8. Aruga, J. (1996). The mouse zic gene family. Homologues of the Drosophila pair-rule gene odd-paired. *J. Biol. Chem.* , 271 (2), 1043-1047.
9. Aylsworth, A. S. (2001). Clinical aspects of defects in the determination of laterality. *Am J Med Genet* , 101 (4), 345 - 355.
10. Bacha, E. A. (2005). Hybrid pediatric cardiac surgery. *Pediatr Cardiol* , 26 (4), 315 - 322.
11. Bacha, E. A. (2005). Hybrid procedures in pediatric cardiac surgery. *Seminars in thoracic and cardiovascular surgery: Pediatric cardiac surgery annual* , 78 - 85.
12. Bamford, R. N. (2000). Loss-of-function mutations in the EGF-CFC gene CFC1 are associated with human left-right laterality defects. *Nature Genetics* , 26 (3), 365-369.
13. Bartrukova, M. A. (2000). Ankyrin: structure, properties, and functions. *Biochemistry Mosc.* , 65 (4), 395-408.
14. Beckmann, J. S. (1996). The Réunion paradox and the digenic model. *Am. J. Hum. Genet.* , 59 (6), 1400-1402.
15. Benditt, J. O. (1989). Interaction of a nuclear location signal with isolated nuclear envelopes and identification of signal-binding proteins by photoaffinity labeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 86 (23), 9327-9331.
16. Borghi, A. (2007). The grown-up congenital cardiac patient. *Journal of cardiovascular medicine* , 8 (1), 78 - 82.
17. Britz-Cunningham, S. H. (1995). Mutations of the Connexin43 gap-junction gene in patients with heart malformations and defects of laterality. *N. Engl. J. Med.* , 332 (20), 1323-1229.

18. Brueckner, M. (1991). Establishment of left-right asymmetry in vertebrates: genetically distinct steps are involved. *Ciba Found Symp* , 162, 202-212.
19. Brueckner, M. (1989). Linkage mapping of a mouse gene, *iv*, that controls left-right asymmetry of the heart and viscera. *Proc Natl Acad Sci USA* , 86 (13), 5035-5038.
20. Buceta, J. (2005). Nodal cilia dynamics and the specification of the left/right axis in early vertebrate embryo development. *Biophysical Journal* , 89 (4), 2199-2209.
21. Campione, M. (1999). The homeobox gene *Pitx2*: mediator of asymmetric left-right signaling in vertebrate heart and gut looping. *Development* , 126 (6), 1225-1234.
22. Carminati, M. (2007). Transcatheter closure of congenital ventricular septal defects: results of the European Registry. *Eur Heart J* , 28 (19), 2361 - 2368.
23. Casey, B. (1996). Autosomal dominant transmission of familial laterality defects. *Am J Med Genet* , 61 (4), 325 - 328.
24. Casey, B. (1995). Connexin43 mutations in sporadic and familial defects of laterality. *N. Engl. J. Med.* , 333 (14), 941-942.
25. Casey, B. (1993). Mapping a gene for familial situs abnormalities to human chromosome Xq24-q27.1. *Nature Genetics* , 5 (4), 403-407.
26. Casey, B. (1998). Two rights make a wrong: human left-right malformations. *Human Molecular Genetics* , 7 (10), 1565 - 1571.
27. Cohen, M. S. (2007). Controversies, genetics, diagnostic assessment, and outcomes relating to the heterotaxy syndrome. *CTY* , 17 (2), 29 - 43.
28. Collignon, J. (1996). Relationship between asymmetric nodal expression and the direction of embryonic turning. *Nature* , 381 (6578), 155-158.
29. Condie, B. G. (1994). Mice with targeted disruptions in the paralogous genes *hoxa-3* and *hoxd-3* reveal synergistic interactions. *Nature* , 370 (6487), 304-307.
30. Debrus, S. (1997). Lack of evidence for connexin 43 gene mutations in human autosomal recessive lateralization defects. *J. Mol. Cell Cardiol.* , 29 (5), 1423-1431.
31. Diab, K. A. (2005). A truly hybrid approach to periventricular closure of multiple muscular septal defects. *J Thorac Cardiovasc Surg* , 130 (3), 892 - 893.
32. Essner, J. J. (2005). Kupffers vesicle is a ciliated organ of asymmetry in the zebrafish embryo that initiates left-right development of the brain, heart and gut. *Development* , 132 (6), 1247-1260.
33. Ferrero, G. B. (1997). A submicroscopic deletion in Xq26 associated with familial situs ambiguus. *Am J Hum Genet* , 61 (2), 395 - 401.
34. Fishman, G. I. (1990). Molecular characterization and functional expression of the human cardiac gap junction channel. *J. Cell Biol.* , 111 (2), 589-598.
35. Fratz, S. (2008). Routine clinical cardiovascular magnetic resonance in paediatric and adult congenital heart disease: patients, protocols, questions asked and contributions made. *Journal of cardiovascular magnetic resonance: official*



- journal of the Society for Cardiovascular Magnetic Resonance* , 10 (1), 46.
36. Frigiola, A. (24. März 2009). Percutaneous pulmonary valve replacement. *Coron Artery Dis* .
  37. Fujinaga, M. (1997). Development of sidedness of asymmetric body structures in vertebrates. *Int. J. Dev. Biol.* , 41 (2), 153 - 186.
  38. Gebbia, M. (1996). Failure to detect connexin43 mutations in 38 cases of sporadic and familial heterotaxy. *Circulation* , 94 (8), 1909-1912.
  39. Gebbia, M. (1997). X-linked situs abnormalities result from mutations in ZIC3. *Nat Genet* , 17 (3), 305 - 308.
  40. Gilbert, E. F. (1958). Congenital malformations of the heart associated with splenic agenesis: with a report of five cases. *Circulation* , 17 (1), 72 - 86.
  41. Handel, M. A. (1984). Situs inversus in homozygous mice without immotile cilia. *J. Hered.* , 75 (6), 498.
  42. Harvey, R. P. (1998). Links in the left/right axial pathway. *Cell* , 94 (3), 273-276.
  43. Heldin, C. H. (1997). TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* , 390 (6659), 465-471.
  44. Hirokawa, N. (2006). Nodal flow and the generation of left-right asymmetry. *Cell* , 125 (1), 33-45.
  45. Hoess, K. (2002). Genetic counseling for congenital heart disease: new approaches for a new decade. *Current cardiology reports* , 4 (1), 68 - 75.
  46. Hummel, K. P. (1959). Developmental anomalies in mice resulting from action of the gene, disorganization, a semi-dominant lethal. *Pediatrics* , 23 (1), 212-221.
  47. Icardo, J. M. (1991). Spectrum of heart malformations in mice with situs solitus, situs inversus, and associated visceral heterotaxy. *Circulation* , 84 (6), 2547-2558.
  48. Ishikawa, S. (1998). Genomic organization and mapping of the human activin receptor type IIB (hActR-IIB) gene. *J. Hum. Genet.* , 43 (2), 132-134.
  49. Ivemark, B. I. (1955). Implications of agenesis of the spleen on the pathogenesis of conotruncus anomalies in childhood; an analysis of the heart malformations in the splenic agenesis syndrome, with fourteen new cases. *Acta paediatrica Supplementum* , 44 (104), 7 - 110.
  50. Jacobs, J. P. (2007). The nomenclature, definition and classification of cardiac structures in the setting of heterotaxy. *CTY* , 17 (2), 1 - 28.
  51. Jones, C. M. (1995). Nodal-related signals induce axial mesoderm and dorsalize mesoderm during gastrulation. *Development* , 121 (11), 3651-3662.
  52. Kaemmerer, H. (2000). Imaging in adults with congenital cardiac disease (ACCD). *The thoracic and cardiovascular surgeon* , 48 (6), 328 - 335.
  53. Kajiwar, K. (1994). Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and ROM1 loci. *Science* , 264 (5165), 1604-1608.

54. Kingsley, D. M. (1994). The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes & Development* , 8 (2), 133-146.
55. Kosaki, K. (1999). Characterization and mutation analysis of human LEFTY A and LEFTY B, homologues of murine genes implicated in left-right axis development. *Am. J. Hum. Genet.* , 64 (3), 712-721.
56. Kosaki, K. (1998). Genetics of human left-right axis malformation. *Seminars in Cell & Developmental Biology* , 9 (1), 89 - 99.
57. Kosaki, R. (1999). Left-right axis malformation associated with mutations in ACVR2B, the gene for human activin receptor type IIB. *Am. J. Med. Genet.* , 82 (1), 70-76.
58. Krawczak, M. (2007). Single base-pair substitutions in exon-intron junctions of human genes: nature, distribution, and consequences for mRNA splicing. *Hum. Mutat.* , 28 (2), 150-158.
59. Krawczak, M. (1992). The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Human Genetics* , 90 (1-2), 41-54.
60. Layton, W. M. (1976). Random determination of a developmental process: reversal of normal visceral asymmetry in the mouse. *J. Hered.* , 67 (6), 336-338.
61. Lee, J. D. (2008). Morphogenesis of the node and notochord: The cellular basis for the establishment and maintenance of left-right asymmetry in the mouse. *Dev. Dyn.* , 237 (12), 3464-3476.
62. Lemyre, E. (2007). Catch me if you can: tracking down the genetic origins of congenital heart disease. *European Heart Journal* , 28 (22), 2701 - 2702.
63. Levin, M. (1995). A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis. *Cell* , 82 (5), 803-814.
64. Levin, M. (1998). Left-right asymmetry in the chick embryo. *Seminars in Cell & Developmental Biology* , 9 (1), 67 - 76.
65. Lowe, L. A. (1996). Conserved left-right asymmetry of nodal expression and alterations in murine situs inversus. *Nature* , 381 (6578), 158-161.
66. Männer, J. (2008). The anatomy of cardiac looping: A step towards the understanding of the morphogenesis of several forms of congenital cardiac malformations. *Clinical anatomy* .
67. Marszalek, J. R. (1999). Situs inversus and embryonic ciliary morphogenesis defects in mouse mutants lacking the KIF3A subunit of kinesin-II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 96 (9), 5043-5048.
68. Massagué, J. (1996). Serine / threonine kinase receptors: mediators of transforming growth factor beta family signals. *Cancer Surv.* , 27, 41-64.
69. McGrath, J. (1992). Duplication / deficiency mapping of situs inversus viscerum (iv), a gene that determines left-right asymmetry in the mouse. *Genomics* , 14 (3), 643-648.
70. McQuinn, T. C. (2001). Cardiopulmonary malformations in the inv/inv mouse. *Anat. Rec.* , 263 (1), 62-71.

71. Mégarbané, A. (2000). X-linked transposition of the great arteries and incomplete penetrance among males with a nonsense mutation in ZIC3. *Eur. J. Hum. Genet.* , 8 (9), 704-708.
72. Meno, C. (1996). Left-right asymmetric expression of the TGF beta-family member lefty in mouse embryos. *Nature* , 381 (6578), 151-155.
73. Meno, C. (1996). Left-right asymmetric expression of the TGF-beta-family member lefty in mouse embryos. *Nature* , 381 (6578), 151 - 155.
74. Meno, C. (1998). lefty-1 is required for left-right determination as a regulator of lefty-2 and nodal. *Cell* , 94 (3), 287-297.
75. Meno, C. (1997). Two closely-related left-right asymmetrically expressed genes, lefty-1 and lefty-2: their distinct expression domains, chromosomal linkage and direct neuralizing activity in Xenopus embryos. *Genes Cells* , 2 (8), 513-524.
76. Mercola, M. (1999). Embryological basis for cardiac left-right asymmetry. *Seminars in Cell & Developmental Biology* , 10 (1), 109-116.
77. Mital, O. P. (1974). Situs inversus (totalis) among two brothers: a case report. *The Indian journal of chest diseases* , 16 (3), 188 - 190.
78. Mitchell, M. E. (2007). The molecular basis of congenital heart disease. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* , 19 (3), 228 - 237.
79. Mochizuki, T. (1998). Cloning of inv, a gene that controls left/right asymmetry and kidney development. *Nature* , 395 (6698), 177-181.
80. Moller, J. H. (1967). Congenital cardiac disease associated with polysplenia. A development complex of bilateral "left-sidedness". *Circulation* , 36 (5), 789 - 799.
81. Morell, R. (1997). Apparent digenic inheritance of Waardenburg syndrome type 2 (WS2) and autosomal recessive ocular albinism (AROA). *Human Molecular Genetics* , 6 (5), 659-664.
82. Morgan, D. (1998). Inversin, a novel gene in the vertebrate left-right axis pathway, is partially deleted in the inv mouse. *Nature Genetics* , 20 (2), 149-156.
83. Morishima, M. (1998). Siuts variation and cardiovascular anomalies in the transgenic mouse insertional mutation, inv. *Teratology* , 57 (6), 302-309.
84. Nakamura, T. (2006). Generation of robust left-right asymmetry in the mouse embryo requires a self-enhancement and lateral-inhibition system. *Developmental Cell* , 11 (4), 495-504.
85. Nomura, M. (1998). Smad2 role in mesoderm formation, left-right patterning and craniofacial development. *Nature* , 393 (6687), 786-790.
86. Nonaka, S. (2002). Determination of left-right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow. *Nature* , 418 (6893), 96-99.
87. Nonaka, S. (1998). Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell* , 95 (6), 829-837.

88. Oh, S. P. (1997). The signaling pathway mediated by the type IIB activin receptor controls axial patterning and lateral asymmetry in the mouse. *Genes & Development* , 11 (4), 1812-1826.
89. Okada, Y. (1999). Abnormal nodal flow precedes situs inversus in iv and inv mice. *Mol Cell* , 4 (4), 459-468.
90. Okada, Y. (2005). Mechanism of nodal flow: a conserved symmetry breaking event in left-right axis determination. *Cell* , 121 (4), 633-644.
91. Peoples, W. M. (1983). Polysplenia: a review of 146 cases. *Pediatric Cardiology* , 4 (2), 129 - 137.
92. Purandare, S. M. (2002). A complex syndrome of left-right axis, central nervous system and axial skeleton defects in ZIC3 mutant mice. *Development* , 129 (9), 2293-2302.
93. Putkey, J. A. (2003). A new role for IQ motif proteins in regulating calmodulin function. *J. Biol. Chem.* , 278 (50), 49667-49670.
94. Putkey, J. A. (2008). Acidic / IQ motif regulator of calmodulin. *J. Biol. Chem.* , 283 (3), 1401-1410.
95. Rancourt, D. E. (1995). Genetic interaction between *hoxb-5* and *hoxb-6* is revealed by nonallelic noncomplementation. *Genes & Development* , 9 (1), 108-122.
96. Rebergen, S. A. (2000). Congenital heart disease. Evaluation of anatomy and function by MRI. *Herz* , 25 (4), 365 - 383.
97. Rubtsov, A. M. (2000). Ankyrins. *FEBS Lett* , 482 (1-2), 1-5.
98. Schön, P. (2002). Identification, genomic organization, chromosomal mapping and mutation analysis of the human INV gene, the ortholog of a murine gene implicated in left-right axis development and biliary atresia. *Human Genetics* , 110 (2), 157-165.
99. Schweickert, A. (2007). Cilia-driven leftward flow determines laterality in *Xenopus*. *Curr. Biol.* , 17 (1), 60-66.
100. Sedgwick, S. G. (1999). The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends Biochem. Sci.* , 24 (8), 311-316.
101. Shen, M. M. (1997). A differential display strategy identifies Cryptic, a novel EGF-related gene expressed in the axial and lateral mesoderm during mouse gastrulation. *Development* , 124 (2), 429-442.
102. Somerville, J. (2001). Grown-up congenital heart disease--medical demands look back, look forward 2000. *The Thoracic and cardiovascular surgeon* , 49 (1), 21 - 26.
103. Splitt, M. P. (1995). Connexin43 mutations in sporadic and familial defects of laterality. *N. Engl. J. Med.* , 333 (14), 941-942.
104. Sulik, K. (1994). Morphogenesis of the murine node and notochordal plate. *Dev Dyn* , 201 (3), 260-278.
105. Supp, D. M. (1997). Mutation of an axonemal dynein affects left-right asymmetry in *inversus viscerum* mice. *Nature* , 389 (6654), 963-966.

106. Supp, D. M. (1999). Targeted deletion of the ATP binding domain of left-right dynein confirms its role in specifying development of left-right asymmetries. *Development* , 126 (23), 5495-5504.
107. Taber, L. A. (2006). Biophysical mechanisms of cardiac looping. *Int. J. Dev. Biol.* , 50 (2), 323 - 332.
108. Taber, L. A. (1995). Mechanics of cardiac looping. *Dev Dyn* , 203 (1), 42 - 50.
109. Takeda, S. (1999). Left-right asymmetry and kinesin superfamily protein KIF3A: new insights in determination of laterality and mesoderm induction by kif3A<sup>-/-</sup> mice analysis. *J. Cell Biol* , 145 (4), 825-836.
110. Tóth, T. (1998). Connexin43 gene mutations and heterotaxy. *Circulation* , 97 (1), 117-118.
111. Ware, S. M. (2006). Heart defects in X-linked heterotaxy: evidence for a genetic interaction of *Zic3* with nodal signaling pathway. *Dev. Dyn.* , 235 (6), 1631-1637.
112. Ware, S. M. (2004). Identification and functional analysis of *ZIC3* mutations in heterotaxy and related congenital heart defects. *Am. J. Hum. Genet.* , 74 (1), 93-105.
113. Winlaw, D. (2007). Congenital heart disease in the 21st century. *Critical care and resuscitation: journal of the Australasian Academy of Critical Care Medicine* , 9 (3), 270 - 274.
114. Woodard, P. K. (2008). Cardiac MRI in the management of congenital heart disease in children, adolescents, and young adults. *Current treatment options in cardiovascular medicine* , 10 (5), 419 - 424.
115. Yan, Y. T. (1999). Conserved requirement for EGF-CFC genes in vertebrate left-right axis formation. *Genes & Development* , 13 (19), 2527-2537.
116. Yasuhiko, Y. (2001). Calmodulin binds to *inv* protein: implication for the regulation of *inv* function. *Dev. Growth Differ.* , 43 (6), 671-681.
117. Yasuhiko, Y. (2006). Isolation and characterization of *Xenopus laevis* homologs of the mouse *inv* gene and functional analysis of the conserved calmodulin binding sites. *Cell Res.* , 16 (4), 337-346.
118. Yokoyama, T. (1993). Reversal of left-right asymmetry: a situs inversus mutation. *Science* , 260 (5108), 679-682.
119. Zhou, X. (1993). Nodal is a novel TGF-beta-like gene expressed in the mouse node during gastrulation. *Nature* , 361 (6412), 543-547.
120. Zhu, L. (2006). Genetics of human heterotaxias. *Eur. J. Hum. Genet.* , 14 (1), 17-25.
121. Zhu, L. (2007). Identification of a novel role of *ZIC3* in regulating cardiac development. *Human Molecular Genetics* , 16 (14), 1649-1660.

### **Danksagung**

Frau Dr. med. Sauer danke ich für die bestmögliche Unterstützung und aufopferungsvolle Betreuung bei den vielen gemeinsamen Stunden für diese Arbeit sowie ihrer kritischen doch stets konstruktiven Teilnahme bei der Fertigstellung dieser Dissertation.

Herrn Professor Dr. med. Hess möchte ich für die hervorragende Betreuung und Motivation bei der Durchführung dieser Arbeit danken.

Herrn Dr. med., Dr. rer. nat. Bouvagnet gilt mein Dank für die strukturierte und qualifizierte Einarbeitung in die molekularbiologischen Arbeits- und Denkweisen in seinem Labor sowie der herzlichen Aufnahme in seinem Haus während der gesamten Arbeit.

Ein besonderer Dank geht an meine Mutter.