

Aus dem Medizinischen Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde  
Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie  
am Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
Abteilungsleiter: Prof. Dr. Dr. K.-H. Austermann

**Assoziationsstudien für die Kandidatengene  
*MTHFR* und *TGF $\alpha$*  mit nicht-syndromalen  
Lippen-Kiefer-Gaumenspalten und Gaumenspalten**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin

dem Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Anke Selle  
aus Hildesheim

Marburg 2001

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg am 23. Mai 2002.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches.

Dekan: Prof. Dr. Arnold

Referent: Prof. Dr. Dr. W. Hochban

Coreferent: PD Dr. Bacher

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Ätiologie der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten	2
1.1.1 Formale Genese	2
1.1.2 Kausale Genese	3
1.2 Kandidatengene	3
1.2.1 Kandidatengen 5,10-Methylentetrahydrofolat-Reduktase ( <i>MTHFR</i> )	4
1.2.2 Kandidatengen Wachstumsfaktor alpha ( <i>TGF<math>\alpha</math></i> )	6
1.3 Ziele der Arbeit	8
<b>2. Probanden</b>	<b>9</b>
2.1 Auswahl der Probanden	9
2.1.1 Patienten und Familien	9
2.1.2 Kontrollpersonen	10
2.2 Klinisches Bild und Klassifikation der Lippen-Kiefer- Gaumenspalten	11
2.2.1 Erscheinungsformen	11
2.2.2 Nomenklatur	13
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>15</b>
3.1 Material	15
3.1.1 Chemikalien	15
3.1.2 Geräte	15
3.1.3 Software	15
3.2 Methoden	16
3.2.1 DNA- Isolierung aus Leukozyten	16
3.2.2 DNA- Konzentrationsbestimmung	17
3.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)	17
3.2.3.1 Standard- PCR- Bedingungen	18
3.2.3.2 Agarose-Gelelektrophorese zur Überprüfung der PCR-Produkte	19
3.2.4 Nachweis der Punktmutation 677C→T im <i>MTHFR</i> - Gen	20
3.2.4.1 Einzelstrangkonnformations-Analyse (SSCA)	20
3.2.4.2 Färbung mit Silbernitrat	21
3.2.5 Molekulargenetische Analyse des Allels $\Delta$ 4 bp im <i>TGF<math>\alpha</math></i> - Gen	23

3.2.5.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	23
3.2.5.2	Färbung mit Ethidiumbromid	24
3.3	Statistische Methoden	26
3.3.1	Assoziationsanalysen	26
3.3.1.1	Fall-Kontroll-Studien	26
3.3.1.2	Familienbasierte Assoziationsstudien	27
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>29</b>
4.1	5,10-Methylentetrahydrofolat-Reduktase ( <i>MTHFR</i> )	29
4.1.1	Genotypfrequenzen für die 677C→T-Punktmutation im <i>MTHFR</i> -Gen bei LK/GS-Patienten, Müttern, Vätern und Kontrollpersonen	29
4.1.2	Assoziationsstudien der 677C→T-Punktmutation im <i>MTHFR</i> -Gen bei LK/GS-Patienten, Müttern und Vätern	30
4.1.2.1	Fall-Kontroll-Vergleich des homozygoten Genotyps 677TT von LK/GS-Patienten und Kontrollpersonen	30
4.1.2.2	Fall-Kontroll-Vergleich des homozygoten Genotyps 677TT der Mütter und Väter von LK/GS-Patienten mit Kontrollpersonen	31
4.1.2.3	Familienbasierte Assoziationsstudie bei LK/GS-Familientrios	31
4.1.3	Genotypfrequenzen für die 677C→T-Punktmutation im <i>MTHFR</i> -Gen bei GS-Patienten, Müttern, Vätern und Kontrollpersonen	32
4.1.4	Assoziationsstudien der 677C→T-Punktmutation im <i>MTHFR</i> -Gen bei GS-Patienten, Müttern und Vätern	33
4.1.4.1	Fall-Kontroll-Vergleich des homozygoten Genotyps 677TT von Patienten mit isolierter GS und Kontrollpersonen	33
4.1.4.2	Fall-Kontroll-Vergleich des homozygoten Genotyps 677TT der Mütter und Väter von GS-Patienten mit Kontrollpersonen	34
4.1.4.3	Familienbasierte Assoziationsstudie bei GS-Familientrios	34
4.2	Transforming Growth Factor alpha ( <i>TGFα</i> )	35
4.2.1	Genotypfrequenzen des Polymorphismus wt→Δ4 bp im <i>TGFα</i> -Gen bei LK/GS-Patienten, Müttern, Vätern und Kontrollpersonen	36
4.2.2	Assoziationsstudien des Polymorphismus wt→Δ4 bp im <i>TGFα</i> -Gen bei LK/GS-Patienten, Müttern und Vätern	36
4.2.2.1	Fall-Kontroll-Vergleich des seltenen Allels Δ4 bp von LK/GS-Patienten und Kontrollpersonen	36

4.2.2.2	Fall-Kontroll-Vergleich des seltenen Allels $\Delta 4$ bp der Mütter und Väter von LK/GS-Patienten mit Kontrollpersonen	37
4.2.2.3	Familienbasierte Assoziationsstudie bei LK/GS-Familiäritios	38
4.2.3	Genotypfrequenzen des Polymorphismus wt $\rightarrow$ $\Delta 4$ bp im <i>TGF<math>\alpha</math></i> -Gen bei GS-Patienten, Müttern, Vätern und Kontrollpersonen	39
4.2.4	Assoziationsstudien des Polymorphismus wt $\rightarrow$ $\Delta 4$ bp im <i>TGF<math>\alpha</math></i> -Gen bei GS-Patienten, Müttern und Vätern	39
4.2.4.1	Fall-Kontroll-Vergleich des seltenen Allels $\Delta 4$ bp von GS-Patienten und Kontrollpersonen	39
4.2.4.2	Fall-Kontroll-Vergleich des seltenen Allels $\Delta 4$ bp der Mütter und Väter von GS-Patienten mit Kontrollpersonen	40
4.3.4.3	Familienbasierte Assoziationsstudie bei GS-Familiäritios	41
4.3	Auswertung der Fragebögen	42
<b>5. Diskussion</b>		<b>43</b>
5.1	Assoziationsanalysen	44
5.1.1	Fall-Kontroll-Studien	44
5.1.2	Familienbasierte Assoziationsstudien	44
5.2	Kandidatengen 5,10-Methylentetrahydrofolat-Reduktase ( <i>MTHFR</i> )	45
5.2.1	Assoziationsanalysen der 677C $\rightarrow$ T-Punktmutation im <i>MTHFR</i> -Gen bei LK/GS- und GS-Patienten, Müttern und Vätern	47
5.3	Kandidatengen Wachstumsfaktor alpha ( <i>TGF<math>\alpha</math></i> )	55
5.3.1	Assoziationsanalysen des Polymorphismus wt $\rightarrow$ $\Delta 4$ bp im <i>TGF<math>\alpha</math></i> -Gen bei LK/GS- und GS-Patienten, Müttern und Vätern	57
5.4	Ausblick	64
<b>6. Zusammenfassung</b>		<b>67</b>
<b>7. Abkürzungen und Symbole</b>		<b>69</b>
7.1	Abkürzungen	69
7.2	Symbole	70
<b>8. Literaturverzeichnis</b>		<b>71</b>

<b>9. Fragebogen zur Ursachenforschung von Lippen-Kiefer-Gaumenspaltbildungen für die Eltern</b>	<b>83</b>
<b>10. Anhang</b>	<b>86</b>
10.1 Abbildungsverzeichnis	86
10.2 Tabellenverzeichnis	87
10.3 Lebenslauf	89
10.4 Verzeichnis meiner akademischen Lehrer	90
10.5 Danksagung	91
10.6 Erklärung	93

# 1 Einleitung

Komplexe genetische Erbkrankheiten können familiär gehäuft, oder durch Spontanmutation in einer bisher unbelasteten Familie auftreten. Die Ursache dieser komplexen Krankheiten folgt nicht den Mendelschen Erbgesetzen, sondern setzt sich aus verschiedenen genetischen und exogenen Faktoren zusammen. Charakteristisch für diese Erkrankungen ist, dass einem bestimmten Genotyp nicht einfach ein Phänotyp entspricht. Träger des prädisponierenden Genotyps können die Krankheit entwickeln, während andere Personen auch ohne diesen Genotyp erkranken.

Zu den komplexen Krankheiten werden auch die Lippen-Kiefer-Gaumenspalten (LKG) gezählt, die mit einer Prävalenz von 1:700-1:1000 Neugeborenen in der kaukasischen Population zu den häufigsten angeborenen Fehlbildungen gehören (Gorlin et al. 1990). Diesem Fehlbildungskomplex liegt eine Störung der embryonalen Gesichtsentwicklung zugrunde, die je nach dem Zeitpunkt der Entstehung den Phänotyp der Spalte bestimmt. Generell können die Spaltbildungen ein- oder beidseitig und partiell oder total auftreten, wobei die linke Gesichtshälfte etwa doppelt so häufig betroffen ist wie die rechte (Gorlin et al. 1990).

Umfangreiche Familienuntersuchungen zeigten, dass Lippen-Kiefer-Gaumenspalten überdies als monogen vererbte Erkrankungen (z.B. van der Woude-Syndrom), und im Zusammenhang mit chromosomalen (z.B. Trisomie 21) und nicht-chromosomalen Syndromen (z.B. Waardenburg Syndrom) vergesellschaftet sein können. Die überwiegende Zahl der LKG-Spalten (70%) ist nicht-syndromalen Ursprungs (Jones et al. 1988).

Zur Frage des Zusammentreffens von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten und isolierten Gaumenspalten konnte gezeigt werden, dass beide Fehlbildungen nicht gemeinsam in einer Familie auftreten. Dies stützt die Beobachtungen zur Embryologie, dass es sich um ätiologisch unterschiedliche Fehlbildungen handelt.

## 1.1 Ätiologie der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten

### 1.1.1 Formale Genese

Bekannt sind verschiedene Erscheinungsformen und Schweregrade der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten, die sich im Hinblick auf Ätiologie und Morphologie in zwei große Gruppen unterteilen lassen. So werden Lippen-Kieferspalten mit oder ohne Spalte im harten/weichen Gaumen (LK/GS) von isolierten Spalten im harten/weichen Gaumen (GS) abgegrenzt. Beide Spaltbildungen haben embryologisch eine unterschiedliche Entstehungsweise, da Lippen- und Gaumenbildung nacheinander erfolgen, und die dabei ablaufenden Verschlussmechanismen grundlegend verschieden sind. Die kritische Entstehungsphase der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten liegt in der 5.-9. Woche.

Die bereits zu Beginn der 5. Woche entstehenden LK/GS sind bedingt durch eine Entwicklungsstörung der Nasenhöhle, des primären Gaumens und der Oberlippe. Bleibt bei der Fusion des medialen und lateralen Nasenwulstes die Bildung einer Epithelmauer aus, und werden bereits verschmolzene Epithelien nicht rechtzeitig von Mesenchym ersetzt, entsteht eine Lippen- oder Lippen-Kieferspalte.

Der größte Anteil des definitiven Gaumens entsteht aus den lateral der Zunge gelegenen, unteren Abschnitten der paarigen Oberkieferwülste, den Gaumenplatten, deren vertikales Wachstum in der 7. Woche nach Absenken der Zunge in ein horizontales Wachstum umschlägt. Anschließend wachsen die seitlichen Gaumenfortsätze zur Mitte hin, um miteinander zu verschmelzen. Dieser Vereinigungsprozess vollzieht sich reißverschlussartig von vorne nach hinten. Das Nasenseptum wächst zugleich nach kaudal und vereinigt sich mit dem neugebildeten Gaumendach. Unterbleibt die Fusion der Gaumenplatten, wird die homogene Ausbreitung des Mesenchyms inhibiert, und bei weiter voranschreitendem Wachstum resultiert eine Gaumenspalte. Betrachtet man die zeitliche Abfolge der Entwicklungsvorgänge wird deutlich, dass einer bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Gesichtsentwicklung weit klaffenden Lippen-Kieferspalte vermutlich eine Gaumenspalte folgt, da ein Zusammentreffen von Nasenseptum und Gaumenfortsätzen immer unwahrscheinlicher wird (Pfeifer 1982).

Isolierte Gaumenspalten sind indessen bilaterale Spalten des sekundären Gaumens, die infolge des Verschlussmechanismus immer nach hinten offen sind.

### **1.1.2 Kausale Genese**

Die mannigfaltige Ätiologie der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten ist nach wie vor weitgehend ungeklärt. Es wird diskutiert, dass ein Zusammenspiel von genetischen Risikofaktoren und Umwelteinflüssen für die Entstehung dieser Fehlbildung verantwortlich ist (Wyszynski et al. 1996, Schutte and Murray 1999). Ein allein für die nicht-syndromale Form der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten verantwortliches, krankheitsverursachendes Gen konnte bisher nicht identifiziert werden.

Die genetische Komponente, die sich durch erhebliche Prävalenzunterschiede bei der Betrachtung verschiedener ethnischer Gruppen und geographischer Regionen sowie einem erhöhten Erkrankungsrisiko für Familienmitglieder (Fogh-Andersen 1982) vermuten lässt, spielt in der Pathogenese der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten ebenso eine bedeutende Rolle wie die exogenen Faktoren Mangelernährung, insbesondere Vitaminentzug, Medikamente (Antikonvulsiva, Thalidomid) und mütterlicher Nikotin- und Alkoholkonsum in der frühen Schwangerschaft (Khoury et al. 1989, Shaw et al. 1996, Wyszynski et al. 1996, Källén 1997, Munger et al. 1996). Eine deutliche Risikoreduktion des Auftretens nicht-syndromaler LK/GS und GS kann durch perikonzeptionelle Folsäuregabe erreicht werden (Tolarova and Harris 1995).

## **1.2 Kandidatengene**

Der rasche Fortschritt der Molekulargenetik ermöglichte die Identifikation einiger für die komplexe Form der Spaltbildungen verantwortlichen Gene. Als Kandidatengene werden Gene bezeichnet, welche aufgrund ihrer bekannten Funktion, ihres Expressionsmusters oder ihrer chromosomalen Lokalisation als ein möglicher Krankheitsauslöser in Frage kommen.

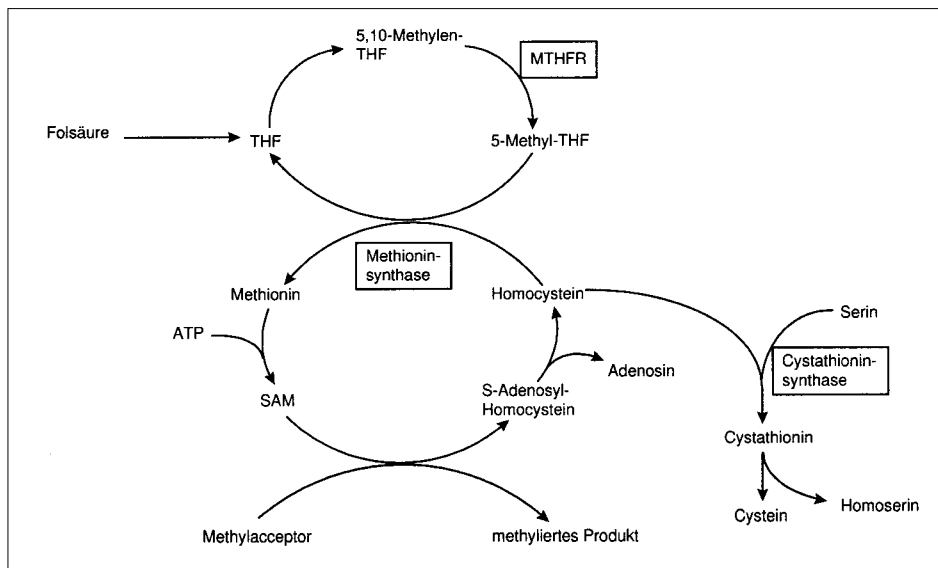
In der vorliegenden Arbeit soll zum einen das Enzym des Folsäurestoffwechsels 5,10-Methylentetrahydrofolat-Reduktase mit der Punktmutation 677C→T betrachtet werden, da eine Enzymvarainte für die Entstehung nicht-syndromaler LK/GS und GS prädisponieren soll (Shaw et al. 1998, Mills et al. 1999).

Zum anderen gilt der Wachstumsfaktor  $TGF\alpha$ , der während der Gaumenfusion verstärkt im Mittellinienepithel exprimiert wird, mit einer 4 bp umfassenden Deletion als Kandidatengen und soll ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden (Ardinger et al. 1989, Chevenix-Trench et al. 1991).

### **1.2.1 Kandidatengen 5,10-Methyltetrahydrofolat - Reduktase (*MTHFR*)**

Die 5,10-Methyltetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR) ist ein cytosolisches Enzym, dessen Gen auf Chromosom 1p36.3 lokalisiert ist (Goyette et al. 1994). Das Enzym katalysiert die Reduktion von 5,10-Tetrahydrofolat zu 5-Methyltetrahydrofolat (Abbildung 1-1). 5-Methyltetrahydrofolat ist die biologisch aktive Form der Folsäure im Serum, die  $C_1$ -Fragmente zur Remethylierung von Homocystein zu Methionin liefert. Aus dem synthetisierten Methionin wird S-Adenosylmethionin (SAM), das durch die erleichterte Abgabe endständiger Methylgruppen als wichtigster Lieferant für Methylgruppen im Stoffwechsel gilt (DNA- und RNA-Synthese, Proteinbiosynthese). Die zentrale Bedeutung des Folsäurestoffwechsels für Zellteilung und Wachstum wird bei der Betrachtung der durch Folsäuremangel verursachten Schädigungen deutlich. Ein Folsäuremangel führt zur Störung der Nukleinsäurebiosynthese, die sich an Geweben mit besonders hoher Zellteilungsrate, wie dem blutbildendem Gewebe, bemerkbar macht. Es kommt zu einer hyperchromen makrozytären Anämie, der Störungen der Phospholipidsynthese und des Aminosäurestoffwechsels folgen.

In den sechziger Jahren wurde erstmals eine Korrelation zwischen mütterlichem Folsäurestatus und kongenitalen Fehlbildungen geschildert (Hibbart&Smithells 1965). Studien in den neunziger Jahren dokumentierten eine Reduktion des Entstehungsrisikos von LK/GS und GS der Nachkommen unter hochdosierter perikonzeptioneller Folsäuregabe um 50-65% (Shaw et al. 1995, Tolarova and Harris 1995).



**Abbildung 1-1: Stoffwechselwege des Folsäuremetabolismus**

Folsäure wird mit der Nahrung aufgenommen und zu Tetrahydrofolat (THF) reduziert. Das Enzym Tetrahydrofolat-Reduktase katalysiert die Reduktion von 5,10-Methylen-tetrahydrofolat zu 5-Methylen-tetrahydrofolat, das seine Methylgruppe an Homocystein abgibt. Die Methylierung wird durch die Methionin-Synthase katalysiert. Methionin wird durch Bindung eines Adenosylrestes zu S-Adosylmethionin (SAM), welches im Stoffwechsel als wichtiger Methylgruppendonor dient.

Hinweise auf die Ursache des Folsäurestoffwechseldefektes lieferten Untersuchungen an Patienten mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen, bei denen eine Hyperhomocysteinämie und Homocystinurie festgestellt werden konnte (den Hejer et al. 1995).

Bei einem Teil dieser Patienten konnte eine neue Enzymvariante der 5,10-Methylen-tetrahydrofolat-Reduktase identifiziert werden. Die gefundene Enzymvariante zeichnet sich durch eine *in vitro*-Thermolabilität bei 46° C und eine ausgeprägt verminderte Enzymaktivität aus (Kang et al. 1988). Durch molekulargenetische Analysen konnte eine Sequenzvariante im Exon 4 des *MTHFR*-Gens identifiziert werden, die durch einen Basenaustausch von Cytosin zu Thymin an der Position 677 gekennzeichnet ist. Auf Proteinebene führt diese Punktmutation zum Austausch eines hochkonservierten Alanins gegen Valin in der katalytischen Domäne des Enzyms (Frosst et al. 1995). Patienten homozygoten Genotyps (677TT) zeigen neben einer enzymatischen Restaktivität von 35-50% erhöhte Homocystein- und erniedrigte Folsäureplasmaspiegel. Patienten heterozygoten Genotyps (677CT) hingegen weisen noch eine Restaktivität von 65% auf (Kang et al. 1991, Engbersen

et al. 1995, Frosst et al. 1995). Durch orale Folsäuregabe kann bei diesen Patienten der Plasmaspiegel von Homocystein und Folsäure wieder normalisiert werden (Kang et al. 1988 und 1991, Motulsky 1996, Blom et al. 1998).

Das Gen der 5,10-Methylentetrahydrofolat-Reduktase ist auf Chromosom 1p36.3 lokalisiert, und besteht insgesamt aus 11 Exons, die eine Größe 102 bp bis 432 bp aufweisen. Die Größe der Introns variiert von 250 bp bis zu 4,2 kb (Goyette et al. 1998).

Die Assoziation des homozygoten Genotyps 677TT mit nicht-syndromaler LK/GS konnte in einer argentinischen Studie festgestellt werden (Tolarova et al. 1998  $P=0,01$ ). Die Assoziation des mütterlichen Genotyps 677TT mit LK/GS konnte in einer italienischen Studie gezeigt werden (Martinelli et al. 2001  $P=0,02$ ). Die Assoziation mit isolierter GS wurde in einer irischen Studie nachgewiesen (Mills et al. 1999  $P=0,02$ ).

### **1.2.2 Kandidatengen Wachstumsfaktor alpha ( $TGF\alpha$ )**

Ein weiteres Gen, welches für die Entstehung nicht-syndromaler LK/GS und GS prädisponieren soll, ist der Wachstumsfaktor  $TGF\alpha$ . Dem aus 160 Aminosäuren bestehenden transmembranen Glykoprotein mit kurzer, cytoplasmatischer Domäne, wird eine wichtige Rolle bei der Gaumenentwicklung zugeschrieben, da es zu Zeit der Gaumenfusion verstärkt im Mittellinienepithel nachgewiesen wird (Ferguson 1988).

$TGF\alpha$  wird von einer Vielzahl verschiedener Zellen, primär ektodermalen Ursprungs exprimiert (Wilcox and Derynck 1988).  $TGF\alpha$  regt durch Mitoseinduktion die Proliferation des multipotenten Mesenchyms, als auch der extrazellulären Matrix an (Qian et al. 1993), und übt zusätzlich einen inhibierenden Effekt auf die Apoptose des Mittellinienepithels aus.

Studien an Gaumenfortsatzkulturen von Mäusen zeigten eine Expressionsaktivität für  $TGF\alpha$  ab dem 12. bis zum 15. Tag des Embryonalstadiums. Zu Beginn ist  $TGF\alpha$  im gesamten Mesenchym des Gaumens vorhanden. Epitheliales Gewebe des Gaumens, der Mundhöhle, der Zunge und in Teilen des Oberkiefers zeigt indessen nur geringe Expressionsaktivität. Am darauf folgenden Tag ist eine gesteigerte Ansammlung von  $TGF\alpha$  im Epithel des Gaumens und im Mesenchym an der Gaumenspitze

bezeichnend, die höchste Konzentration hingegen ist im Mittellinienepithel und dem darunter liegenden Mesenchym zur Zeit der Gaumenfusion zu finden (Dixon et al. 1991). Die zu diesem Zeitpunkt durch Apoptose und epithelial-mesenchymale Transformation einsetzende Degeneration des Mittellinienepithelsaumes gewährleistet die homogene Ausbreitung des Mesenchyms im Gaumen. Die generalisierte Expression im Gaumenepithel ist im Mäuseversuch am 15. Tag des Embryonalstadiums zu beobachten, wobei Überreste des Epithelsaumes besonders aktive Expressionszentren darstellen. Hohe Konzentrationen des Wachstumsfaktors sind desgleichen im Nasenseptum, in den Nasengängen und in den Zahnanlagen zu entdecken. Ist die Expressionsaktivität von *TGF $\alpha$*  vermindert, fällt das Gaumenwachstum geringer aus. Unterbleiben Verschmelzen der gegenüberliegenden Gaumenfortsätze und Apoptose des Mittellinienepithels, wird die homogene Ausbreitung des Mesenchyms im gesamten Gaumenbereich inhibiert, eine Gaumenspalte entsteht.

Strukturell sowie funktionell ähnelt *TGF $\alpha$*  dem Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF). Die Bindung an den zellmembranständigen EGF-Rezeptor (Todaro et al. 1980) bedingt eine Stimulation des intrazellulären Enzyms Tyrosin-Kinase, das durch Phosphorylierung intrazellulärer Zielproteine die genregulatorische Funktion der Zelle beeinflusst (Marquardt et al. 1983 und 1984, Brachmann et al. 1989).

Das Gen für *TGF $\alpha$*  ist auf dem Chromosom 2p13 lokalisiert (Tricopoli et al. 1986) und setzt sich aus 6 Exons, deren Größe von 57 bp bis zu 150 bp reicht, und 5 Introns zusammen (Machida et al. 1999). Die komplette Sequenz des Intron 5 zeigt eine Größe von 2355 bp. Intron 4 wird auf eine Länge von 2,9 kb geschätzt. Mittels molekulargenetischer Analyse konnte eine Sequenzvariante im Intron 5, eine 4 bp umfassende Deletion, identifiziert werden (Basart et al. 1994).

Erste Ergebnisse über die Assoziation des seltenen Allels  $\Delta 4$  bp mit nicht-syndromalen LK/GS in der kaukasischen Population der USA wurden von Ardingher und Mitarbeitern (1989) veröffentlicht, und durch anschließende Studien in weiteren Populationen bestätigt (kaukasische Population Australien: Chevenix-Trench et al. 1991  $P=0,03$ , USA: Sassani et al. 1993  $P=0,03$ ). Die Assoziation der Sequenzvariante mit isolierter GS konnte ebenfalls in einer Studie festgestellt werden (kaukasische Population der USA: Shiang et al. 1993  $P=0,03$ ).

### 1.3 Ziele der Arbeit

Vorausgegangene Studien in der argentinischen, italienischen, brasilianischen, irischen und amerikanischen Population zeigen bezüglich der Assoziation des homozygoten Genotyps 677TT im *MTHFR*-Gen mit nicht-syndromalen Lippen-Kiefer-Gaumenspalten (LK/GS) und isolierten Gaumenspalten (GS) widersprüchliche Ergebnisse. Dies trifft ebenfalls auf Studien zu, die das seltene Allel  $\Delta 4$  bp im Gen des *TGF $\alpha$*  als möglichen Risikofaktor für die Entstehung nicht-syndromaler LK/GS und GS untersuchten. Bislang liegen für die deutsche Population noch keine umfassenden Untersuchungen dieser beiden Polymorphismen vor.

Um die Assoziationen des Genotyps 677TT im *MTHFR*-Gen und der Sequenzvariante  $\Delta 4$  bp im *TGF $\alpha$* -Gen zu untersuchen, werden in der vorliegenden Arbeit zwei Assoziationstests angewendet. Zum einen wird im Fall-Kontroll-Vergleich untersucht, ob einer der Markergenotypen (677TT im *MTHFR*-Gen oder wt/ $\Delta 4$  bp im *TGF $\alpha$* -Gen) bei von LK/GS oder GS betroffenen Personen häufiger vorzufinden ist als bei Kontrollpersonen. Zum anderen soll mittels kombiniertem Test auf Assoziation und Kopplung (Transmission-Disequilibrium-Test) an Familientrios ermittelt werden, ob die Eltern das Markerallel signifikant häufiger an das betroffene Kind vererben.

Wird eine Assoziation festgestellt, so können die thermolabile Enzymvariante der 5,10-Methylen tetrahydrofolat-Reduktase und die Sequenzvariante  $\Delta 4$  bp im Gen von *TGF $\alpha$*  in der deutschen Population als Risikofaktor für die Entstehung nicht-syndromaler LK/GS und GS betrachtet werden.

## **2 Probanden**

### **2.1 Auswahl der Probanden**

Die Probanden wurden im Rahmen der Sprechstunde für Lippen-Kiefer-Gaumenspalten in der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie und dem Institut für Humangenetik der Philipps-Universität Marburg über die Intention dieser Studie informiert, und nach Abgabe einer Einverständniserklärung in die Untersuchungen miteinbezogen. Weitere Probanden wurden durch die Wolfgang Rosenthal Gesellschaft (Selbsthilfevereinigung für Lippen-Kiefer-Gaumenspaltenbildungen) auf unsere Studie aufmerksam, und mit ihrer Einverständnis ebenfalls in die Untersuchungen aufgenommen. Den Probanden wurde eine Blutprobe von 10-20 ml entnommen. Mütter und Väter beantworteten zusätzlich einen Fragebogen zur Ursachenforschung von Spaltbildungen in der Familie (Fragebögen Kapitel 9). Der Fragebogen umfasst neben der Familienanamnese eine spezielle Anamnese der Eltern, die insbesondere den Nikotin- und Alkoholkonsum der Mutter, sowie die Arzneiverordnung während der Schwangerschaft berücksichtigt. Die Einteilung des Phänotyps erfolgte bei Patienten und betroffenen Familienmitgliedern nach dem Modell der Thallwitzer Nomenklatur (Kapitel 2.2.2). Es wurden ausschließlich Patienten mit nicht-syndromalen Spaltbildungen untersucht.

Die Gruppe der Kontrollpersonen setzt sich überwiegend aus Studenten, Praktikanten und Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik und der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie zusammen. Die Kontrollpersonen selbst, sowie deren Familien bieten keinen Anhalt auf eine Spaltbildung.

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Philipps-Universität Marburg geprüft und anerkannt.

#### **2.1.1 Patienten und Familien**

Insgesamt wurden für diese Arbeit DNA-Proben von 88 deutschen Patienten mit nicht-syndromaler LK/GS und isolierter GS untersucht (38 weiblich, 50 männlich).

Ferner wurden mütterliche (88) und väterliche (82) DNA-Proben in die Untersuchung einbezogen. Den Phänotyp einer LK/GS zeigen 3 Mütter und 4 Väter, bei einer Mutter ist eine isolierte Gaumenspalte zu diagnostizieren. Eine isolierte Gaumenspalte kann bei keinem der Väter festgestellt werden (Tabelle 2-1). Die Ehe zwischen Blutsverwandten ist in keiner Familie bekannt.

## 2.1.2 Kontrollpersonen

In die Kontrollgruppe wurden 344 Individuen einbezogen (216 weiblich, 128 männlich) bei denen lediglich bekannt war, dass sie nicht von einer LK/GS oder GS betroffen waren. Patienten und Kontrollen entstammen der selben deutschen Population (Tabelle 2-1).

**Tabelle 2-1:** Aufschlüsselung der Probanden für molekulargenetische Analysen im *MTHFR*- und *TGF $\alpha$* - Gen

Probanden	Diagnose	Anzahl
Patienten	LK/GS	72
	♀	31
	♂	41
Patienten	GS	16
	♀	7
	♂	9
Mütter	LK/GS	3
	GS	1
	nicht betroffen	84
Väter	LK/GS	4
	GS	0
	nicht betroffen	78
Kontrollen	keine LK/GS oder GS	344
	♀	216
	♂	128

LK/GS = Lippen-, Kiefer- Gaumenspalte  
 GS = isolierte Gaumenspalte

## **2.2 Klinisches Bild und Klassifikation der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten**

### **2.2.1 Erscheinungsformen**

Das klinische Bild der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten offenbart vielfältige Erscheinungsformen und Schweregrade. Der Phänotyp zeigt Mikroformen, wie Uvula bifida, submuköse Spalten des weichen Gaumens oder knappe Einziehungen der Lippe, sowie die verschiedenen, ein- oder beidseitig, sowie vollständig oder unvollständig auftretenden Varianten der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten mit ihren verschiedenartigen Besonderheiten. Sie können als leichte Abweichungen des Muskelfaserverlaufes der Oberlippe, als völliges Fehlen von Muskelementen im Zwischenkiefer, oder auch durch Formstörungen des Naseneingangs und Deformationen des Nasenskeletts imponieren. Zudem können Anteile des knöchernen Nasenbodens fehlen. Die schwerste Form der Gesichtsfehlbildung stellen die doppelseitigen, vollständigen Lippen-Kiefer-Gaumenspalten dar, die als Merkmale den nichtangelegten knöchernen Nasenboden und den isolierten, meist protrudierten Zwischenkiefer offenbaren. Häufig kommen gerade bei dieser Dysgenese Kombinationen der verschiedenen Spaltformen vor, die eine ausgeprägte Asymmetrie der Gesichtsform verursachen können. Meist liegt die vollständige Spalte einer Seite in Kombination mit einer partiellen Spalte der Gegenseite vor.

An die Spalte angrenzende Zähne stehen häufig gedreht. Bei schmalen Spalten ist der seitliche obere Schneidezahn oft doppelt angelegt, bei breiten Spalten ist die Zahnanlage hypoplastisch oder fehlt völlig.

Die betroffenen Personen können in funktioneller und ästhetischer Hinsicht stark beeinträchtigt sein. Eine Spaltbildung bedingt durch die Kontinuitätsunterbrechung anatomischer Strukturen eine Einschränkung der Funktionen, die sich auf die weitere Entwicklung des Mittelgesichts, das Wachstum der Kiefer, die Funktion der inneren Nase und Tuben sowie auf Sprachlautbildung und Nahrungsaufnahme auswirken.

Etwa 15-20% der Spaltbildungen betreffen die Lippe bzw. Lippe und Kiefer, etwa 50% sind ein- und beidseitig vollständige Lippen-Kiefer-Gaumenspalten. Die Gaumen- und Velumspalten sind mit einer Häufigkeit von 30- 35% vertreten, wobei

Gaumenspalten häufiger mit weiteren kongenitalen Fehlbildungen vergesellschaftet sind als isolierte Lippenspalten oder Lippen-Kieferspalten (Gorlin et al. 1990, Kádasi 1980).

Hinsichtlich der Geschlechterverteilung von LK/GS und GS ist zu beachten, dass das weibliche Geschlecht von isolierten Gaumenspalten doppelt so häufig betroffen ist wie das männliche (Gorlin et al. 1990). Genau umgekehrt verhält sich die Geschlechterverteilung bei den Lippen-Kieferspalten mit oder ohne Gaumenbeteiligung.

Aus Untersuchungen großer Kollektive von LK/GS- und GS-Patienten verschiedener Populationen konnte von Fogh-Andersen eine Erblichkeitsprognose erstellt werden. Die Gefahr für gesunde Eltern, die bereits ein LK/GS betroffenes Kind zur Welt brachten, ein zweites spaltbehaftetes Kind zu bekommen, besteht in maximal 4-5% der Fälle. Für die Patienten mit isolierter GS beträgt die Wahrscheinlichkeit 1,8%.

Ist ein Elternteil von einer Lippen-Kiefer-Gaumenspalte betroffen, so besteht bei bereits einem gesunden Nachkommen für ein weiteres Kind die Wahrscheinlichkeit einer Spalte von 2%. Das Risiko einer Gaumenspalte liegt bei 7,9%. Ist jedoch in einer Familie mit betroffenem Elternteil das erste Kind von einer Spaltbildung betroffen, erhöht sich das Risiko bei weiteren Nachkommen für LK/GS auf 14% und GS auf 17% (Tabelle 2- 2).

Hinsichtlich des Wiederholungsrisikos ist die höchste Inzidenz bei männlichen Nachkommen betroffener Frauen zu finden (Wittkowski und Opitz 1979).

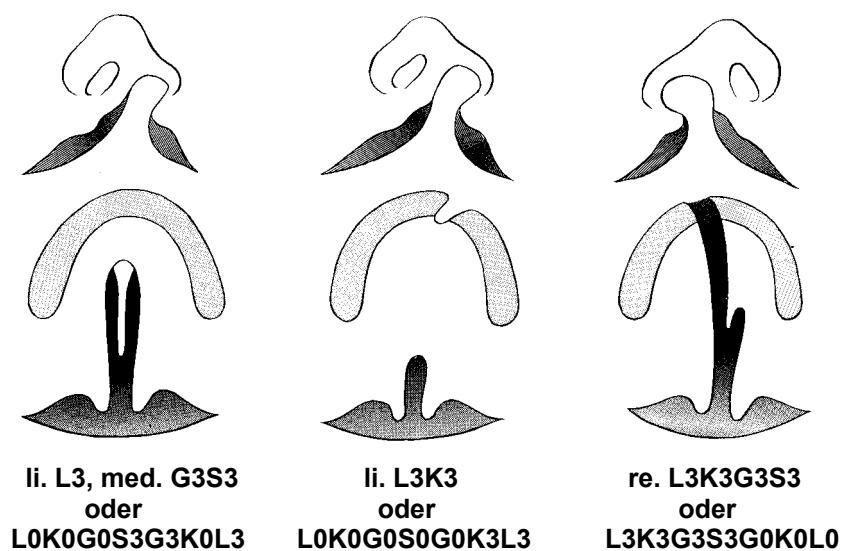
**Tabelle 2-2:** Erblichkeitsprognose von LK/GS und GS (nach Fogh-Andersen 1982)

Eltern	1. Kind	Relative Häufigkeit des familiären Auftretens von LK/GS und GS für das 2. Kind [%]	
		LK/GS	GS
normal	betroffen	4,4	1,8
betroffen	normal	2,0	7,9
betroffen	betroffen	14,0	17,0

LK/GS = Lippen-, Kiefer- Gaumenspalte  
 GS = isolierte Gaumenspalte

## 2.2.2 Nomenklatur

Es gibt eine Vielzahl unterschiedlicher Klassifikationsschemata zur Einteilungen des Phänotyps von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten. Im Rahmen dieser Arbeit folgten wir bei der Beurteilung von Patienten und betroffenen Familienmitgliedern dem topografisch orientierten Modell des Thallwitzer Klassifikationsschemas (Abbildung 2-1). Grundsätzlich werden Spalten des primären Gaumens (Lippenspalten, Kieferspalten) und des sekundären Gaumens (Gaumenspalten, Segelspalten) unterschieden, die je nach Ausdehnung des entsprechenden Spaltbereiches einer Gradeinteilung von 1-3 unterworfen werden (Abbildung 2-2). Der Gebrauch von Abkürzungen (L=Lippe, K=Kiefer, G=Gaumen, S=Segel, re=rechts, li=links, do=doppelseitig) gestattet eine geordnete Darstellung aller auftretenden Spaltformen in einer Formel. Das Ausmaß der Spalten wird mit arabischen oder römischen Zahlen hinter dem entsprechenden Buchstaben angegeben, wobei römische Zahlen (I-III) bei der Beschreibung submuköser Spalten Verwendung finden.



**Abbildung 2-1: Beispiele zur Einteilung kombinierter Spaltbildungen nach dem Modell der Thallwitzer Nomenklatur**  
Die Beschreibung der Spalte erfolgt von rechts nach links.

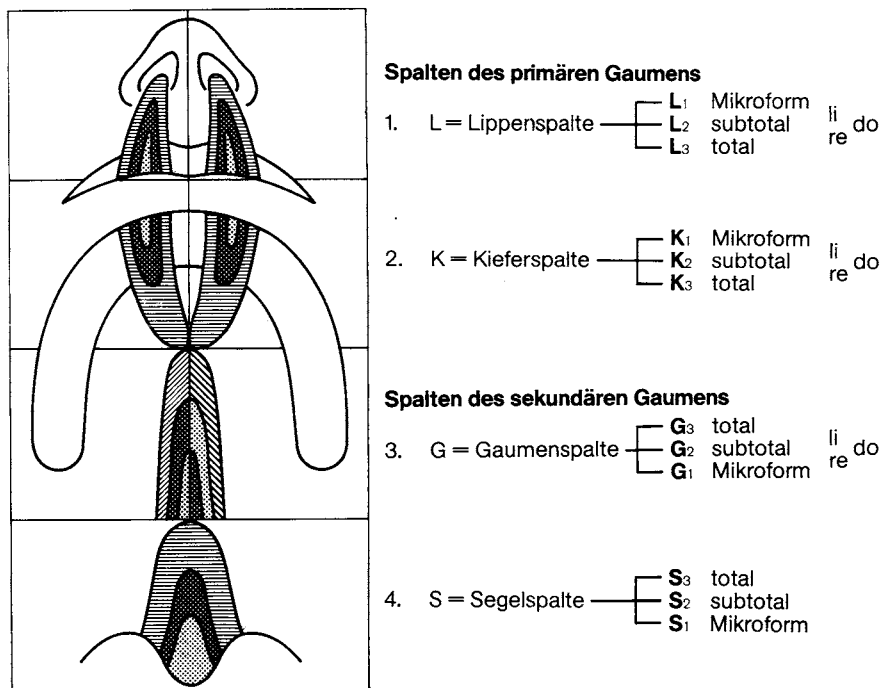


Abbildung 2-2: Einteilung der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten nach Ausbreitung des Spaltbereiches

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Material**

#### **3.1.1 Chemikalien**

Chemikalien, Lösungen und Nukleinsäuren, die zu den Standardmaterialien eines molekularbiologischen S1-Labors gehören, sind nicht aufgeführt.

Alle Grundchemikalien für Puffer und Lösungen werden in p.A.-Qualität bezogen, Lösungen und Puffer sind mit entmineralisiertem Wasser angesetzt und autoklaviert oder steril filtriert. Der pH-Wert ist mit Salzsäure oder Natronlauge eingestellt.

#### **3.1.2 Geräte**

Zusätzlich zur Grundausstattung eines S1-Labors gehörigen Geräten wurden eingesetzt:

- GeneAmp PCR System 9600 bzw. 2400	Perkin Elmer, USA
- Trio Thermblock TB1	Biometra, Göttingen
- DGGE/ SSCA-Kammer PhorU-2	Ingeny, Leiden, NL
- Hoefer SE600 Elektrophorese Einheit	Amersham, Freiburg
- automatischer Sequenzierer ABI 373 bzw. 310	Perkin Elmer, USA

#### **3.1.3 Software**

Textverarbeitung	Word 2000, Microsoft
Datenverwaltung	Excel 2000, Microsoft
	Access 2000, Microsoft
	Cyrillic 2.1, Cherwell Scientific Publishing Ltd., 1997
Statistik	StatXact-4, Cytel Software, 1998
Grafik	Adobe Photoshop 5.0
	Power Point 2000, Microsoft

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 DNA- Isolierung aus Leukozyten**

Genomische DNA kann aus kernhaltigen Leukozyten isoliert werden. Nach Entfernung der Erythrozyten werden die Leukozyten lysiert und die freigesetzten Proteine abgebaut und ausgesalzen. Durch eine Aufreinigung mittels Alkohol kann im letzten Arbeitsschritt die DNA isoliert und ausgefällt werden (Miller et al. 1988). Einem Ansatz aus 10 ml EDTA-Blut (Frischblut oder Blut nach Lagerung bei -20°C) wird zur osmotischen Lyse der kernlosen Erythrozyten 30 ml kalter RCLB-Puffer hinzugefügt, und die Mischung 15 Minuten auf Eis gestellt. Die anschließende 10minütige Zentrifugation (3000 rpm, 4°C) bedingt ein Sedimentieren der nicht lysierten Leukozyten. Der Überstand mit den Erythrozytentrümmern wird verworfen und das verbleibende Sediment in 25 ml SE-Puffer suspendiert und für weitere 10 Minuten erneut bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nachdem der Überstand erneut verworfen wird, setzt man dem Zellpellet 5 ml SE-Puffer, 15 µl (100 mg/ml) Pronase und 500 µl 10%ige SDS-Lösung hinzu und inkubiert den Ansatz unter konstantem Schwenken für 3 Stunden bei 55°C oder über Nacht bei 37°C im Schüttelwasserbad. Um eine möglichst vollständige Lyse der Leukozyten zu erreichen, erfolgt im Anschluss eine weitere Inkubation für 5 Minuten bei 55°C nach Zugabe von 5 ml SE-Puffer. Freigesetzte Proteinbestandteile werden nach Zufügen von 2,5 ml 5M NaCl dehydriert und gefällt. Eine 10minütige Zentrifugation beschleunigt das Sedimentieren fester Bestandteile. Die im Überstand gelöste DNA wird in ein Falconröhrchen dekantiert und nach Zugabe von eiskaltem 96%igem Ethanol ausgefällt. Nach erneutem Waschen mit 70%igem Ethanol wird die DNA, je nach gewonnener Menge, in 300-600 µl TE-Puffer während 24 Stunden bei 4°C auf einem Rotator gelöst.

### 3.2.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration einer DNA-Probe wird mittels Spektralphotometer durch Messung der optischen Dichte bestimmt. Bei dem für die DNA charakteristischem Absorptionsmaximum von 260 nm und einer Küvettenschichtdicke von 1 cm entspricht eine Absorption von 1,0 einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml (Sambrook et al. 1989). Die zu messende DNA-Probe wird in einem Verhältnis 1: 200 verdünnt. Nach Kalibrierung des Nullwertes mit H<sub>2</sub>O wird die Absorption der Probe gegen den Nullwert gemessen. Um Aufschluss über eine mögliche Kontamination zu erhalten, wird zusätzlich die Absorption bei 280 nm ermittelt, da bei dieser Wellenlänge das Absorptionsmaximum für Proteinverunreinigungen liegt. Proteinfreie DNA-Isolate weisen einen Quotienten von 1,8 (Absorption 260: Absorption 280) auf. Einen Hinweis auf RNA-Rückstände geben Werte größer als 2,0, für Proteinverunreinigungen sprechen geringere Werte als 1,7.

### 3.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR) ermöglicht es mit Hilfe spezifischer, hitzestabiler Enzyme DNA-Abschnitte definierter Größe *in vitro* zu amplifizieren (Mullis 1985). Voraussetzung für die Durchführung einer PCR ist, dass die Randbereiche der zu vervielfältigenden Nukleotidsequenz bekannt sind. Zwei zu diesen Randbereichen komplementären Oligonukleotide, die Primer, fungieren für die DNA-Polymerase als Startmoleküle zur DNA-Synthese (Tabelle 3-1).

Zu Beginn der ersten Amplifikationsrunde wird die doppelsträngige DNA- Probe bei 94°C in Einzelstränge aufgetrennt (Denaturierung). Die Hybridisierung der Primer erfolgt bei anschließender Abkühlung in einem Temperaturbereich zwischen 50 und 70°C (Annealing). In der folgenden Zyklusphase synthetisiert die DNA- Polymerase, von den Primern ausgehend, bei 72°C jeweils gegenläufig die komplementären DNA-Stränge in 5'→3'-Richtung (Elongation). Dieser Zyklus aus Denaturierung→Annealing→Elongation wird mit demselben Reaktionsgemisch 30-35 mal wiederholt um zu gewährleisten, dass für weitere Untersuchungen eine ausreichende Menge spezifischer DNA-Zielsequenzkopien hergestellt worden ist. Die neu synthetisierten Tochterstränge dienen im nächsten Zyklus selbst als

Matrizen, so dass nach n Zyklen ein theoretisches Maximum von  $2^n$  DNA-Moleküle der gewünschten DNA- Zielsequenz synthetisiert ist.

Zur Überprüfung werden die PCR- Produkte auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Die PCR-Produkte sollten als scharfe Bande bei der erwarteten Produktgröße sichtbar werden, und sich gemäß ihrer Größe auf entsprechender Höhe zu einem mitaufgetrennten Größenstandard befinden.

Zusätzliche Banden entstehen durch unspezifische Anlagerung der Primer oder ungleiche Primermengen.

**Tabelle 3-1:** In dieser Arbeit verwendete Primer für die Amplifikation der *MTHFR*- und *TGF $\alpha$* -Zielsequenzen

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Annealing [C°]	PCR-Produkt [bp]
<i>MTHFR</i> Exon 4 v 1	5'-AAG GAT GCC CAT GTC GGT GCA TGC CT -3'	65° C	142 bp
<i>MTHFR</i> Exon 4 r	5'-GAA GCA GGG AGC TTT GAG GCT GAC CT -3'		
<i>TGF<math>\alpha</math></i> Del 4 bp v 2	5'-GAA TTT GGC CTA TGA AAG GTC T-3'	52° C	117 bp
<i>TGF<math>\alpha</math></i> Del 4 bp r	5'-ACA TCC TGA TGT CTT CAT GGA T -3'		

Annealing= Anlagerungstemperatur in der PCR

1= Primer nach Ou et al. 1996

2= Primer nach Basart et al. 1994

### 3.2.3.1 Standard-PCR-Bedingungen

Um einen vorzeitigen Start der PCR zu vermeiden, werden alle Reaktionsansätze (Tabelle 3-2) auf Eis pipettiert. Bei jeder PCR dient ein Ansatz ohne DNA-Zugabe (Leerwert) als Negativkontrolle.

Die Amplifikation der vorbereiteten Reaktionsansätze erfolgt in Thermocyclern mit beheizbaren Deckeln, wobei die Standard-PCR-Bedingungen eine initiale Denaturierung von 5 Minuten bei 94°C, ein Hybridisieren der Primer in einem Temperaturintervall von 50 bis 70°C und eine Elongation von 3-10 Minuten bei 72°C einschließen. Die abschließende Elongation gewährleistet eine vollständige Polymerisation aller DNA-Fragmente. Zwischen der anfänglichen Denaturierung und der abschließenden Elongation werden 30 bis 35 Zyklen durchlaufen, deren Anzahl und Bedingungen primerspezifisch sind. Die optimalen Bedingungen für jedes Primerpaar werden empirisch mit wechselnden Annealingtemperaturen bestimmt.

Jede PCR wird mittels Agarose-Gelelektrophorese auf die korrekte Größe des amplifizierten Produktes überprüft.

**Tabelle 3-2: Reaktionsansatz**

Standard- PCR		
10 x PCR-Puffer		5,0 µl
dNTP	(20 mM)	0,5 µl
Vorwärtsprimer	(20 pmol/µl)	2,0 µl
Rückwärtsprimer	(20 pmol/µl)	2,0 µl
<i>Taq</i> - Polymerase	(3 U/µl)	1,0 µl
DNA	(50 ng/µl)	2,0 µl
H <sub>2</sub> O	(HPLC)	ad 50 µl

### 3.2.3.2 Agarose-Gelelektrophorese zur Überprüfung der PCR-Produkte

PCR-amplifizierte DNA-Fragmente lassen sich mit Hilfe der Gelelektrophorese durch Wanderung im elektrischen Feld auftrennen. Da die Phosphatreste der DNA bei neutralem pH-Wert in ionisierter Form vorliegen, wandern sie im elektrischen Feld zur Anode. Ihre Wanderungsgeschwindigkeit ist abhängig von der Molekülgröße und -konformation der DNA, der Gesamtladung des Moleküls, der Agarosekonzentration des Gels, der Zusammensetzung des Elektrophorese-Puffers, interkalierenden Substanzen wie Ethidiumbromid und der angelegten Spannung.

Zur Herstellung eines Agarosegels wird die benötigte Menge Agarose abgewogen und mit Puffer aufgekocht (Tabelle 3-3). Nach Abkühlung wird das Gel mit Ethidiumbromid versetzt und möglichst luftblasenfrei in einen waagerechten, mit Kämmen bestückten Gelschlitten gegossen.

Nachdem das Gel erstarrt ist, können die Kämmen entfernt und das Gel in die mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt werden. Vor dem Auftragen auf ein Gel werden die Proben mit einem Gelladepuffer versetzt, der die Dichte der Proben erhöht (Ficoll oder Formamid) und durch Farbstoffe (Bromphenolblau oder Cylencyanol) eine visuelle Abschätzung des Gellaufes ermöglicht. Anschließend

werden die Proben und die zur Größenabschätzung der DNA-Fragmente benötigten Längenstandards in die Taschen pipettiert und die Spannung angelegt. Nach Beendigung der elektrophoretischen Auftrennung werden die aufgetrennten DNA-Fragmente auf einem UV-Transilluminator (302 nm) mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert.

**Tabelle 3-3:** Agarosegel 2%

<b>Agarosegel zur Kontrolle der PCR-amplifizierten Produkte</b>	
Agarosekonzentration	2 %
Gelgröße (cm x cm)	14 x 11
Gelvolumen	100 ml
Gel-/Laufpuffer	0,5 x TBE
Probenvolumen	10µl
Längenstandard	100 bp Marker
Spannung	200 V
Laufzeit	0,5 h

### 3.2.4 Nachweis der Punktmutation 677C →T im *MTHFR*-Gen

Die 677C→T Punktmutation im Exon 4 des *MTHFR*-Gens kann nach PCR-Amplifikation genomischer DNA mittels Einzelstrangkonnformations-Analyse erfasst, und mit Silberfärbung sichtbar gemacht werden. Zur Ermittlung der exakten DNA-Sequenz können anschließend einzelne Banden aus dem Gel ausgestochen und einer Sequenzanalyse unterzogen werden (Karlson 1988).

#### 3.2.4.1 Einzelstrangkonnformations-Analyse (SSCA)

Zur Identifikation von Sequenzvarianten in Kandidatengenomen kann eine Einzelstrangkonnformations-Analyse (Single-strand-conformational analysis, SSCA) vorgenommen werden (Orita et al. 1989, Chaubert et al. 1993). Die Wanderungsgeschwindigkeit einzelsträngiger DNA-Moleküle im elektrischen Feld

hängt von ihrer Sekundärstruktur, die wiederum von der Nukleotidsequenz (Primärstruktur) bestimmt wird, ab. Durch einen Basenaustausch oder das Fehlen von nur einer Base kann die Sekundärstruktur, und somit auch das Wanderungsverhalten des Moleküls in der Gelelektrophorese verändert werden. Die Sensitivität der SSCA ist für PCR-Produkte in einer Größe von 200-300 bp besonders hoch, bei sehr kleinen (< 130 bp) und sehr großen (> 400 bp) Produkten hingegen nimmt die Sensitivität ab (Sheffield et al. 1993). Die zu analysierende Sequenz der Kandidatengene wird zunächst mittels PCR amplifiziert. Das denaturierte PCR-Produkt wird dann in einem nicht-denaturierenden 12% Polyacrylamidgel (Tabelle 3-4) aufgetrennt und mit einer Silberfärbung sichtbar gemacht.

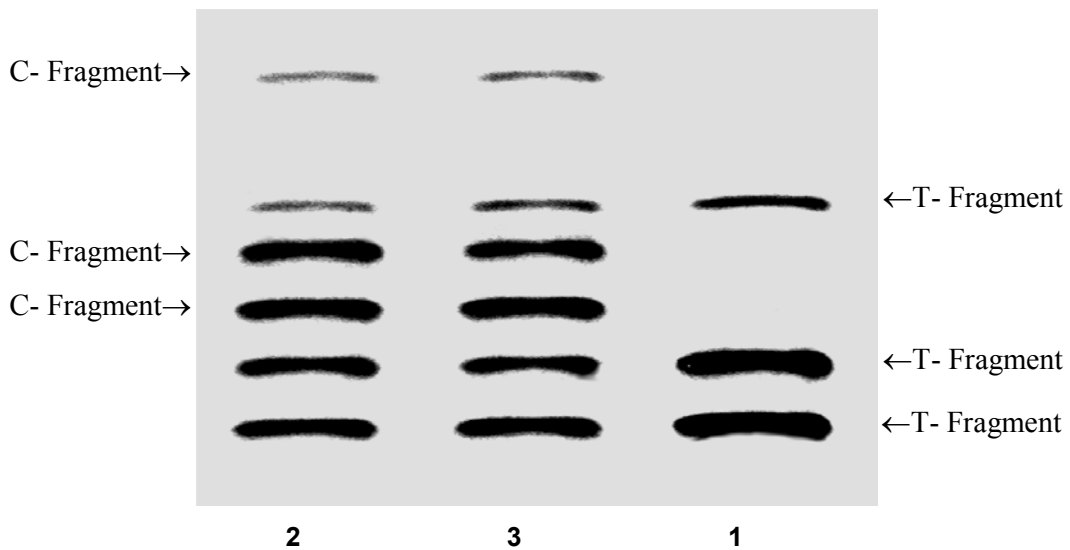
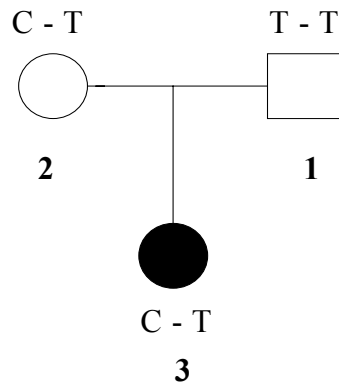
**Tabelle 3-4:** Polyacrylamidgel 12%

<b>Nicht-denaturierendes PAA-Gel zur Identifikation der 677 C→T-Punktmutation</b>	
Acrylamidkonzentration	12% (w/v)
Gelgröße (cm x cm)	17,0 cm x 15,5 cm x 0,75
Acrylamid 40%	9,0 ml
Puffer	(5 x TBE) 6,0 ml
H <sub>2</sub> O	ad 30,0 ml
APS 10%	280 µl
TEMED	18 µl

### 3.2.4.2 Färbung mit Silbernitrat

In einem Polyacrylamidgel aufgetrennte DNA-Fragmente können mit Silbernitrat angefärbt werden (Budowle et al. 1991). Die positiv geladenen Silberionen lagern sich an die negativ geladenen Phosphatreste der DNA an und werden durch den formaldehydhaltigen Entwickler reduziert und anschließend durch Natriumcarbonat ausgefällt. Die Entwicklerlösung wird mehrfach erneuert und das Gel so lange inkubiert, bis die Färbung die gewünschte Intensität erreicht hat. Nach Abschluss der Färbung wird das Gel unter Wärmezufuhr und Vakuum getrocknet.

**Familie 5089**



**Abbildung 3-1: Identifizierung der 677C→T Punktmutation im *MTHFR*- Gen auf einem nicht-denaturierenden 12% PAA-Gel (Silberfärbung)**  
 Stammbaum der Familie 5089. Die LK/GS-Patientin mit dem Phänotyp L0K0G2S3G3K3L3 und ihre Mutter besitzen den Genotyp CT, der Vater ist homozygot und weist den Genotyp TT auf.  
 C = nicht mutiertes Allel, T = mutiertes Allel

### 3.2.5 Molekulargenetische Analyse des Allels $\Delta 4$ bp im *TGF $\alpha$* - Gen

Die Deletion von 4 Basenpaaren im Intron 5 des *TGF $\alpha$* -Gens kann nach PCR-Amplifikation genomischer DNA und anschließender Auftrennung auf einem 8% Polyacrylamidgel identifiziert werden. Das Wildtypallel wt zeigt eine Größe von 117 bp, das seltene Allel  $\Delta 4$  bp ist durch eine Größe von 113 bp gekennzeichnet. Die Fragmente werden mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Zur Ermittlung der DNA-Sequenz können einzelne Banden aus dem Gel entfernt und einer Sequenzanalyse unterzogen werden.

#### 3.2.5.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

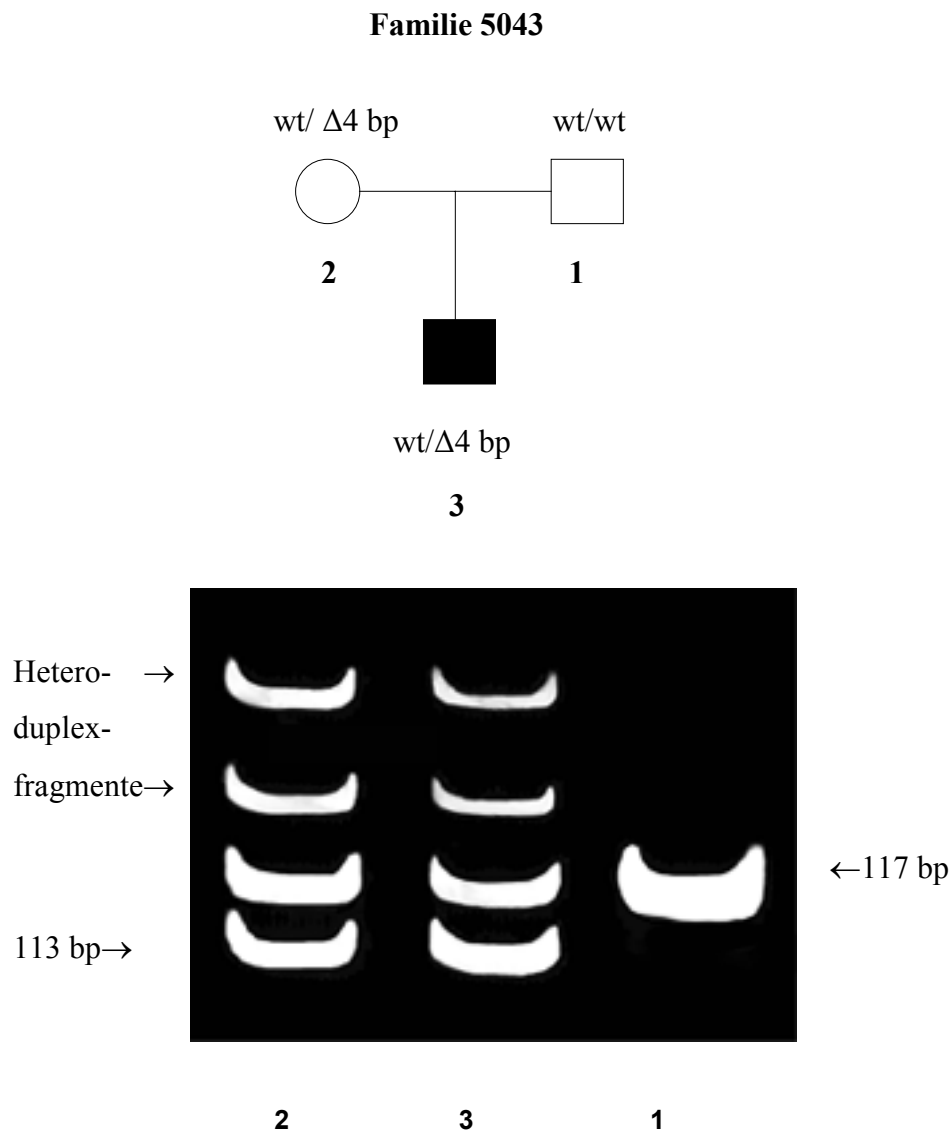
Durch Polymerisation des Monomers Acrylamid mit dem vernetzenden Agens N,N'-Methylenbisacrylamid entstehen Polyacrylamidgele. Die Polymerisation wird durch freie, aus dem Zerfall von Ammoniumpersulfat (APS) entstehende Radikale induziert. Zugewetztes TEMED dient der Stabilisierung freier Radikale. Das Auflösungsvermögen dieser Gele ist bedeutend größer als das der Agarosegele. Selbst geringe Größenunterschiede der DNA-Fragmente können mittels Polyacrylamidgel deutlich gemacht werden. Die aufgetrennten DNA-Fragmente werden mit Ethidiumbromid oder Silberfärbung sichtbar gemacht.

**Tabelle 3-5: Nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel**

<b>Nicht-denaturierendes 8% PAA- Gel zur Identifikation der <math>\Delta 4</math> bp-Deletion</b>	
Acrylamidkonzentration	8% (w/v)
Gelgröße (cm x cm)	17,0 cm x 15,5 cm x 0,75
Acrylamid 40%	6,0 ml
Puffer	(5 x TBE) 6,0 ml
H <sub>2</sub> O	ad 30,0 ml
APS 10%	300 $\mu$ l
TEMED	10,5 $\mu$ l

### **3.2.5.2 Färbung mit Ethidiumbromid**

Elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente können mit Hilfe von Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden. Ethidium ist ein aromatisches Kation, das in die DNA-Doppelstränge interkaliert und durch die Bestrahlung mit UV-Licht (302 nm) auch sehr geringe Mengen DNA von 50 ng zur Fluoreszenz anregt (Voet&Voet 1995). Abschließend erfolgt eine fotografische Dokumentation der Transillumination.



**Abbildung 3-2: Identifizierung der  $\Delta 4$  bp-Deletion auf einem 8% PAA-Gel bei Familie 5043 (Färbung mit Ethidiumbromid)**

Stammbaum der Familie 5043. Der LK/GS-Patient mit dem Phänotyp L3K3G3S3G0K0L0 und die Mutter besitzen den Genotyp wt/ $\Delta 4$  bp (Allellänge 117 bp/113 bp), der Vater ist für das Wildtypallel (wt) homozygot, was durch ein 117 bp- Fragment deutlich dargestellt ist. Heteroduplexfragmente bilden sich kontinuierlich zwischen 123 bp und 147 bp aus.

wt = nicht mutiertes Wildtypallel,  $\Delta 4$  bp = mutiertes Allel

### 3.3 Statistische Methoden

Im statistischen Testverfahren soll an Hand zweier Stichproben untersucht werden, ob die Ergebnisse durch eine zufallsbedingte Streuung der Messwerte zu erklären sind (Nullhypothese  $H_0$ ) oder ob ein tatsächlicher Effekt vorliegt (Alternativhypothese  $H_1$ ).

Es wird kalkuliert, mit welcher Wahrscheinlichkeit sich das gegenwärtige Ergebnis (oder noch extremere) zufällig eingestellt haben könnte, wenn  $H_0$  tatsächlich zuträfe. Wird diese Wahrscheinlichkeit als gering eingestuft, nämlich kleiner als das vereinbarte Signifikanzniveau  $\alpha$ , kann  $H_0$  verworfen und das Ergebnis als signifikant angeführt werden. Das Signifikanzniveau  $\alpha$  entspricht der Wahrscheinlichkeit für einen Fehler 1. Art, der dadurch charakterisiert ist, dass die Nullhypothese ( $H_0$ ) zutrifft, aber aufgrund der Stichprobe verworfen wird. Das zufallsbedingte Ergebnis wird fälschlich als signifikant bezeichnet. Um Fehler dieser Art kontrollieren zu können, legt man das Signifikanzniveau vorab fest (in der Regel  $\alpha = 0,05$ ).

Mit Hilfe statistischer Testverfahren wird aus den Beobachtungsdaten die jeweilige Testgröße (Cochran-Armitage, McNemar, Odds Ratio mit 95% Konfidenzintervall) und der dazugehörige  $P$ -Wert ermittelt. Der  $P$ -Wert bezeichnet die Wahrscheinlichkeit mit der sich die vorliegenden Ergebnisse (oder noch extremere) zufällig ergeben haben könnten. Er formuliert die zutreffende Irrtumswahrscheinlichkeit, wenn man die Nullhypothese  $H_0$  ablehnt. Ist diese Wahrscheinlichkeit gering, kleiner als das vorab vereinbarte Signifikanzniveau  $\alpha$ , wird  $H_0$  verworfen und das Ergebnis als statistisch signifikant bezeichnet.

#### 3.3.1 Assoziationsanalysen

##### 3.3.1.1 Fall-Kontroll-Studien

Der Fall-Kontroll-Vergleich betrachtet die Genotypverteilung bei betroffenen Personen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe. Tritt ein Genotyp signifikant häufiger bei Patienten auf ist dies ein Hinweis dafür, dass er mit der Krankheit assoziiert ist (Gambaro et al. 2000).

Der Cochran-Armitage Trend-Test (Agresti 1991) vergleicht die Genotypfrequenzen von Betroffenen und Kontrollpersonen unter Einbeziehung aller drei möglichen Genotypen (homozygot Wildtyp, heterozygot, homozygot mutiert).

Die Odds Ratio gibt an, um welchen Faktor das Krankheitsrisiko einer Person steigt, wenn sie Träger des mutmaßlichen Genotyps ist. Zur Berechnung der Odds Ratio wurde die Häufigkeit des Markergenotypen (677TT Homozygotie im *MTHFR*-Gen oder das seltene Allel  $\Delta 4$  bp im *TGF $\alpha$* -Gen) von Patienten und Kontrollen verglichen. Die Genauigkeit der Odds Ratio ist durch das Konfidenzintervall, ein Wertebereich, der mit einer vorgegebenen Vertrauenswahrscheinlichkeit ( $1-\alpha$ ) die wahre Odds Ratio enthält, angegeben. Da die reguläre Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha=5\%$  beträgt, wird ein 95%iges CI angegeben. Ein großes Konfidenzintervall bekräftigt eine starke Variabilität der Daten (Schlittgen 1991).

### 3.3.1.2 Familienbasierte Assoziationsstudien

Gegenüber der Fall-Kontroll-Studie, bei der die Patienten mit externen Kontrollen verglichen werden, vergleicht der Transmission-Disequilibrium-Test (TDT) Familientrios mit einem betroffenen Kind, und bildet aus den nicht transmittierten Allelen der Eltern interne Kontrollen (Spielmann et al. 1993). Die Kontrollen stammen somit aus derselben ethnischen Gruppe und dienen zuverlässig der Vermeidung von Stratifikationseffekten, die bei der Fall- Kontroll- Studie beobachtet werden können. Mit dem TDT soll ermittelt werden, ob ein bestimmtes Allel überzufällig häufiger von heterozygoten Eltern an ihre betroffenen Nachkommen transmittiert wird (Knapp et al. 1999). Da der Transmission-Disequilibrium-Test (TDT) ein kombinierter Test aus Assoziation und Kopplung ist, bestätigt er eine Assoziation nur, wenn Kopplung nachzuweisen ist und umgekehrt.

Die berechnete Prüfgröße ist  $x^2$ :

$$x^2 = (b-c)^2 / (b+c)$$

$$x^2 = \frac{(\text{Anzahl der transmittierten Allele} - \text{Anzahl der nicht transmittierten Allele})}{(\text{Anzahl der transmittierten Allele} + \text{Anzahl der nicht transmittierten Allele})}$$

Die Berechnung des exakten *P*-Wertes erfolgt nach McNemar (Lehn und Wegmann 1985). Ein signifikantes Ergebnis bestätigt Assoziation und Kopplung, ein nicht signifikantes Ergebnis sagt aus, dass weder Assoziation noch Kopplung vorliegen.

**Tabelle 3-6:** TDT-Vierfeldertafel

Bei *n* Familien wurde für die 2 *n* Eltern untersucht, welches der Markerallele A1 und A2 sie an das betroffene Kind transmittierten und welches nicht. Von den insgesamt 4 *n* Allelen wurden 2 *n* transmittiert und 2 *n* nicht transmittiert.

		nicht-transmittierte Allele		
		A1	A1	gesamt
transmittierte Allele	A1	a	b	a + b
	A2	c	d	c + d
gesamt		a + c	b + d	2 n

## 4 Ergebnisse

### 4.1 5,10-Methylenertetrahydrofolat-Reduktase (*MTHFR*)

Die 5,10-Methylenertetrahydrofolat-Reduktase (*MTHFR*) ist ein Enzym des Folatstoffwechsels. Das Gen liegt auf Chromosom 1p36.3 und besteht aus 11 Exons, die eine Größe 102bp bis 432bp besitzen. Die Größe der Introns reicht von 250 bp bis 4,2kb (Goyette et al 1998). Ein bekannter Polymorphismus im *MTHFR*-Gen ist eine Punktmutation im Exon 4, die durch einen Basenaustausch von Cytosin zu Thymin an Position 677 charakterisiert ist, und die für eine thermolabile Variante des Enzyms kodiert. Die Frequenz des T-Allels weist in der deutschen Bevölkerung eine Häufigkeit von 0,31 auf (Koch et al. 1998), das C-Allel tritt mit einer Häufigkeit von 0,68 auf (Stegmann et al. 1999).

In der vorliegenden Studie soll geprüft werden, ob der homozygote Genotyp 677TT einen Risikofaktor für die Entstehung nicht-syndromaler LK/GS und GS in der deutschen Population darstellt. Zur Überprüfung dieser Hypothese werden Assoziationsanalysen mittels Fall-Kontroll-Vergleich und kombiniertem Test auf Assoziation und Kopplung (Transmission-Disequilibrium- Test) durchgeführt.

#### 4.1.1 Genotypfrequenzen für die 677C→T-Punktmutation im *MTHFR*-Gen bei LK/GS-Patienten, Müttern, Vätern und Kontrollpersonen

Der homozygote Genotyp 677TT konnte bei 12% der Kontrollpersonen (27/233) und 15% der LK/GS-Patienten festgestellt werden (11/72). Die Frequenz des T-Allels wies bei den Patienten eine Häufigkeit von 0,39 auf, bei der Kontrollgruppe trat das T-Allel mit einer Frequenz von 0,32 auf. Das C-Allel zeigte bei den Patienten die Frequenz von 0,61 und bei den Kontrollpersonen von 0,68. Homozygot für die 677C→T-Mutation waren 21% der Mütter (15/72) und 15% der Väter (10/67). Die Frequenz des T-Allels lag bei den Müttern bei 0,41 und den Vätern bei 0,37 (Tabelle 4-1), die Häufigkeit des C-Allels betrug bei den Müttern 0,59 und 0,63 bei den Vätern.

**Tabelle 4-1:** Genotypen und Allelfrequenzen bei Kontrollpersonen, LK/GS-Patienten und deren Eltern. Die Genotypen beziehen sich auf die Punktmutation an Position 677 im Exon 4 des *MTHFR*-Gens

untersuchte Personen		Genotyp			Allelfrequenz	
		CC	CT	TT	C	T
Kontrollen	233	113	93	27	0,68	0,32
♀	151	78	58	15	0,71	0,29
♂	82	35	35	12	0,64	0,36
Patienten	72	27	34	11	0,61	0,39
♀	31	12	14	5	0,61	0,39
♂	41	15	21	5	0,62	0,38
Mütter	72	28	29	15	0,59	0,41
Väter	67	28	29	10	0,63	0,37

n = Personenanzahl, C = nicht mutiertes Allel, T = mutiertes Allel

## 4.1.2 Assoziationsstudien der 677C→T-Punktmutation im *MTHFR*-Gen bei LK/GS-Patienten, Müttern und Vätern

### 4.1.2.1 Fall-Kontroll-Vergleich des homozygoten Genotyps 677TT von LK/GS-Patienten und Kontrollpersonen

Mit der Fall-Kontroll-Studie wurde eine vergleichende Untersuchung durchgeführt bei der ermittelt werden sollte, ob der homozygote Genotyp 677TT bei betroffenen Personen signifikant häufiger nachzuweisen ist als bei den Kontrollpersonen. Die statistischen Parameter wurden mittels zweiseitigem *P*-Wert nach Cochran-Armitage und einer Odds Ratio (95% Konfidenzintervall) berechnet.

Im Vergleich der 677TT-Genotypfrequenzen mit der Summe der Genotypfrequenzen von 677CT und 677CC zwischen 72 LK/GS-Patienten und 233 Kontrollpersonen, konnte mittels Cochran-Armitage Trend-Test kein signifikanter Unterschied der homozygoten Genotyphäufigkeit 677TT der LK/GS-Patienten deutlich gemacht werden ( $P=0,13$ ). Der Vergleich der Genotypfrequenzen 677TT zwischen LK/GS-Patienten (11/72) und Kontrollen (27/233) ergab eine Odds Ratio von 1,38, ein 95%-Konfidenzintervall von [0,58-3,06] und einen *P*-Wert von 0,52. Demzufolge ist keine Assoziation des homozygoten Genotyps 677TT mit LK/GS nachzuweisen.

#### **4.1.2.2 Fall-Kontroll-Vergleich des homozygoten Genotyps 677TT der Mütter und Väter von LK/GS-Patienten mit Kontrollpersonen**

In dieser Fall-Kontroll-Studie soll untersucht werden, ob der homozygote Genotyp 677TT bei Müttern oder Vätern von LK/GS betroffenen Kindern signifikant häufiger auftritt als bei den Kontrollpersonen. Der Vergleich der 677TT-Genotypfrequenzen mit der Summe der Genotypfrequenzen von 677CT und 677CC zwischen 72 Müttern von LK/GS-Patienten und 233 Kontrollpersonen zeigte im Cochran-Armitage Trend-Test eine erhöhte Frequenz des mütterlichen Genotyps 677TT, die jedoch nicht signifikant ist ( $P=0,06$ ). Ein Vergleich der mütterlichen Genotypfrequenz 677TT (15/72) mit der Kontrollgruppe (27/233) ergab eine Odds Ratio von 2,01 ein 95%-Konfidenzintervall von [0,92-4,2] und einen  $P$ -Wert von 0,08. Eine Assoziation des mütterlichen Genotyps 677TT mit der Entstehung von LK/GS ist nicht festzustellen. Die 67 Väter zeigten im Vergleich der Genotypfrequenz 677TT mit der Summe der Genotypfrequenzen 677CT und 677CC zu 233 Kontrollpersonen im Cochran-Armitage Trend-Test keine signifikant erhöhte Häufigkeit des Genotyps 677TT ( $P=0,34$ ). Weitere Berechnungen zeigten nach einem Vergleich des väterlichen Genotyps 677TT (10/67) mit der Kontrollgruppe (27/233) eine Odds Ratio von 1,34, ein 95% Konfidenzintervall von [0,54-3,06] und einen  $P$ -Wert von 0,59. Der väterliche Genotyp 677TT ist nicht mit der Entstehung von LK/GS assoziiert.

#### **4.1.2.3 Familienbasierte Assoziationsstudie bei LK/GS-Familientrios**

Mit dem Transmission-Disequilibrium-Test (TDT), einem kombinierten Test auf Assoziation und Kopplung, soll an Familientrios (Vater und Mutter mit betroffenem Kind) ermittelt werden, ob das T-Allel häufiger an das betroffene Kind vererbt wird als das C-Allel. Da nicht-transmittierte Allele der Eltern als interne Kontrollen dienen, werden verfälschende statistische Effekte durch Unterschiede in der Kontrollpopulation durch diesen Test zuverlässig vermieden. Statistische Berechnungen werden nach McNemar durchgeführt (Spielmann et al. 1993).

Bezüglich der 677C→T-Punktmutation im *MTHFR*-Gen wurden 67 LK/GS-Familientrios (134 Elternteile) genotypisiert, und die Ergebnisse in die Teststatistik

eingefügt. Der Tabelle 4-2 ist zu entnehmen, dass 56/134 Elternteile (29+27=56) für die 677C→T-Mutation im *MTHFR*-Gen heterozygot waren. Das T-Allel wurde in 29/56 Fällen an das betroffene Kind transmittiert und in 27/56 Fällen nicht transmittiert. Homozygot für den Genotyp 677CC waren 54/134 Elternteile und 24/134 für 677TT. Die anschließende statistische Berechnung nach McNemar zeigt, dass das T-Allel in der deutschen Population nicht signifikant häufiger an das betroffene Kind vererbt wird als das C-Allel ( $P=0,89$ ).

**Tabelle 4-2:** TDT-Vierfeldertafel für LK/GS-Familiendios zur familienbasierten Assoziationsanalyse der 677C→T- Punktmutation im *MTHFR*-Gen

		nicht-transmittierte Allele		
		C	T	gesamt
transmittierte Allele	C	54	27	81
	T	29	24	53

C = nicht mutiertes Allel, T = mutiertes Allel

### 4.1.3 Genotypfrequenzen für die 677C→T-Punktmutation im *MTHFR*-Gen bei GS-Patienten, Müttern, Vätern und Kontrollpersonen

Der homozygote Genotyp 677TT konnte weder bei einem unserer Patienten noch bei den Müttern und Vätern nachgewiesen werden (Tabelle 4-3). Die Frequenz des T-Allels lag bei den Patienten bei 0,22, das C-Allel zeigte eine Frequenz von 0,78. Im Vergleich trat das T-Allel bei den Kontrollen mit einer Häufigkeit von 0,32, und das C-Allel mit 0,68 auf. Die Frequenz des T-Allels lag bei den Müttern bei 0,31 und den Vätern bei 0,13, die Häufigkeit des C-Allels betrug bei den Müttern 0,69 und 0,87 bei den Vätern.

**Tabelle 4-3:** Genotypen und Allelfrequenzen bei Kontrollpersonen, GS-Patienten und deren Eltern. Die Genotypen beziehen sich auf die Punktmutation an Position 677 im Exon 4 des MTHFR-Gens

untersuchte Personen	n	Genotyp			Allelfrequenz	
		CC	CT	TT	C	T
Kontrollen	233	113	93	27	0,68	0,32
♀	151	78	58	15	0,71	0,29
♂	82	35	35	12	0,64	0,36
Patienten	16	9	7	0	0,78	0,22
♀	7	3	4	0	0,71	0,29
♂	9	9	3	0	0,83	0,17
Mütter	16	6	10	0	0,69	0,31
Väter	15	11	4	0	0,87	0,13

n = Personenanzahl, C = nicht mutiertes Allel, T = mutiertes Allel

#### 4.1.4 Assoziationsstudien der 677C→T-Punktmutation im *MTHFR*-Gen bei GS-Patienten, Müttern und Vätern

##### 4.1.4.1 Fall-Kontroll-Vergleich des homozygoten Genotyps 677TT von Patienten mit isolierter GS und Kontrollpersonen

Mit der Fall-Kontroll-Studie wurde eine vergleichende Untersuchung durchgeführt bei der ermittelt werden sollte, ob der homozygote Genotyp 677TT bei von GS betroffenen Personen signifikant häufiger nachzuweisen ist als bei den Kontrollpersonen. Die statistischen Parameter wurden mittels zweiseitigem *P*-Wert nach Cochran-Armitage berechnet. Auf weitere statistische Berechnungen musste aufgrund der geringen Probandenzahl verzichtet werden.

Der Cochran-Armitage Trend-Test zeigte bei dem Vergleich der Genotypfrequenz 677TT mit der Summe der Genotypfrequenzen 677CT und 677CC zwischen 16GS-Patienten und 233 Kontrollpersonen kein signifikant häufigeres Auftreten des Genotyps 677TT bei den GS-Patienten ( $P=0,36$ ). Eine Assoziation des Genotyps 677TT mit der Entstehung isolierter GS kann nicht nachgewiesen werden. Auf

weitere statistische Berechnungen musste auf Grund der geringen Probandenanzahl verzichtet werden.

#### **4.1.4.2 Fall-Kontroll-Vergleich des homozygoten Genotyps 677TT der Mütter und Väter von GS-Patienten mit Kontrollpersonen**

Der Cochran-Armitage Trend-Test zeigt im Vergleich der 677TT-Genotypfrequenzen mit der Summe der Genotypfrequenzen von 677CT und 677CC zwischen 16 Müttern von GS-Patienten und 233 Kontrollpersonen keine erhöhte Häufigkeit des mütterlichen Genotyps 677TT ( $P=0,09$ ).

Im Vergleich der 677TT-Genotypfrequenzen mit der Summe der Genotypfrequenzen von 677CT und 677CC zwischen 15 Vätern von GS-Patienten und 233 Kontrollpersonen, konnte mittels Cochran-Armitage Trend-Test kein signifikanter Unterschied der väterlichen Genotyphäufigkeit 677TT der GS-Patienten deutlich gemacht werden ( $P=0,06$ ). Weder der mütterliche, noch der väterliche Genotyp 677TT ist mit der Entstehung von isolierten GS assoziiert. Weitere statistische Berechnungen wurden auch bei diesen Probanden nicht durchgeführt.

#### **4.1.4.3 Familienbasierte Assoziationsstudie bei GS-Familientrios**

Mit dem Transmission-Disequilibrium-Test (TDT) soll ermittelt werden, ob das T-Allel häufiger an das mit einer isolierten GS behafteten Kind vererbt wird als das C-Allel. Statistische Berechnungen werden nach McNemar durchgeführt (Spielmann et al. 1993).

Bezüglich der 677C→T-Punktmutation im *MTHFR*-Gen wurden 15 GS-Familientrios (30 Elternteile) genotypisiert, und die Ergebnisse in die Teststatistik eingefügt. Der Tabelle 4-4 ist zu entnehmen, dass 14/30 Elternteile (6+8=14) für die 677C→T-Mutation im *MTHFR*-Gen heterozygot waren. Das T-Allel wurde in 6/14 Fällen an das betroffene Kind transmittiert und in 8/14 Fällen nicht transmittiert. Homozygot für den Genotyp 677CC waren 16/30 Elternteile, eine 677TT Homozygotie lies sich bei keinem Elternteil finden.

Die anschließende statistische Berechnung nach McNemar zeigt, dass das T-Allel in der deutschen Population nicht signifikant häufiger an das betroffene Kind vererbt wird als das C-Allel ( $P=0,59$ ).

**Tabelle 4-4:** TDT-Vierfeldertafel für GS-Familiendios zur familienbasierten Assoziationsanalyse der 677C→T- Punktmutation im Exon 4 des *MTHFR-Gens*

		nicht-transmittierte Allele		
		C	T	gesamt
transmittierte Allele	C	16	8	24
	T	6	0	6

C = nicht mutiertes Allel, T = mutiertes Allel

## 4.2 Wachstumsfaktor alpha ( $TGF\alpha$ )

Ein weiteres Kandidatengen, das für die Entstehung von LK/GS und isolierter GS prädisponieren soll, ist der Wachstumsfaktor  $TGF\alpha$ . Das aus 160 Aminosäuren bestehende, transmembrane Glykoprotein mit kurzer zytoplasmatischer Domäne wirkt durch Mitoseinduktion auf Differenzierungsvorgänge des Gewebes während der Entwicklung ein (Derynck et al. 1997, Lee et al. 1985, Shum et al. 1996, Mitchel 1997). Das verantwortliche Gen ist auf Chromosom 2p13 lokalisiert und setzt sich aus 6 Exons, deren Größe von 57bp bis 150bp variiert, und 5 Introns zusammen (Machida et al. 1999). Ein Polymorphismus ist eine im Intron 5 lokalisierte Sequenzvariante  $\Delta 4$  bp, die mit einer Allelfrequenz von 0,06 in der deutschen Population anzutreffen ist. Das Wildtypallel hingegen weist eine Frequenz von 0,94 auf (Dersch, persönliche Mitteilung 2001).

In der folgenden Fall-Kontroll-Studie wurde überprüft, ob das seltene Allel  $\Delta 4$  bp das Risiko für die Entstehung nicht-syndromaler LK/GS und GS in der deutschen Population begünstigt. Um diese Hypothese zu verifizieren, werden Assoziationsanalysen mittels Fall-Kontroll-Vergleich und kombiniertem Test auf Assoziation und Kopplung (Transmission-Disequilibrium-Test) verwendet.

## 4.2.1 Genotypfrequenzen des Polymorphismus wt→ $\Delta$ 4 bp im *TGF $\alpha$* -Gen bei LK/GS-Patienten, Müttern, Vätern und Kontrollpersonen

Für den Polymorphismus wt→ $\Delta$ 4 bp waren 26% (19/72) der Patienten im Vergleich zu 13% (14/111) der Kontrollpersonen heterozygot. Die Allelfrequenz von  $\Delta$ 4 bp zeigte bei den Patienten eine Häufigkeit von 0,13, bei den Kontrollen lag sie bei 0,06. Heterozygot für die Sequenzvariante wt/ $\Delta$ 4 bp waren 18% der Mütter (13/72) und 21% der Väter (14/67), die Frequenz des seltenen Allels 4 bp lag bei den Müttern bei 0,09 und den Vätern bei 0,12. Lediglich ein Vater zeigte sich hinsichtlich der Deletion  $\Delta$ 4 bp homozygot.

**Tabelle 4-5:** Genotypen und Allelfrequenzen des Polymorphismus wt→ $\Delta$ 4 bp im *TGF $\alpha$* -Gen bei Kontrollpersonen, LK/GS-Patienten und deren Eltern

untersuchte Personen	n	Genotyp			Allelfrequenz	
		wt/wt	wt/ $\Delta$ 4 bp	$\Delta$ 4 bp/ $\Delta$ 4 bp	wt	$\Delta$ 4 bp
Kontrollen	111	97	14	0	0,94	0,06
♀	65	56	9	0	0,93	0,07
♂	46	41	5	0	0,94	0,06
Patienten	72	53	19	0	0,87	0,13
♀	31	22	9	0	0,85	0,15
♂	41	31	10	0	0,88	0,12
Mütter	72	59	13	0	0,91	0,09
Väter	67	52	14	1	0,88	0,12

n = Personenanzahl, wt = Wildtypallel,  $\Delta$ 4bp = seltenes Allel

## 4.2.2 Assoziationsstudien des Polymorphismus wt→ $\Delta$ 4 bp im *TGF $\alpha$* -Gen bei LK/GS-Patienten, Müttern und Vätern

### 4.2.2.1 Fall-Kontroll-Vergleich des seltenen Allels $\Delta$ 4 bp von LK/GS-Patienten und Kontrollpersonen

Bei dieser Untersuchung soll mit der Fall-Kontroll-Studie ermittelt werden, ob das seltene Allel  $\Delta$ 4 bp bei LK/GS-Patienten signifikant häufiger nachgewiesen werden kann als bei den Kontrollpersonen. Als statistische Parameter wurden ein

zweiseitiger *P*-Wert nach Cochran Armitage und eine Odds Ratio (95% Konfidenzintervall) berechnet.

In einem Vergleich der Genotypfrequenzen wt/ $\Delta$ 4 bp gegenüber der Summe der Genotypfrequenzen wt/wt und  $\Delta$ 4 bp/ $\Delta$ 4 bp von 72 LK/GS-Patienten und 111 Kontrollpersonen, konnte durch den Cochran-Armitage Trend-Test ein signifikant häufigeres Auftreten des Allels  $\Delta$ 4 bp bei LK/GS-Patienten ( $P=0,03$ ) beobachtet werden. Der Vergleich der heterozygoten Genotypfrequenzen wt/ $\Delta$ 4 bp zwischen LK/GS-Patienten (19/72) und Kontrollen (14/111) ergab eine Odds Ratio von 2,48 mit einem 95% Konfidenzintervall von [1,08-5,79] und einen *P*-Wert von 0,03. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine Assoziation des seltenen Allels  $\Delta$ 4 bp mit der Entstehung von LK/GS.

#### **4.2.2.2 Fall-Kontroll-Vergleich des seltenen Allels $\Delta$ 4 bp der Mütter und Väter von LK/GS-Patienten mit Kontrollpersonen**

In dieser Fall-Kontroll-Studie soll untersucht werden, ob der heterozygote Genotyp wt/ $\Delta$ 4 bp bei Müttern oder Vätern von LK/GS betroffenen Kindern signifikant häufiger auftritt als bei den Kontrollpersonen. Der Vergleich der Genotypfrequenzen wt/ $\Delta$ 4 bp mit der Summe der Genotypfrequenzen wt/wt und  $\Delta$ 4 bp/ $\Delta$ 4 bp zwischen 72 Müttern der LK/GS-Patienten und 111 Kontrollpersonen, zeigte keine signifikant erhöhte Häufigkeit des mütterlichen Genotyps wt/ $\Delta$ 4 bp ( $P=0,42$ ). Ein Vergleich der mütterlichen Genotypfrequenz wt/ $\Delta$ 4 bp (13/72) mit der Kontrollgruppe (14/111) ergab eine Odds Ratio von 1,53 ein 95%-Konfidenzintervall von [0,61- 3,77] und einen *P*-Wert von 0,42. Eine Assoziation des mütterlichen Genotyps wt/ $\Delta$ 4 bp mit der Entstehung von LK/GS ist nicht festzustellen.

Die 67 Väter zeigten im Vergleich der Genotypfrequenzen wt/ $\Delta$ 4 bp mit der Summe der Genotypfrequenzen wt/wt und  $\Delta$ 4/ $\Delta$ 4 bp zu 111 Kontrollpersonen im Cochran-Armitage Trend-Test keine signifikant erhöhte Häufigkeit des Genotyps wt/ $\Delta$ 4 bp ( $P=0,19$ ). Berechnungen der Odds Ratio zeigten einen Wert von 1,83, ein 95% Konfidenzintervall von [0,75- 4,48] und einen *P*-Wert von 0,21. Eine Assoziation des väterlichen Genotyps wt/ $\Delta$ 4 bp mit der Entstehung von LK/GS kann nicht gezeigt werden.

### 4.2.2.3 Familienbasierte Assoziationsstudie bei LK/GS-Familiendios

Mit dem Transmission-Disequilibrium-Test (TDT) soll an Familiendios (Vater und Mutter mit betroffenem Kind) ermittelt werden, ob das seltene Allel  $\Delta 4$  bp häufiger an das betroffene Kind vererbt wird als das Wildtypallel wt. Da nicht-transmittierte Allele der Eltern als interne Kontrollen dienen, werden verfälschende statistische Effekte durch Unterschiede in der Kontrollpopulation in diesem Test zuverlässig vermieden. Statistische Berechnungen werden nach McNemar durchgeführt (Spielmann et al. 1993).

Bezüglich der Sequenzvariante wt $\rightarrow\Delta 4$  im *TGF $\alpha$* -Gen wurden 67 LK/GS-Familiendios (134 Elternteile) genotypisiert, und die Ergebnisse in die Teststatistik eingefügt. Der Tabelle 4-6 ist zu entnehmen, dass 27/134 Elternteile (10+17=27) heterozygot waren. Das seltene Allel  $\Delta 4$  bp wurde in 17/27 Fällen an das betroffene Kind transmittiert und in 10/27 Fällen nicht transmittiert. Homozygot für das Wildtypallel wt waren 106/134 Elternteile, homozygot für die Sequenzvariante  $\Delta 4$  bp war lediglich ein Elternteil. Die anschließende statistische Berechnung nach McNemar zeigt keine signifikant erhöhte Vererbungswahrscheinlichkeit des Allels  $\Delta 4$  bp ( $P=0,25$ ).

**Tabelle 4-6:** TDT-Vierfeldertafel für LK/GS-Familiendios zur familienbasierten Assoziationsanalyse des Polymorphismus wt $\rightarrow\Delta 4$  bp im Intron 5 des *TGF $\alpha$* -Gens

		nicht-transmittierte Allele		
		wt	$\Delta 4$ bp	gesamt
transmittierte Allele	wt	106	10	116
	$\Delta 4$ bp	17	1	18

wt= Wildtypallel,  $\Delta 4$ bp= seltenes Allel

### 4.2.3 Genotypfrequenzen des Polymorphismus wt→ $\Delta$ 4 bp im *TGF $\alpha$* -Gen bei GS-Patienten, Müttern, Vätern und Kontrollpersonen

Den heterozygoten Genotyp wt/ $\Delta$ 4 bp besaßen 12% der GS-Patienten (2/16) gegenüber 13% der Kontrollpersonen (14/111). Die Allelfrequenz des Allels  $\Delta$ 4 bp lag in beiden Gruppen bei 0,06, das Wildtypallel zeigte eine Frequenz von 0,94.

25% der Mütter (4/16) und 13% der Väter (2/15) offenbarten den heterozygoten Genotyp wt/ $\Delta$ 4 bp. Die Allelfrequenz von  $\Delta$ 4 bp zeigte bei den Müttern eine Häufigkeit von 0,12 und bei den Vätern 0,07. Das Wildtypallel war bei den Müttern mit einer Frequenz von 0,88 und den Vätern von 0,93 vertreten.

**Tabelle 4- 7:** Genotypen und Allelfrequenzen des Polymorphismus wt→ $\Delta$ 4 bp im *TGF $\alpha$* -Gen bei Kontrollpersonen, GS-Patienten und deren Eltern

untersuchte Personen	n	Genotyp			Allelfrequenz	
		wt/wt	wt/ $\Delta$ 4 bp	$\Delta$ 4 bp/ $\Delta$ 4 bp	wt	$\Delta$ 4 bp
Kontrollen	111	97	14	0	0,94	0,06
♀	65	56	9	0	0,93	0,07
♂	46	41	5	0	0,94	0,06
Patienten	16	14	2	0	0,94	0,06
♀	7	7	0	0	1,00	0,00
♂	9	8	1	0	0,95	0,05
Mütter	16	12	4	0	0,88	0,12
Väter	15	13	2	0	0,93	0,07

n = Personenanzahl, wt = Wildtypallel,  $\Delta$ 4bp= seltenes Allel

### 4.2.4 Assoziationsstudien des Polymorphismus wt→ $\Delta$ 4 bp im *TGF $\alpha$* -Gen bei GS-Patienten, Müttern und Vätern

#### 4.2.4.1 Fall-Kontroll-Vergleich des seltenen Allels $\Delta$ 4 bp von GS-Patienten und Kontrollpersonen

Bei dieser Fall-Kontroll-Studie wurde eine vergleichende Untersuchung durchgeführt bei der ermittelt werden soll, ob der heterozygote Genotyp wt/ $\Delta$ 4 bp bei betroffenen Personen signifikant häufiger nachzuweisen ist. Die statistischen Parameter wurden

mit einem zweiseitigen  $P$ -Wert nach Cochran Armitage und einer Odds Ratio (95% Konfidenzintervall) berechnet.

In einem Vergleich der Genotypfrequenzen wt/ $\Delta$ 4 bp gegenüber der Summe der Genotypfrequenzen wt/wt und  $\Delta$ 4 bp/ $\Delta$ 4 bp der 16 GS-Patienten und 111 Kontrollpersonen, konnte mittels Cochran-Armitage Trend-Test kein signifikant häufigeres Auftreten des seltenen Allels  $\Delta$ 4 bp bei GS-Patienten beobachtet werden ( $P=1,00$ ). Der Vergleich der heterozygoten Genotypfrequenzen wt/ $\Delta$ 4 bp zwischen GS-Patienten (2/16) und Kontrollpersonen (14/111) ergab eine Odds Ratio von 0,99, ein 95% Konfidenzintervall von [0,09-5,09] und einen  $P$ -Wert von 1,00. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen keine Assoziation des Allels  $\Delta$ 4 bp mit der Entstehung von isolierten GS.

#### **4.2.4.2 Fall-Kontroll-Vergleich des seltenen Allels $\Delta$ 4 bp der Mütter und Väter von GS-Patienten mit Kontrollpersonen**

In dieser Fall-Kontroll-Studie soll untersucht werden, ob der heterozygote Genotyp wt/ $\Delta$ 4 bp bei Müttern oder Vätern GS betroffener Kinder signifikant häufiger auftritt als bei den Kontrollpersonen. In einem Vergleich der Genotypfrequenzen wt/ $\Delta$ 4 bp mit der Summe der Genotypfrequenzen wt/wt und  $\Delta$ 4 bp/ $\Delta$ 4 bp zwischen 16 Müttern von GS-Patienten und 111 Kontrollpersonen konnte kein signifikanter Unterschied des mütterlichen Genotyps wt $\rightarrow$  $\Delta$ 4 bp ermittelt werden ( $P=0,34$ ). Es ergab sich bei weiteren Berechnungen eine Odds Ratio von 2,31, ein 95% Konfidenzintervall von [0,47- 9,06] und einen  $P$ -Wert von 0,34. Somit kann keine statistisch signifikante Assoziation des mütterlichen Genotyps wt/ $\Delta$ 4 bp mit isolierten GS aufgezeigt werden.

Die 15 Väter zeigten im Vergleich der Genotypen wt/ $\Delta$ 4 bp mit der Summe der Genotypen wt/wt und  $\Delta$ 4 bp/ $\Delta$ 4 bp zu 111 Kontrollpersonen ebenfalls keinen signifikanten Unterschied des Genotyps wt/ $\Delta$ 4 bp ( $P=1,00$ ). Im Vergleich der Genotypen wt/ $\Delta$ 4 bp von 2/15 Vätern mit 14/111 Kontrollpersonen ergaben sich

Werte für die Odds Ratio von 1,07, das 95% Konfidenzintervall [0,10- 5,54] und ein *P*-Wert von 1,00. In dieser Untersuchung wurde gezeigt, dass der väterliche Genotyp wt/ $\Delta$ 4 bp nicht mit der Entstehung von GS assoziiert ist.

#### 4.2.4.3 Familienbasierte Assoziationsstudie bei GS-Familiertrios

In dieser Untersuchung soll mittels Transmission-Disequilibrium-Test nachgeprüft werden, ob das seltene Allel mit der Sequenzvariante  $\Delta$ 4 bp signifikant häufiger an das betroffene Kind weitergegeben wird als das Wildtypallel wt. Für die Sequenzvariante wt $\rightarrow$  $\Delta$ 4 bp wurden 15 GS-Familiertrios genotypisiert (30 Elternteile), und die Ergebnisse in die für den Transmission- Disequilibrium-Test relevante Vierfeldertafel eintragen.

Den Daten der Tabelle 4-8 ist zu entnehmen, dass insgesamt 5/30 Elternteile (3+2=5) heterozygot waren, und die Sequenzvariante  $\Delta$ 4 bp in 2/5 Fällen an das betroffene Kind transmittierten und in 3/5 Fällen nicht transmittierten. Homozygot für das Wildtypallel waren 25/30 Elternteile, homozygot für die Sequenzvariante  $\Delta$ 4 bp war kein Elternteil. Bei der statistischen Berechnung nach McNemar konnte festgestellt werden, dass die Sequenzvariante  $\Delta$ 4 bp nicht mit GS gekoppelt und assoziiert ist (*P*= 0,65).

**Tabelle 4-8:** TDT-Vierfeldertafel für GS-Familiertrios zur familienbasierten Assoziationsanalyse des Polymorphismus wt $\rightarrow$  $\Delta$ 4 bp im Intron 5 des *TGF $\alpha$* -Gens

		nicht-transmittierte Allele		
		wt	$\Delta$ 4 bp	gesamt
transmittierte Allele	wt	25	3	28
	$\Delta$ 4 bp	2	0	2

wt= Wildtyp,  $\Delta$ 4 bp= seltenes Allel

### **4.3 Auswertung der Fragebögen**

Auf eine Auswertung der zu Beginn der Studie ausgegebenen Fragebögen zur Ursachenforschung von Spaltbildungen in der Familie musste im Rahmen dieser Arbeit verzichtet werden. Der Fragebogen beinhaltet eine ausführliche Familienanamnese und eine spezielle Anamnese der Eltern, die besonders den mütterlichen Nikotin- und Alkoholkonsum, sowie die Arzneiverordnung während der Schwangerschaft berücksichtigt. Die Frage nach Nikotinkonsum in der frühen Schwangerschaft wurde von einigen Müttern nicht verlässlich beantwortet. Desgleichen wurden von einigen Elternteilen ungenaue Angaben zu Medikation und Folsäureprophylaxe gemacht. Eine Auswertung der Fragebögen wird nach Vervollständigung in einer nachfolgenden Studie erfolgen.

## 5 Diskussion

Die Lippen-Kiefer-Gaumenspalten (LKG) zählen zu den häufigsten angeborenen Fehlbildungen des Menschen, deren Prävalenz in verschiedenen Populationen mit wechselnder Häufigkeit erfasst werden kann (Vanderas 1987, Sayetta 1989). Die Lippen-Kiefer-Gaumenspalten haben ihren Ursprung zu unterschiedlichen Zeitpunkten der embryonalen Gesichtsentwicklung, da Lippen- und Gaumenbildung nacheinander erfolgen. Aufgrund dieser Tatsache werden Lippen-Kieferspalten mit oder ohne Spalte im harten/weichen Gaumen (LK/GS) von isolierten Spaltbildungen des harten/weichen Gaumens (GS) unterschieden. Der Ätiologie der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten wird eine multifaktorielle Genese zugeschrieben, wobei das Zusammenspiel genetischer Risikofaktoren mit weiteren exogenen Faktoren für die Entstehung verantwortlich gemacht wird.

In dieser Studie wurden ausschließlich Patienten mit nicht-syndromalen LK/GS und GS untersucht. Die Einteilung des Phänotyps der Patienten erfolgte nach dem Modell der Thallwitzer Nomenklatur. Bei den anschließenden statistischen Berechnungen wurde jedoch nur zwischen LK/GS- und GS-Patienten unterschieden.

Bei Untersuchungen des am Folsäurestoffwechsel beteiligten Gens der 5,10-Methylentetrahydrofolat-Reduktase (*MTHFR*) konnte als Risikofaktor für die Entstehung nicht-syndromaler LK/GS und GS eine Punktmutation im Exon 4 identifiziert werden (Tolarova et al. 1998), aus der eine thermolabile Enzymvariante mit eingeschränkter Aktivität resultiert. Durch die perikonzeptionelle Gabe hochdosierter Folsäurepräparate kann das Entstehungsrisiko für LK/GS um ein Vielfaches reduziert werden (Tolarova et al. 1995).

Als weiteres Kandidatengen wird der Wachstumsfaktor Transforming growth factor alpha (*TGF $\alpha$* ) angesehen, da er während der frühen Gesichtsentwicklung zum Zeitpunkt der Gaumenfusion verstärkt im Mittellinienepithel exprimiert wird (Ferguson et al. 1987 und 1988, Dixon et al. 1991). Mittels molekulargenetischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Sequenzvariante um eine 4 bp umfassende Deletion handelt, für die in einigen Populationen eine Assoziation mit nicht-syndromaler LK/GS und GS bereits bewiesen werden konnte (Ardinger et al. 1989).

## 5.1 Assoziationsanalysen

### 5.1.1 Fall-Kontroll-Studien

Zur Prüfung der deutschen Population auf Assoziation der Polymorphismen 677C→T des *MTHFR*- und wt→Δ4 bp des *TGFα*-Gens mit nicht-syndromalen LK/GS oder GS wurden Fall-Kontroll-Studien herangezogen. Diese Studien vergleichen die Frequenz der Sequenzvarianten bei betroffenen Personen und einer Kontrollgruppe. Treten die Markerallele signifikant häufiger bei Patienten mit LK/GS oder GS auf folgert man, dass sie mit der Krankheit assoziiert sind (Kreienbrock und Schach 2000).

Um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden, muss zunächst bei der Prüfung auf Assoziation die für die Population spezifische Frequenz der untersuchten Sequenzvariante ermittelt werden. Entstammen Patienten und Kontrollen unterschiedlichen Populationen, die sich in der Frequenz des Markerallels unterscheiden, resultieren falsch-positive Assoziationen (Schaid und Sommer 1993, Lander und Schork 1994).

### 5.1.2 Familienbasierte Assoziationsstudien

Zur Vermeidung der bei der Fall-Kontroll-Studie häufig auftretenden Probleme durch externe Kontrollen, wurde in dieser Studie zusätzlich mit dem Transmission-Disequilibrium-Test auf Assoziation und Kopplung geprüft.

Der Transmission-Disequilibrium-Test ist eine Assoziationsstudie, die sich durch die beständige Vermeidung von Populationseffekten auszeichnet. In die Untersuchungen wurden Familientrios (Vater, Mutter und betroffenes Kind) einbezogen, wobei die nicht transmittierten Allele der Eltern als interne Kontrollen verwendet wurden. Somit ist sichergestellt, dass Patienten und Kontrollen genetisch einheitlichen Populationen entstammen. Der Transmission-Disequilibrium-Test vergleicht nun die Häufigkeiten der vererbten und der nicht vererbten Allele heterozygoter Eltern. Wird das mutmaßlich für LK/GS oder GS verantwortliche Allel überzufällig häufig an das betroffene Kind weitergegeben, so liegt Kopplung und Assoziation mit LK/GS oder GS vor.

Im Vergleich zu klassischen Assoziationsstudien beträgt der diagnostische Mehraufwand beim Transmission-Disequilibrium-Test bis zu 50%, da drei Personen genotypisiert werden müssen.

Der Transmission-Disequilibrium-Test ist für die Untersuchung von LK/GS und GS gut geeignet, da die Erkrankung bereits mit der Geburt manifestiert ist. Später auftretende Erkrankungen verringern die Chance, Patienten mit noch lebenden Elternteilen ausfindig zu machen.

## **5.2 Kandidatengen 5,10-Methylentetrahydrofolat-Reduktase (*MTHFR*)**

Die 5,10-Methylentetrahydrofolat-Reduktase ist ein Enzym des Folatstoffwechsels. Es katalysiert die Reduktion von 5,10-Methylentetrahydrofolat zur biologisch aktiven Form der Folsäure im Serum, dem 5-Methyltetrahydrofolat. Da durch die perikonzeptionelle Gabe von Folsäure eine deutliche Risikoreduktion nicht-syndromaler LK/GS und GS erreicht werden kann (Shaw et al. 1995, Tolarova and Harris 1995), wird den Genen des Folsäurestoffwechsels eine bedeutende Rolle für die Entstehung nicht-syndromaler LK/GS und GS zugeschrieben.

Wertvolle Hinweise auf die Ursache der Folsäurestoffwechselstörung lieferten Untersuchungen von Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen, bei denen eine moderate Homocysteinämie und erniedrigte Folsäurespiegel im Plasma und in den Erythrozyten festgestellt werden konnte (Kang et al. 1991, Engbersen et al. 1995, Harmon et al. 1996). Diese Erkenntnis wurde durch weitere Studien aus unterschiedlichen Populationen bestätigt (USA: Kang et al. 1991, Irland: Kirke et al. 1993, Kanada: Frosst et al. 1995, Niederlande: Kluijtmans et al. 1996, Steegers-Theunissen et al. 1994 und 1995). Mit Hilfe molekulargenetischer Untersuchungen konnte bei einem Teil dieser Patientengruppe eine neue Enzymvariante identifiziert werden, die sich durch eine *in vitro*-Thermolabilität bei 46° C und eine verminderte Enzymaktivität auszeichnet (Kang et al. 1988). Die Ursache der Thermolabilität des Enzyms 5,10-Methylentetrahydrofolat-Reduktase (*MTHFR*) ist eine Basensubstitution von Cytosin zu Thymin im Exon 4 an Position 677 des *MTHFR*-

Gens, die einen Austausch der hochkonservierten Aminosäure Alanin gegen Valin in der katalytischen Domäne des Enzyms zur Folge hat (Frosst et al. 1995).

Bei Müttern von Neuralrohrdefekten (NRD) betroffenen Kindern konnte während der Schwangerschaft eine Homocysteinämie als Risikofaktor identifiziert werden. Da LK/GS und GS ebenso wie NRD den Mittelliniendefekten zugeordnet sind, und die Entstehung beider Krankheitsbilder durch die perikonzeptionelle Gabe von Vitaminen (Folsäure) inhibiert werden kann ist es interessant zu betrachten, ob die Prävalenz der Homocysteinämie bei Müttern von LK/GS- oder GS-betroffenen Kindern ebenfalls als Risikofaktor bewiesen werden kann (Hall et al. 1998, Beall and Rosenquist 1990, Wyszynski et al. 2000). Neben dem erhöhten Homocysteinspiegel zeigten schwangere Frauen, die ein an LK/GS oder GS erkranktes Kind austrugen, einen Anstieg des Folatspiegels im Serum und in den Erythrozyten, sowie einen erniedrigten Vitamin B<sub>6</sub>-Spiegel (Wong et al. 1999).

Ein erhöhtes Risiko für die Entstehung einer nicht-syndromalen LK/GS oder GS des Kindes könnte bei Vorliegen einer aberranten MTHFR durch unterschiedliche Mechanismen hervorgerufen werden. Eine verminderte Enzymaktivität der 5,10-Methyltetrahydrofolat-Reduktase könnte eine zu geringe Menge 5-Methyltetrahydrofolat für die Umwandlung von Homocystein zu Methionin bereitstellen, woraus eine verminderte Produktion von S-Adenosylmethionin resultiert (biochemischer Reaktionsweg Abbildung 1-1), die wiederum eine Reihe biologisch wichtiger Methylierungsreaktionen limitieren würde. Rosenquist und Mitarbeiter (1996) zeigten am Vogelembryo, dass durch erhöhte Homocysteinwerte das Migrationsverhalten der das Neuralrohr bildenden Zellen negativ beeinflusst werden kann. Da die Muskelzellen der Lippe und des Gaumens der selben Zelllinie entstammen ist es wahrscheinlich, dass durch die limitierten Methylierungsreaktionen während der Embryogenese Störungen der Genregulation im Kopfbereich, und somit eine LK/GS oder GS resultieren (Thorogood and Tickle 1988).

Desgleichen könnte die DNA-Synthese durch eine mangelhafte Produktion von 5-Methyltetrahydrofolsäure beeinträchtigt werden.

Die durch einen genetischen Defekt des Enzyms 5,10-Methyltetrahydrofolat-Reduktase hervorgerufene Homocysteinämie wird des Weiteren von steigenden

Folatkonzentrationen im Serum und abnehmende Folatwerten in den Erythrozyten begleitet (Engbersen et al. 1995, van den Put et al. 1995, 1997, Jaques et al. 1996). Durch Folsäuresubstitution können die Homocysteinwerte im Plasma signifikant reduziert, und die Folatwerte in den Erythrozyten erhöht werden (Cuskelly et al. 1996, Ubbink 1997). Die Homocysteinämie der Mütter von LK/GS- und GS-Patienten ist wahrscheinlich nicht mit den Folatkonzentrationen vergesellschaftet, da der Folatspiegel im Serum als auch in den Erythrozyten signifikant erhöht ist. Die bereits häufiger beobachtete Korrelation zwischen Folsäure und nüchternen Homocysteinwerten konnte bei den Müttern von LK/GS oder GS betroffenen Kindern ebenfalls nicht bestätigt werden (Ubbink et al. 1993, Steegers-Theunissen et al. 1994, Selhub et al. 1996).

In verschiedenen Studien weltweit wurde der Polymorphismus 677C→T im *MTHFR*-Gen als möglicher Risikofaktor für LK/GS und GS bei betroffenen Personen und deren Eltern untersucht. Die Assoziation der Punktmutation zu Patienten mit nicht-syndromaler LK/GS konnte in einer argentinischen Studie festgestellt werden (Tolarova et al. 1998  $P=0,01$ ), andere Studien konnten den Polymorphismus 677C→T als Risikofaktor in der untersuchten Population nicht bestätigen (USA, Kaukasier: Shaw et al. 1998  $P=0,30$ , USA, Kaukasier: Blanton et al. 2000  $P=0,84$ ). Eine Studie hob die Assoziation des homozygoten Genotyps 677TT bei Patienten mit isolierter Gaumenspalte in der irischen Population hervor (Mills et al. 1999  $P=0,02$ ). Die Assoziation des mütterlichen Genotyps 677TT mit LK/GS zeigte eine Studie der italienischen Bevölkerung (Martinelli et al. 2001  $P=0,02$ ).

### **5.2.1 Assoziationsanalysen der 677C→T Punktmutation im *MTHFR*-Gen bei LK/GS- und GS-Patienten, Müttern und Vätern**

In der vorliegenden Studie wurde mittels Fall-Kontroll-Studie und Transmission-Disequilibrium-Test (TDT) untersucht, ob der Polymorphismus 677C→T im Exon 4 des *MTHFR*-Gens in der deutschen Population einen Risikofaktor für die Entstehung nicht-syndromaler LK/GS und GS darstellt. Um falsch-positive Assoziationen zu

verhindern, wurden zunächst die populationspezifischen Frequenzen der untersuchten Markerallele ermittelt. Die Frequenzen des T-Allels und des Genotyps 677TT liegen in der deutschen Bevölkerung bei 0,32 und 0,11 (Tabelle 5-1), und sind somit im Vergleich mit anderen Populationen im unteren Bereich einzuordnen. Die T-Allel- und 677TT-Genotypfrequenzen weisen in der amerikanisch-texanischen Population die höchsten (T-Allelfrequenz: 0,59, 677TT-Genotypfrequenz: 0,35) und in der niederländischen die niedrigsten Werte auf (T-Allelfrequenz: 0,26, 677TT-Genotypfrequenz: 0,05). Weitere Genotyp- und Allelfrequenzen sind der Tabelle 5-1 zu entnehmen.

**Tabelle 5-1:** Genotyp- und Allelfrequenzen für den Polymorphismus 677C→T im *MTHFR*-Gen in verschiedenen Populationen (nach Fletcher&Kessling 1998, Schneider et al. 1998, Rady et al. 1999, Shaw et al. 1999, diese Studie)

Kontinent	Population/Land	677T- Allelfrequenz	677TT- Genotypfrequenz
Europa	Niederlande	0,26	0,05
	Irland	0,28	0,06
	Deutschland	0,32	0,11
	England	0,38	0,12
	Italien	0,40	0,15
Amerika	South Carolina, Kaukasier	0,35	0,13
	Kalifornien, Kaukasier	0,41	0,36
	Kanada	0,37	0,16
	Mexiko, Texas	0,59	0,35
	Ashkenazi Juden	0,48	0,26
	Brasilien, Kaukasier	0,35	0,13

Eine Variation der T-Allelfrequenzen von LK/GS-Patienten ist in den unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen ebenfalls zu beobachten. Bei LK/GS-Patienten der deutschen Population beträgt die T-Allelfrequenz 0,39 und die 677TT-Genotypfrequenz 0,15 (Tabelle 5-2). Im Vergleich mit anderen Populationen sind die Werte der 677TT-Genotyp- und T-Allelfrequenz im oberen Bereich anzusiedeln. Eine Übersicht über die 677TT-Genotyp- und T-Allelfrequenzen bei LK/GS-Patienten in verschiedenen Populationen bietet die Tabelle 5-2.

**Tabelle 5-2:** Genotyp- und Allelfrequenzen für die Punktmutation 677C→T im *MTHFR*-Gen bei LK/GS-Patienten in verschiedenen Populationen

Kontinent	Population/ Land	677T- Allelfrequenz	677TT- Genotypfrequenz	Literatur
Europa	Deutschland	0,39	0,15	diese Studie
	Irland	kA	0,15	Mills et al. 1999
Amerika	Kalifornien, Kaukasier	0,32	0,13	Shaw et al. 1998
	Kalifornien, Hispanier	0,39	0,14	Shaw et al. 1998
	Brasilien, Kaukasier	0,36	0,10	Gaspar et al. 1999
	Italien	0,42	0,19	Martinelli et al. 2001

kA= keine Angaben

Patienten mit isolierter Gaumenspalte weisen eine Frequenz des T-Alleles von 0,22 auf. Diese ist im Vergleich mit der amerikanischen Populationen geringer (Tabelle 5-3). Träger des homozygoten Genotyps 677TT ist in dieser Studie keiner der Patienten. Weitere Ergebnisse der T-Allel- und 677TT-Genotypfrequenzen anderer Bevölkerungsgruppen liegen bisher nicht vor.

**Tabelle 5-3:** Genotyp- und Allelfrequenzen für die Punktmutation 677C→T im *MTHFR*-Gen bei GS-Patienten in verschiedenen Populationen

Kontinent	Population/ Land	677T- Allelfrequenz	677TT- Genotypfrequenz	Literatur
Amerika	Kalifornien, Kaukasier	0,31	0,09	Shaw et al. 1999
Europa	Irland	kA	0,26	Mills et al. 1999
	Deutschland	0,22	kA	diese Studie

kA= keine Angaben

Im Vergleich der Genotypfrequenzen 677TT versus 677CT und 677CC von LK/GS- und GS-Patienten mit Kontrollpersonen der deutschen Population wurde kein statistisch signifikanter Unterschied deutlich (LK/GS:  $P=0,13$ , GS:  $P=0,36$ ). Die Assoziation des Genotyps 677TT ist in der deutschen Population nicht mit dem Auftreten nicht-syndromaler LK/GS oder isolierter GS festzustellen. Die widersprüchlichen Ergebnisse bisher durchgeführter Assoziationsstudien sind auf diverse Ursachen zurückzuführen. Die Betrachtung der Allelfrequenzen in der untersuchten Population und die Wahl der Kontrollgruppe ist ebenso zu berücksichtigen wie die Inhomogenität der Patientengruppen bezüglich der Einteilung in familiäre und sporadische Fälle. Ferner sollte darauf geachtet werden, die Patienten in nach dem Phänotyp geordneten Gruppen aufzuteilen, um explizit den Genotyp oder die Allelfrequenz ein- oder beidseitiger LK/GS beurteilen zu können. Wie bereits beschrieben, sind die Allel- und Genotypfrequenzen für den Polymorphismus 677C→T stark populationsabhängig (Tabelle 5-1). In der britischen Population ist die Frequenz des Genotyps 677TT doppelt so groß wie in der irischen (677TT :0,12 versus 677TT: 0,06). Die T-Allelfrequenzen zeigen ähnlich unterschiedliche Werte. Ist der Anteil des homozygoten Genotyps 677TT in einer Population besonders hoch, so kann der Nachweis einer signifikanten Assoziation in einer Fall-Kontroll-Studie erschwert werden. Die negativen Ergebnisse der Assoziationsstudien von Gaspar und Mitarbeitern (1999) sowie Blanton und

Mitarbeitern (2000) in der US-amerikanischen und brasilianisch-kaukasischen Bevölkerung könnten somit aus der hohen Homozygotenfrequenz des Genotyps 677TT dieser Population resultieren.

Um ein falsch-positives Ergebnis zu vermeiden, muss eine sorgfältige Wahl der Kontrollgruppe erfolgen, die aus der selben Bevölkerungsgruppe stammen muss wie die Patienten, da sich die unterschiedlichen ethnischen Gruppen genetisch unterscheiden. Untersuchungen von Bevölkerungsgruppen, die sich durch weitgehende Homogenität auszeichnen (z.B. Irland, Niederlande), zeigen geringere T-Allelfrequenzen als die durch Immigranten genetisch inhomogeneren USA. In der irischen Population konnte die Assoziation des Genotyps 677TT mit isolierter GS aufgezeigt werden. Die Prävalenz ist zudem für LK/GS und GS in der weißen Bevölkerung weiterverbreitet als in der schwarzen (Stevenson et al. 1997).

Ein weiterer, die Inhomogenität der Patientengruppen betreffender Faktor ist der unterschiedliche Anteil untersuchter Personen mit ein- oder beidseitiger LK/GS. Shaw und Mitarbeiter (1998) sowie Mills und Mitarbeiter (1999) untersuchten Patienten mit isolierter Lippenpalte in Bezug auf den homozygoten Genotyp 677TT, wobei Mills und Mitarbeiter (1999) eine nicht signifikant erhöhte 677TT-Genotypfrequenz bei dieser Patientengruppe feststellen konnten. Die Studie von Shaw und Mitarbeitern (1998) zeigte keine Assoziation. Eine Studie ignorierte, trotz Kenntnis der unterschiedlichen Ätiologie von LK/GS und GS, die Unterteilung der Probanden in zwei Gruppen (Blanton et al. 2000).

In der vorliegenden Studie waren 17% (6/36) der Patienten mit einer doppelseitigen LK/GS und 8% (3/36) der Patienten mit einseitiger LK/GS bezüglich des Polymorphismus 677C→T homozygot. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch mit den von Tolarova und Mitarbeitern (1998) erhobenen Daten, da ein größerer Anteil für den Polymorphismus 677TT homozygoter Patienten den Phänotyp einer beidseitigen LK/GS offenbarte.

Zur Vermeidung irrtümlicher Assoziationen ist ebenso die Unterteilung familiärer und sporadischer Fälle sinnvoll (Tolarova et al. 1998). Der Anteil familiärer LK/GS-Fälle betrug in dieser Studie 18% (13/72). Keiner dieser Patienten zeigte sich hinsichtlich des Polymorphismus 677C→T homozygot. Der Genotyp 677TT konnte bei 12% (9/72) der sporadisch auftretenden Fälle registriert werden. Das vermehrte

Auftreten des Genotyps 677TT bei von beidseitiger LK/GS betroffenen Patienten konnte in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden.

Der Anteil familiärer Fälle betrug bei den Patienten mit isolierter GS 19% (3/16). Bei dieser Patientengruppe zeigte sich keiner der Probanden für den Polymorphismus 677C→T homozygot. Bei den sporadisch auftretenden Fällen konnte der Polymorphismus 677C→T ebenfalls nicht nachgewiesen werden, so dass gezeigt werden konnte, dass GS-Patienten mit positiver GS-Anamnese in der Familie den Genotyp 677TT nicht häufiger repräsentierten als die sporadisch auftretenden Fälle.

Seit einige Studien vorschlugen, dass der mütterliche Genotyp einen Risikofaktor für die Entstehung von NRD darstellen sollte (Volcik et al. 1999), wurde auf Grund der Ähnlichkeit zu den Krankheitsbildern der LK/GS und GS ebenfalls die Frage aufgeworfen, ob das Risiko für ein von LK/GS oder GS betroffenes Kind durch den Genotyp der Mutter, den des Kindes oder einer Kombination beider Genotypen entschieden beeinflusst wird.

Einige Studien konnten eine Risikoreduktion der Entstehung nicht-syndromaler LK/GS und GS bei perikonzeptionellem Vitaminkonsum (Folsäure und Vitamin B<sub>6</sub>) ermitteln (Tolarova and Harris 1995, Hayes et al. 1996, Shaw et al. 1998, Wyszinski and Diehl 2000). Da Folat- und Vit B<sub>6</sub>-Konzentrationen als wichtige Faktoren im Homocysteinmetabolismus gelten ist es fraglich, ob eine Korrelation zwischen dem mütterlichen Folsäure- oder Homocysteinstatus und dem Genotyp der Nachkommen besteht. Eine Interaktion des kindlichen Genotyps 677TT mit dem mütterlichen Vitaminkonsum konnte jedoch nicht bewiesen werden (Shaw et al. 1998). Dieses Erkenntnis lässt den Verdacht zu, dass durch perikonzeptionelle Vitamingabe ein metabolischer Effekt der Mutter eher korrigiert werden kann als der des Kindes, und somit der mütterliche Genotyp einen größeren Risikofaktor darstellt. Die Ergebnisse bezüglich dieser Fragestellung zeigen in vorausgegangenen Studien unterschiedliche Ergebnisse (Blanton et al. 2000, Martinelli et al. 2001). In der vorliegenden Studie wurde mittels Fall-Kontroll-Studie geprüft, ob der mütterliche Genotyp 677TT einen Risikofaktor für die Entstehung einer nicht-syndromalen LK/GS oder GS bei ihren Nachkommen darstellt. Da die Auswertung der zu Beginn dieser Studie ausgegebenen Fragebögen zur Ursachenforschung der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten

auf Grund mangelhafter Informationen nicht abgeschlossen werden konnte, wurde der mütterliche Vitaminkonsum in den Untersuchungen von uns nicht berücksichtigt. Die Frequenz für das T-Allel und den Genotyp 677TT lag bei den Müttern der LK/GS-Patienten bei 0,41 und 0,21 und ist im Vergleich zu anderen Populationen im mittleren Bereich anzusiedeln. Die Mütter der GS-Patienten zeigten eine T-Allelfrequenz von 0,31. Da keine der Mütter eine Homozygotie für den Polymorphismus 677C→T aufwies, konnte die Genotypfrequenz nicht bestimmt werden. Im Vergleich der mütterlichen 677TT-Genotypfrequenzen mit der Summe der Genotypfrequenzen von 677CT und 677CC mit der Kontrollgruppe konnte eine erhöhte, aber nicht signifikante Frequenz des Genotyps 677TT bei den Müttern von LK/GS betroffenen Kindern festgestellt werden ( $P=0,06$ ). Weitere Allel- und Genotypfrequenzen der Mütter und Väter von LK/GS betroffenen Kindern sind der Tabelle 5-4 zu entnehmen.

**Tabelle 5-4:** Genotyp- und Allelfrequenzen für die Punktmutation 677C→T im *MTHFR*-Gen bei Müttern und Vätern von LK/GS-Patienten in verschiedenen Populationen

Kontinent	Population/ Land	677T- Allelfrequenz	677TT- Genotypfrequenz	Literatur
Europa	Italien	♀ 0,49 ♂ 0,38	♀ 0,21 ♂ 0,19	Martinelli et al. 2001
Amerika	Deutschland	♀ 0,41 ♂ 0,37	♀ 0,21 ♂ 0,15	diese Studie
	USA,	♀ 0,31	kA	Blanton et al. 2000
	Kaukasier	♂ 0,32	kA	
		♀ 0,33	♀ 0,17	Gaspar et al. 2000
	Brasilien, Kaukasier	kA	kA	

kA= keine Angaben

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie stehen im Einklang mit den Untersuchungen von Gaspar und Mitarbeitern (1999), in denen ebenfalls eine erhöhte Frequenz des Genotyps 677TT festgestellt werden konnte.

Der Vergleich der Genotypfrequenzen der Mütter von GS betroffenen Kindern mit den Kontrollpersonen offenbarte ebenfalls keine Assoziation mit nicht-syndromaler GS ( $P=0,09$ ).

Die nicht-signifikant erhöhte 677TT-Genotypfrequenz der Mütter der von LK/GS betroffenen Kindern könnte dadurch erklärt werden, dass durchaus ein moderater Effekt existent ist, die Probandenzahl unserer Studie aber zu gering, als dass ein signifikantes Ergebnis resultieren könnte. Da die Suche nach Interaktion der genetischen Komponente mit der Umwelt viele Probanden benötigt, müssen diese Daten unbedingt in weiteren Populationen bestätigt werden (Hwang et al. 1994, Andrieu and Goldstein 1998).

Die T-Allelfrequenz der Väter der LK/GS-Patienten lag bei 0,37, die 677TT-Genotypfrequenz zeigte einen Wert von 0,15. Die Frequenz des T-Allels lag bei den Vätern der GS-Patienten bei 0,13. Keiner der Väter zeigte den homozygoten Genotyp 677TT. Der Fall-Kontroll-Vergleich wurde gleichermaßen bei den Vätern der LK/GS- und GS-Patienten angewandt. Der Vergleich der Genotypfrequenzen 677TT mit der Summe der Genotypfrequenzen von 677CT und 677CC zeigte bei beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrollpersonen. Eine Assoziation des väterlichen Genotyps 677TT mit nicht-syndromaler LK/GS und isolierter GS konnte in unserer Studie nicht bewiesen werden (Väter LK/GS-Patienten:  $P=0,34$ , Väter GS-Patienten:  $P= 0,06$ ).

Um Probleme klassischer Assoziationsstudien zu vermeiden, wurde in der vorliegenden Studie zusätzlich mit dem Transmission-Disequilibrium-Test (TDT) auf Assoziation und Kopplung geprüft. Mit diesem Test soll beurteilt werden, ob das T-Allel häufiger von heterozygoten Eltern an das betroffene Kind vererbt wird als das C-Allel. Der Transmission-Disequilibrium-Test bietet durch die internen Kontrollen, die aus den elterlichen, nicht vererbten Allelen bestehen, eine Unempfindlichkeit gegen Effekte der Populationsstruktur. In der Analyse von 67 LK/GS-Familiendios (Mutter und Vater mit betroffenem Kind) konnte keine

signifikant häufigere Vererbung des T-Allels ( $n=29/56$ ) gegenüber dem C-Allel ( $n=27/56$ ) ermittelt werden ( $P=0,89$ ).

Aus der Analyse von 15 GS-Familientrios resultiert ebenfalls keine signifikant häufigere Vererbung ( $P=0,59$ ) des T-Allels ( $n=6/14$ ) im Gegensatz zum C-Allel ( $n=8/14$ ). Assoziation und Kopplung mit dem T-Allel können in der vorliegenden Studie weder mit der Entstehung nicht-syndromaler LK/GS noch GS dokumentiert werden. Diese Studie bestätigt somit die Ergebnisse von Martinelli und Mitarbeitern (2001) sowie Gaspar und Mitarbeitern (2000), die ebenfalls in den getesteten Populationen Assoziation und Kopplung nicht nachweisen konnten (Martinelli:  $P=0,79$ , Gaspar:  $P=0,82$ ).

### **5.3 Kandidatengen Wachstumsfaktor alpha ( $TGF\alpha$ )**

Der Wachstumsfaktor  $TGF\alpha$  ist ein weiteres Gen, das für die Entstehung nicht-syndromaler LK/GS und GS verantwortlich gemacht wird. Das transmembrane Glykoprotein  $TGF\alpha$  wird von einer Vielzahl verschiedener Zellen exprimiert (Luetkeke et al. 1993, Derynck et al. 1990), und ist zur Zeit der Gaumenfusion verstärkt im Mittellinienepithel nachweisbar. Durch Mitoseinduktion regt  $TGF\alpha$  die Proliferation des multipotenten Mesenchyms als auch der extrazellulären Matrix an, übt aber ebenso einen inhibierenden Effekt auf die Apoptose des Mittellinienepithels aus (Dixon et al. 1991). Die verstärkte Expression im Gaumengewebe und die hohe Konzentration im Mittellinienepithel zur Zeit der Gaumenfusion machen  $TGF\alpha$  zu einem Kandidatengen für nicht-syndromale LK/GS oder GS.

Die verminderte Expressionsaktivität von  $TGF\alpha$  hat ein geringeres Wachstum der Gaumenfortsätze zu Folge. Das Verschmelzen beider Gaumenplatten bleibt aus, ebenso die Apoptose des Mittellinienepithels, die eine homogene Ausbreitung des Mesenchyms im gesamten Gaumen gewährleistet. Bei weiter voranschreitendem Wachstum resultiert eine Gaumenspalte.

In Studien an Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass das seltene Allel  $\Delta 4$  bp nicht für die Entstehung einer nicht-syndromalen LK/GS oder GS verantwortlich ist (Luetkeke et al. 1993, Mann et al. 1993). Die verstärkte Expression von  $TGF\alpha$

erzeugt jedoch in mehreren Geweben eine epitheliale Hyperplasie und unterstreicht somit die Behauptung, dass *TGF $\alpha$*  ein potentielles epitheliales Mitogen ist (Sandgren et al. 1990).

Durch PCR-Amplifikation des *TGF $\alpha$* -Gens und anschließendem Restriktionsverdau mit dem Enzym *TaqI*, konnte DNA von Personen heterozygoten Genotyps in zwei Fragmente gespalten werden (Allel C1:3 kb, seltenes Allel C2:2,7 kb). Die Restriktionsstelle des seltenen, mittels *TaqI* zu spaltenden DNA-Fragmentes (Hayward et al. 1987) konnte durch die Verwendung spezieller Primer als eine im Intron 5 des *TGF $\alpha$* -Gens lokalisierte, 4 bp umfassende Deletion beschrieben werden (Basart et al. 1994). Die Größe des ungeschnittenen Wildtypallels beträgt 117 bp, das mittels *TaqI* spaltbare Fragment offenbart eine Allelgröße von 113 bp.

Ardinger und Mitarbeiter konnten 1989 als erste Studie eine Assoziation des Allels  $\Delta 4$  bp mit nicht-syndromaler LK/GS in der kaukasischen Population feststellen. Andere Studien bestätigten diese Assoziation in weiteren kaukasischen Bevölkerungsgruppen (Australien: Chevenix-Trench et al. 1991, 1992, England: Holder et al. 1992, Frankreich: Stoll et al. 1992, USA, Pennsylvania: Sassani et al. 1993). Eine Assoziation für LK/GS konnte auch in der chilenischen, japanischen und vietnamesischen Bevölkerung ermittelt werden (Jara et al. 1995). Weitere Studien konnten keine Assoziation beweisen (USA: Hecht et al. 1991, Vintiner et al. 1992, Dänemark: Christensen et al. 1998, USA: Lidral et al. 1998, USA: Beaty et al. 2001). Die Assoziation der Sequenzvariante  $\Delta 4$  bp mit nicht-syndromaler GS konnte in der kaukasischen Population Iowas und der westbengalischen Population Indiens dargestellt werden (Shiang et al. 1993, Field et al. 1994). Die Rolle des seltenen Allels  $\Delta 4$  bp bei der Entstehung nicht-syndromaler LK/GS und GS wird von Mitchel nach durchgeführter Metaanalyse (1997) unterstützt.

### 5.2.1 Assoziationsanalysen des Polymorphismus wt→ $\Delta$ 4 bp im *TGF $\alpha$* -Gen bei LK/GS- und GS-Patienten, Müttern und Vätern

In dieser Studie wurde mittels Fall-Kontroll-Studie und Test auf Assoziation und Kopplung (TDT) geprüft, ob das seltene Allel  $\Delta$ 4 bp im Intron 5 des *TGF $\alpha$* -Gens in der deutschen Population einen Risikofaktor für die Entstehung nicht-syndromaler LK/GS und GS darstellt.

Zur Vermeidung falsch-positiver Assoziationen wurden zunächst die populationsspezifischen Frequenzen des Allels  $\Delta$ 4 bp bestimmt. Im Vergleich der Frequenz des seltenen Allels  $\Delta$ 4 bp der deutschen Population mit anderen Populationen, ist die Frequenz im unteren Bereich anzusiedeln. Die Allelfrequenz zeigt die höchsten Werte in der kaukasischen Population Australiens (0,09 Chevenix-Trench et al. 1992), die niedrigsten in der britischen Population (0,04, Holder et al. 1992). Weitere Frequenzen des seltenen Allels  $\Delta$ 4 bp und des Genotyps wt/ $\Delta$ 4 bp sind der Tabelle 5-5 zu entnehmen.

**Tabelle 5-5:** Genotyp- und Allelfrequenzen für das seltene Allel  $\Delta$ 4 bp im *TGF $\alpha$* -Gen in verschiedenen Populationen (nach Shaw et al. 1996, Holder et al. 1992, Stoll et al. 1993, Chevenix-Trench et al. 1992, Ardinger et al. 1989, diese Studie)

Kontinent	Population/Land	Allelfrequenz $\Delta$ 4 bp	Genotypfrequenz wt/ $\Delta$ 4 bp
Europa	England	0,04	0,08
	Frankreich	0,07	kA
	Deutschland	0,06	0,13
Amerika	Iowa, Kaukasier	0,05	0,08
	Kalifornien, Kaukasier	0,08	0,15
	Australien	Kaukasier	0,09

Die Frequenz des seltenen Allels  $\Delta 4$  bp der LK/GS-Patienten in der untersuchten deutschen Bevölkerung beträgt 0,13 (Tabelle 5-6) und ist im Vergleich mit anderen Populationen im mittleren Bereich einzuordnen. Die Frequenz des seltenen Allels  $\Delta 4$  bp zeigt in der britischen Population die höchsten (0,21 Holder et al. 1992), und in der kaukasischen Population Kaliforniens die niedrigsten Werte (0,08 Shaw et al. 1996).

Bei den von einer isolierten GS betroffenen Patienten liegt die Frequenz des seltenen Allels  $\Delta 4$  bp in der deutschen Population im Vergleich zu der kaukasischen Population Iowas bei 0,06 (Iowa: 0,09). Die Frequenz des Genotyps wt/ $\Delta 4$  bp beträgt in der deutschen Bevölkerung 0,13 im Gegensatz zur amerikanischen 0,20.

Der Vergleich der Genotyphäufigkeit wt/ $\Delta 4$  bp mit der Summe der Genotypen wt/wt und  $\Delta 4$  bp/ $\Delta 4$  bp von LK/GS- und GS-Patienten mit Kontrollpersonen zeigt eine statistisch signifikante Assoziation des Genotyps wt/ $\Delta 4$  bp mit nicht-syndromaler LK/GS ( $P=0,03$ ), nicht aber mit isolierter GS ( $P=1,00$ ).

**Tabelle 5-6:** Genotyp- und Allelfrequenzen des Allels  $\Delta 4$  bp im  $TGF\alpha$ -Gen bei LK/GS-Patienten in verschiedenen Populationen

Kontinent	Population/ Land	Allelfrequenz $\Delta 4$ bp	Genotypfrequenz wt/ $\Delta 4$ bp	Literatur
Europa	England	0,21	0,25	Holder et al. 1992
	Frankreich	0,05	kA	Stoll et al. 1993
	Deutschland	0,13	0,26	diese Studie
Amerika	Iowa,	0,14	0,22	Ardinger et al. 1989
	Kaukasier			
	Kalifornien, Kaukasier	0,08	0,16	Shaw et al. 1996
Australien	Kaukasier	0,15	0,26	Chevenix-Trench et al. 1992

kA=keine Angaben

Die widersprüchlichen Ergebnisse bezüglich der Assoziation des seltenen Allels  $\Delta 4$  bp mit der Entstehung nicht-syndromaler LK/GS oder GS aus vorausgegangenen Studien können vielfältige Ursachen haben. Die unterschiedlichen Allelfrequenzen verschiedener Populationen, inhomogene Patientengruppen bezüglich der Einteilung des Phänotyps, ein unterschiedlicher Anteil familiärer Spaltbildungen und die ungleiche Exposition der Mütter gegenüber exogenen Faktoren in der Schwangerschaft sind Gründe für die Heterogenität der Ergebnisse.

Die Frequenz des seltenen Allels  $\Delta 4$  bp liegt in den untersuchten Populationen etwa im selben Bereich (Tabelle 5-5). Das Spektrum der Allelfrequenzen von  $\Delta 4$  bp der LK/GS-Patienten ist jedoch weiter gestreut. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die unterschiedlichen Resultate bisheriger Studien nicht auf eine Populationsstratifikation zurückzuführen sind, sondern eher auf die Heterogenität der Patientengruppen. Ein diese Heterogenität der Patientengruppen bedingender Faktor ist der unterschiedliche Anteil der Patienten mit ein- oder beidseitiger LK/GS in den bisher veröffentlichten Studien. Bisher beobachteten zwei Studien eine erhöhte Frequenz des seltenen Allels  $\Delta 4$  bp bei Patienten, die von einer doppelseitigen LK/GS betroffen waren fest (Holder et al. 1992: 0,28 zu 0,17, Stoll et al. 1993: 0,07 zu 0,04). Im Rahmen dieser Studie konnten 28% (10/36) der Patienten mit doppelseitiger LK/GS und 22% (8/36) der Patienten mit einseitiger LK/GS als Träger des seltenen Allels  $\Delta 4$  bp identifiziert werden. Ein Zusammenhang bezüglich des Phänotyps und der Häufigkeit der Sequenzvariante  $\Delta 4$  bp ist in dieser Studie nicht festzustellen. Trotz Kenntnis über die verschiedenartige Ätiologie von LK/GS und GS unterschieden zwei Studien diese Patientengruppen nicht (Chevenix-Trench et al. 1992 und 1993).

Da der Genotyp  $\Delta 4$  bp/ $\Delta 4$  bp gehäuft bei Patienten mit doppelseitiger LK/GS festgestellt wurde, stellten Holder und Mitarbeiter (1992) die Vermutung auf, dass diesem Genotyp eine bedeutende Rolle bei der Entstehung beidseitiger LK/GS zugeschrieben werden muss. Homozygotie für die Sequenzvariante  $\Delta 4$  bp war bei keinem der im Rahmen dieser Studie untersuchten Patienten nachzuweisen. Lediglich ein Vater zeigte sich für die Sequenzvariante  $\Delta 4$  bp homozygot, so dass

dieser Genotyp als Risikofaktor für die Entstehung doppelseitiger LK/GS in unserer Studie nicht bestätigt werden kann.

**Tabelle 5-7:** Allelfrequenzen, Anteil der Patienten mit beidseitiger LK/GS und familiäre Häufung von LK/GS

<b>Allelfrequenz <math>\Delta 4</math> bp</b>	<b>Patienten mit doppelseitiger LK/GS [%]</b>	<b>Patienten mit Spaltbildungen in der Familie [%]</b>	<b>Literatur</b>
0,14	31	43	Ardinger et al. 1989
0,15	20	59	Chevenix-Trench et al. 1992
0,22	29	37	Holder et al. 1992
0,17	35	15	Sassani et al. 1993
0,05	30	0	Stoll et al. 1993
0,09	kA	kA	Hwang et al. 1994
0,08	kA	kA	Shaw et al. 1996

kA= keine Angaben

Ein weiterer Grund für die heterogenen Ergebnisse bisheriger Studien ist der unterschiedliche Anteil familiärer Fälle. Der Anteil an familiärer Häufung von LK/GS betrug in dieser Studie 18% (13/72), der von GS 19% (3/16). Der heterozygote Genotyp wt/ $\Delta 4$  bp konnte bei 23% (3/13) der LK/GS- und ebenfalls 19% (3/16) der GS-Patienten bestimmt werden. Bei den sporadischen LK/GS-Fällen zeigten 25% (15/59) der Patienten den Genotyp wt/ $\Delta 4$  bp. Patienten mit isolierter GS offenbarten in 23% (3/13) der Fälle den Genotyp wt/ $\Delta 4$  bp. In der vorliegenden Studie ist ein gehäuftes Auftreten des Genotyps wt/ $\Delta 4$  bp in familiären LK/GS- und GS-Fällen nicht zu beobachten. Dieses Ergebnis stimmt mit den Resultaten vorausgegangener Studien überein (Chevenix-Trench et al. 1992, Holder et al. 1992, Sassani et al. 1993, Stoll et al. 1993). Stoll und Mitarbeiter (1993) bezogen lediglich LK/GS-Patienten mit negativer Familienanamnese in ihre Untersuchungen ein. Holder und Mitarbeiter beobachteten (1992) ein vermehrtes, jedoch nicht signifikantes Auftreten der Genotypen wt/ $\Delta 4$  bp und  $\Delta 4$  bp/ $\Delta 4$  bp bei Patienten mit positiver Familienanamnese. Das vermehrte Auftreten des seltenen Allels  $\Delta 4$  bp bei sporadischer LK/GS ist ein Hinweis darauf, dass es keinen hauptsächlichen

genetischen Risikofaktor für die Entstehung nicht-syndromaler LK/GS darstellt, sondern nur in Kombination mit weiteren Risikofaktoren die Entstehung einer LK/GS beeinflusst.

Die Assoziation der Sequenzvariante wt→ $\Delta$ 4 bp mit familiärer LK/GS konnte lediglich in einer Studie ermittelt werden (Romitti et al. 1999), wobei dieses positive Ergebnis auf den außergewöhnlich hohen Anteil familiärer Fälle der bisherigen Studien zurückzuführen sein könnte (Ardinger et al. 43%, Chevenix-Trench et al. 1991, 1992 51%, 59%, Holder et al. 33% gegenüber Romitti et al. 1999 14,3%). Ferner konnte in den Familien mit positiver LK/GS-Anamnese eine erhöhte Frequenz des seltenen Allels  $\Delta$ 4 bp beobachtet werden.

Exogene Faktoren, wie Medikamente und Umwelteinflüsse, müssen bei der Betrachtung der unterschiedlichen Ergebnisse bisheriger Studien ebenfalls berücksichtigt werden (Hwang et al. 1995). Da im Rahmen der vorliegenden Studie die Fragebögen zur Ursachenforschung von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten nicht vollständig beantwortet wurden, musste auf die Beurteilung einer Interaktion des mütterlichen Nikotinkonsums mit dem Genotyp des Nachkommens verzichtet werden.

Um eindeutige Ergebnisse bezüglich des mütterlichen Nikotinkonsums in der frühen Schwangerschaft und der Sequenzvariante wt→ $\Delta$ 4 bp erhalten zu können, müssen weitere Probanden genotypisiert, und die Anzahl der gerauchten Zigaretten pro Tag erfasst werden. Bisher wurde in zwei Studien der Zusammenhang zwischen mütterlichem Nikotinkonsum und der Sequenzvariante wt→ $\Delta$ 4 bp untersucht (Shaw et al. 1996, Romitti et al. 1999). Die Untersuchungen von Shaw und Mitarbeitern (1996) lieferten das Resultat, dass der mütterliche Nikotinkonsum allein, als auch in Kombination mit dem seltenen Allel  $\Delta$ 4 bp für die Entstehung einer LK/GS verantwortlich gemacht werden könne. Das Risiko für die Entstehung isolierter Spaltbildungen der Lippe und des Gaumens erhöht sich mit zunehmender Anzahl gerauchter Zigaretten pro Tag. Rauchten Mütter mehr als 20 Zigaretten pro Tag, und wies der Nachkomme das seltene Allel  $\Delta$ 4 bp auf, so war das Entstehungsrisiko für GS mehrfach erhöht. Rauchten beide Elternteile mehr als 20 Zigaretten am Tag, resultiert ein 2- bis 3-fach höheres Risiko.

Hwang und Mitarbeiter (1995) bestätigten ein erhöhtes Risiko für Kinder des Phänotyps einer isolierten GS in Kombination mit dem seltenen Allel  $\Delta 4$  bp, rauchten die Mütter in der Schwangerschaft mehr als 10 Zigaretten am Tag. Eine weitere Studie bestätigte die Assoziation des mütterlichen Nikotinkonsums mit der Entstehung nicht-syndromaler LK/GS und GS unabhängig vom Genotyp (Romitti et al. 1999). Das Risiko für männliche Nachkommen mit isolierter GS ist am stärksten erhöht, wenn die Mütter in der postkonzeptionellen Zeit mehr als 10 Zigaretten pro Tag rauchten. Da Hwang (1995) jedoch Säuglinge mit syndromalen Fehlbildungen in die Kontrollgruppe einbezog, ist dieses Ergebnis anzuzweifeln.

Obwohl die Assoziation mütterlichen Nikotinkonsums mehrfach bestätigt werden konnte, ist nicht bekannt, welche der chemischen Substanzen einer Zigarette für den Anstieg des Risikos verantwortlich gemacht werden muss.

Als weitere exogene Noxe ist der mütterliche Alkoholgenuss zu betrachten. Die Assoziation mütterlichen Alkoholkonsums mit der Entstehung nicht-syndromaler LK/GS konnte in zwei Studien gezeigt werden (Munger et al. 1996, Werler et al. 1991). Shaw und Mitarbeiter (1996) bewiesen eine Risikozunahme für die Entstehung multipler LK/GS bei weiblichen Nachkommen, wenn die Mütter im Monat mehr als vier alkoholische Getränke zu sich nahmen und zusätzlich in der frühen Phase der Schwangerschaft rauchten. Mangels vollständig beantworteter Fragebögen wurde im Rahmen der vorliegenden Studie auf die Beurteilung des mütterlichen Alkoholkonsums verzichtet.

In der vorliegenden Studie soll ferner überprüft werden, ob das seltene Allel  $\Delta 4$  bp mit nicht-syndromaler LK/GS und GS gekoppelt und assoziiert ist. Mit dem robusten Transmission-Disequilibrium-Test (TDT) soll ermittelt werden, ob heterozygote Eltern die Sequenzvariante  $\Delta 4$  bp vermehrt an das betroffene Kind vererben. Die Analyse von 67 LK/GS-Familientrios (Vater und Mutter mit betroffenem Kind) offenbarte keine signifikant häufigere Vererbung ( $P=0,25$ ) des seltenen Allels  $\Delta 4$  bp (17/27) im Gegensatz zum Wildtypallel wt (10/27).

Die Analyse von 15 GS-Familientrios zeigte gleichermaßen keine signifikant häufigere Transmissionsrate ( $P=0,65$ ) des Allels  $\Delta 4$  bp ( $n=2/5$ ) gegenüber dem Wildtypallel wt (3/5). Die vorliegende Studie ermittelt keine Assoziation und

Kopplung mit dem seltenen Allel  $\Delta 4$  bp mit nicht-syndromaler LK/GS oder GS, und liefert somit widersprüchliche Ergebnisse zu den Studien von Feng und Mitarbeitern (1994) und Romitti und Mitarbeitern (1999), die Assoziation und Kopplung der Sequenzvariante  $wt \rightarrow \Delta 4$  bp mit nicht-syndromaler LK/GS beweisen konnten. Dieses Ergebnis korreliert mit den Annahme, dass die Inhomogenität bisheriger Studienergebnisse nicht auf den Effekt der Populationsstratifikation zurückzuführen sind (Mitchel et al. 1997), sondern dass die Ursache eher im unterschiedlich hohen Anteil von Patienten mit familiären LK/GS-Fällen zu finden ist. Romitti und Mitarbeiter (1999) zeigten, dass das seltene Allel  $\Delta 4$  bp in familiären LK/GS-Fällen signifikant häufiger transmittiert wurde als in Familien mit negativer Anamnese ( $P=0,05$ ). Dieses Ergebnis wird indirekt durch die Studie von Stoll und Mitarbeitern (1993) bestätigt, da im Rahmen durchgeführter Untersuchungen keine Assoziation des seltenen Allels  $\Delta 4$  bp mit der Entstehung sporadisch auftretender LK/GS festgestellt werden konnte.

In der vorliegenden Studie konnte im Fall-Kontroll-Vergleich die Assoziation des Genotyps  $wt/\Delta 4$  bp mit der Entstehung nicht-syndromaler LK/GS ermittelt werden ( $P=0,03$ ). Der Transmission-Disequilibrium-Test (TDT) hingegen zeigt bei dieser Patientengruppe keine Assoziation und Kopplung ( $P=0,25$ ). Die Ursache dieser unterschiedlichen Ergebnisse könnte ihren Ursprung in der Anzahl der in den Transmission-Disequilibrium-Test einbezogener Familientrios haben. Ein moderater Effekt würde somit durch die geringe Probandenanzahl nicht deutlich gezeigt werden können. Um eindeutige Ergebnisse bezüglich der Transmission des seltenen Allels  $\Delta 4$  bp zu erhalten, müssen weitere Familientrios genotypisiert und mittels Transmission-Disequilibrium-Test beurteilt werden.

## 5.4 Ausblick

Trotz der weltweit hohen Prävalenz ist wenig über die genetischen Ursachen der nicht-syndromalen LK/GS und GS bekannt. Die Gründe sind der komplexe Vererbungsmodus und ein Mangel an informativen Familien. Eine Alternative zu den klassischen Kopplungsstudien bietet die Suche nach Kandidatengenen an Mausmodellen. Eine gewisse Ähnlichkeit zwischen Mensch- und Mausgenom macht es wahrscheinlich, dass die Lokalisation der Mausgene dabei helfen wird, die homologen Entsprechungen beim Menschen ausfindig zu machen. Ferner entwickeln Mäuse einen ähnlichen LK/GS- oder GS-Phänotyp, und es bietet sich die Möglichkeit, Expressionsstudien an Gaumenfortsatzkulturen durchzuführen. Da bei einer großen Anzahl potentieller Kandidatengene die *a priori*- Unwahrscheinlichkeit jedes einzelnen Gens sehr groß wird, müssen Mausstudien durch Kopplungsanalysen und die Aufklärung biochemischer Zusammenhänge ergänzt werden.

Bisher sind zwölf Gene bekannt, denen ein wichtiger Mechanismus an der Regulation der Gaumenentwicklung zugeschrieben wird. Für sechs Gene konnten Assoziation und Kopplung mit nicht-syndromaler LK/GS oder GS gezeigt werden (Tabelle 5-8). Da ein Teil dieser Studien durch nachfolgende Untersuchungen nicht bestätigt werden konnten liegt die Vermutung nah, dass neben der genetischen Komponente dem Einfluss exogener Faktoren eine tragende Rolle bei der Entstehung nicht-syndromaler LK/GS und GS zugeschrieben werden muss. Eine derartige Interaktion von Gen und Umwelt ist bei Untersuchungen des Polymorphismus 677TT im *MTHFR*-Gen nachzuvollziehen. Verschiedene Studien zeigen bezüglich der Assoziation des Genotyps 677TT mit nicht-syndromaler LK/GS und GS widersprüchliche Ergebnisse. Da das Entstehungsrisiko beider Spaltformen jedoch durch perikonzeptionelle Folsäuregabe verringert werden kann (Tolarova 1982, Paros und Beck 1999, Bienengraber et al. 2001), müssen weitere Gene, die mit dem Defekt der 5,10-Methylentetrahydrofolat-Reduktase interagieren, verantwortlich sein.

**Tabelle 5-8:** Gene die während der Gesichtsentwicklung aktiv sind

Gen	Funktion	Maus	Mensch	Literatur
<i>TGF<math>\alpha</math></i>	Wachstumsfaktor	Expression	Assoziation, TDT	Ardinger et al. 1989, Mitchel et al. 1997
END 1	Signalfaktor	Knockout	Kopplung	Kurihara et al. 1994
RARA	Signalfaktor	Transgen/Expression	Assoziation, TDT, Kopplung	Chevenix-Trench et al. 1992
<i>TGF<math>\beta</math>3</i>	Wachstumsfaktor	Knockout, Expression	Assoziation, TDT	Lidral et al. 1998, Maestri et al. 1997
SKI	Wachstumsfaktor	Knockout, Expression	kA	Berk et al. 1997
<i>MSX1</i>	Homeoboxgen	Knockout, Expression	Assoziation, TDT, Kopplung	Lidral et al. 1998
DLX 1/2	Homeoboxgen	Expression	kA	Qiu et al. 1997
PITX2	Homeoboxgen	Knockout, Expression	kA	Semina et al. 1996
PAX9	Homeoboxgen	Knockout, Expression	kA	Peters et al. 1998
AP2	Transkriptionsfaktor	Knockout, Expression	Kopplung	Nottoli et al. 1998

TDT=Transmission-Disequilibrium-Test  
kA= keine Angaben

Diese Kandidatengene sind die Vitamin B<sub>6</sub>-abhängige Cystathion- und Methionin-Synthase (Boers et al. 1985, Clarke et al. 1991). Cystathion ist ein beim Methioninabbau entstehendes Stoffwechselzwischenprodukt (biochemischer Reaktionsweg Abbildung 1-1), das bei einer Aktivitätsminderung des Enzyms Cystathion-Synthase, die durch einen Vitamin B<sub>6</sub>-Mangel erklärt werden könnte, zu Homocysteinämie führt (Miller et al. 1994, Stabler et al. 1997). Ein weiteres Kandidatengen ist die Arylamin-N-Acetyl-Transferase (NAT1). Da *NAT1* eine wichtige Rolle im Folsäuremetabolismus zukommt, und eine bemerkenswerte Zunahme der Expressionsaktivität in den Neuralrohr bildenden Zellen zur Zeit des Verschlusses nachweisbar ist, kann es als Risikofaktor für die Entstehung nicht-syndromaler LK/GS und GS betrachtet werden (Stanley et al. 1998).

Der prophylaktische Effekt der Folsäure konnte bisher noch nicht geklärt werden. Eine mögliche Erklärung der positiven Wirkung könnte dadurch begründet werden,

dass die eingeschränkte Enzymaktivität der MTHFR durch einen Substratüberschuss überwunden werden kann (Kang et al. 1991, Whitehead et al. 1995). Der protektive Effekt der Folsäure muss jedoch auf zusätzlichen Mechanismen beruhen. Es konnte gezeigt werden, dass die homozygote MTHFR-Mutante den Homocysteinspiegel nur beeinflusst, wenn die Folsäurewerte erniedrigt sind (Jaques et al. 1996). Dieses Erkenntnis deutet eher auf eine Wechselwirkung zwischen Genotyp und Folsäurestatus als Entstehungsursache hin als das alleinige Vorliegen des Genotyps 677TT. Eine derartige Wechselwirkung zwischen Genetik und Ernährung steht im Einklang mit dem vorgeschlagenen multifaktoriellen Entstehungsmodell nicht-syndromaler LK/GS und GS.

Diese Wechselwirkung zwischen Gen und Umwelt (mütterlicher Genotyp, Konsum von Vitaminen, Medikamenten, Nikotin oder Alkohol), aber auch die Interaktion verschiedener Gene untereinander, sollten Ziel nachfolgender Untersuchungen sein. Zur gründlicheren Beurteilung sollten die zu untersuchenden Patientenkollektive in dem Phänotyp entsprechende Gruppen eingeteilt werden. Ebenso wünschenswert erscheint die Unterteilung in familiäres oder sporadisches Auftreten von LK/GS oder GS.

Besondere Sorgfalt sollte der Anamnese bezüglich des mütterlichen Nikotin-, Alkohol- und Medikamentenkonsums gelten, da so ein Vergleich von in unterschiedlichen Studien gewonnenen Ergebnissen erleichtert wird. Sind in einigen Jahren die Risikofaktoren bekannt, ist es möglich, präventiv tätig zu werden. Das Auftreten nicht-syndromaler LK/GS und GS könnte durch die Gabe bestimmter Wachstumsfaktoren oder Vitamine, sowie den gewissenhaften Verzicht auf Alkohol und Nikotin während der Gaumenentwicklung des Embryos inhibiert werden.

## 6 Zusammenfassung

Zu den häufigsten angeborenen Fehlbildungen beim Menschen zählen die Lippen-Kiefer-Gaumenspalten, die mit einer Prävalenz von 1:700-1:1000 Neugeborenen in der kaukasischen Population zu finden sind. Das klinische Bild dieser Fehlbildung zeichnet sich durch einen großen Formenreichtum aus. Da die Lippen- und Gaumenbildung zu unterschiedlichen Zeitpunkten stattfinden, werden Lippen-Kieferspalten mit oder ohne Spalte im harten/weichen Gaumen (LK/GS) von isolierten Spaltbildungen des harten/weichen Gaumens (GS) unterschieden. Für die Ätiologie der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten wird eine multifaktorielle Genese verantwortlich gemacht, wobei die Interaktion genetischer Faktoren mit Umwelteinflüssen für die Ausprägung dieser Fehlbildung diskutiert wird.

Um den Anstieg der Prävalenz der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten in den vergangenen Jahrzehnten zu ergründen, ist besonders der Faktor Ernährung (Folsäure, Vitamine) in die Ursachenforschung miteingegangen. Da in einigen Populationen ein mütterlicher Folsäuremangel während der Schwangerschaft als beeinflussender Faktor bezüglich der Ausbildung einer LK/GS oder GS verifiziert werden konnte, wird das an der Verstoffwechslung der Folsäure beteiligte Gen 5,10-Methyltetrahydrofolat-Reduktase (*MTHFR*) mit einer Punktmutation im Exon 4 an Position 677 als Risikofaktor für die Entstehung nicht-syndromaler LK/GS oder GS diskutiert. Studien in der argentinischen und der irischen Population zeigten ein signifikant erhöhtes Erkrankungsrisiko für nicht-syndromale LK/GS und GS bei Patienten mit dem homozygoten Genotyp 677TT im *MTHFR*-Gen (Argentinien:  $P=0,01$ , Irland:  $P=0,02$ ).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte mittels Fall-Kontroll-Vergleich an 72 LK/GS- und 16 GS-Patienten gezeigt werden, dass der Genotyp 677TT in der deutschen Population nicht mit LK/GS ( $P=0,13$ ) oder GS ( $P=0,36$ ) assoziiert ist, und daher wahrscheinlich keinen Risikofaktor für die Entstehung dieser Fehlbildung darstellt. Um Effekte der Populationsstratifikation zu umgehen, wurde ein weiteres statistisches Testverfahren angewandt. Mittels Transmission-Disequilibrium-Test wurden 67 LK/GS- und 15 GS-Familiendios (Vater, Mutter und betroffenes Kind) auf Assoziation und Kopplung geprüft. Bei keiner der beiden Probandengruppen

konnte Assoziation und Kopplung nachgewiesen werden (LK/GS:  $P=0,89$ , GS:  $P=0,59$ ).

Als weiteres Kandidatengen wird der Wachstumsfaktor alpha ( $TGF\alpha$ ) betrachtet, da besonders hohe Konzentrationen von  $TGF\alpha$  zur Zeit der Gaumenfusion im Mittellinienepithel nachweisbar sind. Als Risikofaktor konnte eine 4 bp umfassende Deletion im Intron 5 des  $TGF\alpha$ -Gens identifiziert werden. Einige vorausgegangene Studien konnten in der US-amerikanischen Population die signifikante Assoziation des seltenen Allels  $\Delta 4$  bp mit der Entstehung nicht-syndromaler LK/GS ( $P=0,005$ ) und GS ( $P=0,03$ ) bereits nachweisen.

In dieser Studie wurde an einem Fall-Kontroll-Vergleich von 72 LK/GS- und 16 GS-Patienten deutlich, dass das seltene Allel  $\Delta 4$  bp in der deutschen Bevölkerung mit der Entstehung nicht-syndromaler LK/GS assoziiert ist ( $P=0,03$ ). Eine signifikante Assoziation mit isolierter GS konnte hingegen nicht gezeigt werden ( $P=1,00$ ). Zur Vermeidung verfälschender Effekte durch ausgeprägte Unterschiede in der Kontroll- und Testpopulation wurde ebenfalls der Transmission-Disequilibrium-Test herangezogen. Es wurden 67 LK/GS- und 15 GS-Familientrios auf Assoziation und Kopplung geprüft. Bei beiden Probandengruppen war jedoch keine signifikante Assoziation und Kopplung nachzuweisen (LK/GS:  $P=0,25$ , GS:  $P=0,65$ ).

Die unterschiedlichen Ergebnisse der Assoziationsanalysen im Fall-Kontroll-Vergleich und im Transmission-Disequilibrium-Test in der Probandengruppe der LK/GS-Patienten, könnten auf die geringe Anzahl der mittels Transmission-Disequilibrium-Test untersuchten Familientrios zurückzuführen sein. Ein unter Umständen existenter, moderater Effekt konnte in der vorliegenden Studie durch die geringe Anzahl der Probanden daher nicht gefunden werden.

## 7 Abkürzungen und Symbole

### 7.1 Abkürzungen

APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et aliter
MTHFR	Methylentetrahydrofolat- Reduktase
p	kurzer Arm eines Chromosoms
PAA	Polyacrylamidgel
PCR	Polymerasekettenreaktion
q	langer Arm eines Chromosoms
RCLB	red cell lysis buffer
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSCA	Single-strand-conformational analysis
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TGF $\alpha$	Transforming growth factor alpha
TDT	Transmission-Disequilibrium-Test
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UV	Ultraviolett
w/v	Masse/Volumen
$\Delta$	Deletion

## 7.2 Symbole



Weibliche, nicht  
betroffene Person



Weibliche, betroffene  
Person



Männliche, nicht  
betroffene Person



Männliche,  
betroffene Person

### **Abbildung 7- 1: Symbole in Stammbäumen**

Nachkommen werden im Stammbaum entsprechend der Reihenfolge ihrer Geburt aufgeführt.

## 8 Literaturverzeichnis

- Agresti A (1991)  
Categorical Data Analysis. Wiley, New York
- Andrieu N, Goldstein AM (1998)  
Epidemiologic and genetic approaches in the study of gene-environment interaction: an overview of available methods.  
Epidemiol Rev 20:137-147
- Ardinger HH, Buetow KH, Bell GI, Bardach J, van Denmark DR, Murray JC (1989)  
Association of genetic variants of the transforming growth factor- alpha gene with cleft lip and palate.  
Am J Hum Genet 45:348- 53
- Basart AM, Quian JF, May E, Murray JC (1994)  
A PCR method for detecting polymorphism in the TGFA gene.  
Hum Mol Genet 3:678
- Beall AC, Rosenquist TH (1990)  
Smooth muscle cells of neural crest origin from the aorticopulmonary septum in the avian embryo.  
Anat Rec 226:360-366
- Beaty TH, Wang H, Hetmanski JB, Fan YT, Zeiger JS, Liang KY, Chiu YF, Vanderkolk CA, Seifert KC, Wulfsberg EA, Raymond G, Panny SR, McIntosh I (2001)  
A case-control study of nonsyndromic oral clefts in Maryland.  
Ann Epidemiol 11:434-42
- Berk M, Desai SY, Heymann HC, Colmenares (1997)  
Mice lacking the ski proto-oncogene have defects in neurulation, craniofacial patterning and skeletal muscle development.  
Genes Dev 11:2029-2039
- Bienengraber V, Malek FA, Moritz KU, Fanghanel J, Gundlach KK, Weingartner J (2001)  
Is it possible to prevent cleft palate by prenatal administration of folic acid? An experimental study.  
Cleft Palate Craniofac J 38:393-398
- Blanton SH, Kolle BS, Hecht JT, Mulliken JB, Martin ER (2000)  
No evidence supporting MTHFR as a risk factor in the development of familial NSCLP.  
Am J Med Genet 92:370-371
- Blom HJ (1998)  
Mutated 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase and moderate hyperhomocysteinaemia.  
Eur J Pediatr 157 Suppl 2:131-134
- Boers GHJ, Smals AGH, Trijbels JMF, Fowler B, Bakkeren JAJM, Schoonderwaldt HC, Kleijer WJ (1985)  
Heterozygosity for homocystinuria in premature peripheral and cerebral occlusive arterial disease.  
New Engl J Med 313:709-715
- Brachmann R, Lindquist PB, Nagashima M, Kohr W, Lipari T, Napier M, Derynck R (1989)  
Transmembrane TGF-alpha precursors activate EGF/TGF-alpha receptors.  
Cell 56:691-700

- Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC (1991)  
Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high- resolution PAGE.  
Am J Hum Genet 48:137-144
- Chaubert P, Bautista D, Benhattar J (1993)  
An improved method for rapid screening of DNA mutations by nonradioactive single-strand  
conformation polymorphism procedure.  
Bio Techn 15:586
- Chevenix-Trench G, Jones K, Green A, Duffy DL, Martin NG (1992)  
Cleft lip with or without cleft palate: associations with transforming growth factor alpha and  
retinoic acid receptor loci.  
Am J Hum Genet 51:1377-1385
- Chevenix-Trench G, Jones K, Green A, Martin N (1991)  
Further evidence for an association between genetic variation in transforming growth factor-  
alpha and cleft lip palate.  
Am J Hum Genet 48:1012-3
- Christensen K, Olsen J, Norgaard-Pedersen B, Basso O, Stovring H, Milhollin-Johnson L, Murray JC  
(1999)  
Oral clefts, transforming growth factor alpha gene variants, and maternal smoking: A  
population-based case-control study in Denmark 1991-1994.  
Am J Epidemiol 149:248-255
- Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S, Fowler B, Graham I (1991)  
Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease.  
New Engl J Med 324:1149-1155
- Cuskelly GJ, McNulty H, Scott JM (1996)  
Effect of increasing dietary folate on red-cell folate: implications for prevention of neural-tube  
defects.  
Lancet 347 657
- Derynck R (1990)  
Transforming growth factor-alpha.  
Mol Reprod Dev 27:3-9
- Derynck R, Roberts AB, Winkler ME, Chen EY, Goeddel DV (1984)  
Human transforming growth factor- alpha: precursor structure and expression in E. coli.  
Cell 38:287-297
- Dixon MJ, Garner J, Ferguson MW (1991)  
Immunolocalization of epidermal growth factor (EGF), EGF receptor and transforming growth  
factor alpha (TGF alpha) during murine palatogenesis in vivo and in vitro.  
Anat Embryol 184:83-91
- Engbersen AMT, Franken DG, Boers GHJ, Stevens EMB, Trijbels FJM, Blom HJ (1995)  
Thermolabile 5,10-methylentetrahydrofolate reductase as a cause of mild  
hyperhomocysteinemia.  
Am J Hum Genet 56:142-150
- Feng H, Sassani R, Batrllett SP, Lee A, Hecht JT, Malcolm S, Winter RM, Vintiner GM, Buetow KH,  
Gasser DL (1994)  
Evidence, from family studies, for linkage disequilibrium between TGFA and a gene for  
nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate.  
Am J Hum Genet 55:932-936

- Ferguson MW (1988)  
Palate development.  
Development 103:41-60
- Field LL, Ray AK, Marazita ML (1994)  
Transforming growth factor- alpha: a modifying locus for nonsyndromic cleft lip without cleft palate?  
Eur J Hum Genet 2:159-165
- Fletcher O, Kessling AM (1998)  
MTHFR association with arteriosclerotic vascular disease?  
Hum Genet 103:11-21
- Fogh-Andersen P (1982)  
Ätiologie und Epidemiologie der Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalten.  
In: Pfeifer G (Hrsg.): Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalten, S. 13. Thieme, Stuttgart-New York
- Frosst P, Bloom H, Milos R, Goyette P, Sheppard C.A, Matthews R.G, Boers G.J.H, den Heijer M, Kluijtmans L.A.J, van den Heuvel L:P, Rozen R (1995)  
A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase.  
Nat Genet 10: 111-113
- Gambaro G, Anglani F, D'Angelo A (2000)  
Association studies of genetic polymorphisms and complex disease.  
Lancet 355: 308-311
- Gaspar DA, Pavanello RC, Zatz M, Passos- Bueno MR, Andre M, Steman S, Wyszynski DF, Matioli SR (1999)  
Role of the C677T polymorphism at the MTHFR gene on risk to non-syndromic cleft lip with/without palate: results from a case- control study in Brazil.  
Am J Med Genet 87:197-199
- Gorlin RJ, Cohen MM jr., Levin LS (1990)  
Syndromes of the head and neck, 3 ed.  
New York: Oxford University Press
- Goyette P, Pai A, Milos R, Frosst P, Tran P, Chen Z, Chan M, Rozen R (1998)  
Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR).  
Mamm Genome 9:652-656
- Goyette P, Pai A, Milos R, Frosst P, Chen Z, Chan M, Rozen R (1994)  
Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR).  
Mamm Genome 9:652-6
- Hall J, Solehdin F (1998)  
Folic acid for the prevention of congenital anomalies.  
Eur J Pediatr 157:445-450
- Harmon DL, Woodside JV, Yarnell JWG, McMaster D, Young IS, McCrum EE, Gey KF, Whitehead AS, Evans AE (1996)  
The common 'thermolabile' variant of methylene tetrahydrofolate reductase is a major determinant of mild hyperhomocysteinaemia.  
Q J Med 89: 571-577
- Hayes C, Werler MM, Willett WC, Mitchell AA (1996)  
A case-control study of periconceptional folic acid supplementation and oral clefts.  
Am J of Epidemiol 143:1229-1234

- Hayward NK, Nancarrow D, Ellem K, Parsons P, Kidson C (1987)  
A TaqI polymorphism for the human transforming growth factor alpha gene (TGF $\alpha$ ).  
*Nucleic Acids Res* 15:5503
- Hecht JT (1991)  
No evidence supporting MTHFR as a risk factor in the development of familial NSCLP.  
*Am J Hum Gen* 92:370-371
- Hecht JT, Wang Y, Blanton SH, Michels VV, Daiger SP (1991)  
Cleft lip and palate: no evidence of linkage to transforming growth factor alpha.  
*Am J Hum Genet* 49:682-686
- Hibbart ED, Smithells RW (1965)  
Folic acid metabolism and human embryopathy.  
*Lancet* i:1254
- Holder SE, Vintiner GM, Farren B, Malcolm S, Winter RM (1992)  
Confirmation of an association between RFLPs at the transforming growth factor-alpha locus and non-syndromic cleft lip and palate.  
*J Med Genet* 29:390-392
- Hwang SJ, Beaty TH, Panny SR, Street NA, Gordon S, McIntosh I, Francomano CA (1995)  
Association study of transforming growth factor alpha (TGF $\alpha$ ) TaqI polymorphism and oral clefts: indication of gene-environment interaction in a population-based sample of infants with birth defects.  
*Am J Epidemiol* 141:629-636
- Hwang SJ, Beaty TH, Liang KY, Coresh J, Khoury MJ (1994)  
Minimum sample size estimation to detect gene-environment interaction in case-control designs.  
*Am J Epidemiol* 140:1029-1037
- Jaques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, Selhub J, Rozen R (1996)  
Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations.  
*Circulation* 93:7-9
- Jara L, Blanco R, Chiffelle I, Palomino H, Carreno H (1995)  
Evidence for an association between RFLPs and the transforming growth factor alpha (locus) and nonsyndromic cleft lip/palate in a South American population.  
*Am J Hum Genet* 56:339-341
- Jones MC (1988)  
Etiology of facial clefts: prospective evaluation of 428 patients.  
*Cleft Palate J* 25:16-20
- Kádasi L (1980)  
Cleft lip and cleft palate as part of the symptomatology of different syndromes.  
*Acta Chirurgiae Plastica (Prague)* 22:185-190
- Källén K (1997)  
Maternal smoking and orofacial clefts.  
*Cleft Palate Craniofac J* 34:11-16
- Kang S-S, Wong PWK, Susmano A, Sora J, Norusis M, Ruggie N (1991)  
Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease.  
*Am J Hum Genet* 48:536-545

- Kang S-S, Zhou J, Wong PWK, Kowalisyn J, Strokosch G (1988)  
Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase.  
Am J Hum Genet 43:414-421
- Karlson P, Doenecke D, Fuchs G, Koolmann J, Schäfer G (1988)  
Biochemie  
13. Aufl, Thieme Verlag Stuttgart
- Khoury MJ, Gomez-Farias, Mulinare J (1989)  
Does maternal cigarette smoking during pregnancy cause cleft lip and palate in offspring?  
Am J Dis Child 143:33-37
- Kirke PN, Molloy AM, Daly LE, Burke H, Weir DG, Scott JM (1993)  
Maternal plasma folate and vitamin B12 are independent risk factors for neural tube defects.  
Q J Med 86:703-708
- Kluijtmans LAJ, van den Heuvel LPWP, Boers GHJ, Frosst P, Stevenson EMB, van Oost BA, den Heijer M (1996)  
Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinaemia: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease.  
Am J Hum Genet 58:35-41
- Knapp M (1999)  
The transmission/ disequilibrium test and parental- genotype reconstruction: the reconstruction-combined transmission/ disequilibrium test.  
Am J Hum Genet 64:861-870
- Koch MC, Stegmann K, Ziegler A, Schröter B, Ermert A (1998)  
Evaluation of the MTHFR C677T allele and the MTHFR gene locus in a german spina bifida population  
Eur J Pediatr 157:487-492
- Kreienbrock L, Schach S (2000)  
Epidemiologische Studien 3. Auflage  
Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin
- Kurihara Y, Kurihara H, Suzuki H, Kodama T, Maemura K, Nagai R, Oda H, Kuwaki T, Cao WH, Kamada N (1994)  
Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1.  
Nature 368:703-710
- Lander ES, Schork NJ (1994)  
Genetic dissection of complex traits.  
Science 265:2037-2048
- Lee DC, Rochford R, Todaro GJ, Villarreal LP (1985)  
Developmental expression of rat transforming growth factor- alpha mRNA.  
Mol Cell Biol 5:3644-3646
- Lehn, Wegmann (1985)  
Einführung in die Statistik.  
Teubner
- Lidral AC, Romitti PA, Basart AM, Doetschman T, Leysens NJ, Daak-Hirsch S, Semina EV, Johnson LR, Machida J, Burds A, Parnell TJ, Rubenstein JL, Murray JC (1998)  
Association of MSX1 and TGF $\beta$ 3 with nonsyndromic clefting in humans.  
Am J Hum Genet 63:557-568

- Luetteke NC, Lee DC, Palmiter RD, Brinster RL, Sandgren EP (1993)  
Regulation of fat and muscle development by transforming growth factor alpha in transgenic mice and in cultured cells.  
Cell Growth Differ 4:203-213
- Machida J, Yoshiura K, Funkenhauser CD, Natsume N, Kawai T, Murray JC (1999)  
Transforming growth factor- $\alpha$  (TGFA): Genomic structure, boundary sequences, and mutation analysis in nonsyndromic cleft lip/palate and cleft palate only.  
Genomics 61:237-242
- Maestri NE, Beaty TH, Hetmanski J, Smith EA, McIntosh I, Wyszynski DF, Liang KY, Duffy DL, VanderKolk C (1997)  
Application of transmission disequilibrium tests to nonsyndromic oral clefts: including candidate genes and environmental exposures in the models.  
Am J Med Genet 73:377-344
- Mann GB, Fowler KJ, Gabriel A, Nice EC, Williams RL, Dunn AR (1993)  
Mice with a null mutations of the TGFalpha gene have abnormal skin architecture, wavy hair and curly whiskers and often develop corneal inflammation.  
Cell 73:249-261
- Marquardt H, Hunkapiller MW, Hood LE, Todaro GJ (1984)  
Rat transforming growth factor type 1: Structure and relation to epidermal growth factor.  
Science 223:1079-1082
- Marquardt H, Hunkapiller MW, Hood LE, Twardzik DR, De Larco JE, Stephenson JR, Todaro GJ (1983)  
Transforming growth factors produced by retrovirus-transformed rodent fibroblasts and human melanoma cells: Amino acid sequence homology with epidermal growth factor.  
Proc Natl Acad Sci USA 80:4684-4688
- Martinelli M, Scapoli L, Pezzetti F, Carinci F, Carinci P, Stabellini G, Bisceglia L, Gombos F, Tognon M (2001)  
C677T Variant form at the MTHFR gene and CL/P: A risk factor for mothers?  
Am J Hum Genet 98:357-360
- Miller JW, Nadeau MR, Smith D, Selhub J (1994)  
Vitamin B6 deficiency vs. folate deficiency: comparison of responses to methionine loading in rats.  
Am J Clin Nutr 59:1033-1039
- Miller SA, Dykes DD, Poesky HF (1988)  
A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.  
Nucleic Acid Res 16:1215
- Mills JL, P Kirke, Molloy A, Burke H, Conley M, Lee Y, Mayne P, Weir D, Scott J (1999)  
Methylenetetrahydrofolate Reductase Thermolabile Variant and Oral Clefts.  
Am J Med Genet 86:71-74
- Mitchel LE (1997)  
Transforming growth factor alpha locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: A reappraisal.  
Genet Epidemiol. 14:231-240
- Motulsky AG (1996)  
Nutritional ecogenetics: homocysteine-related arteriosclerotic vascular disease, neural tube defects and folic acid.  
Am J Hum Genet 58:17-20

- Mullis KB, Faloona FA (1985)  
Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction.  
*Science* 230:335-350
- Munger RG, Romitti PA, Daak-Hirsch S, Burns TL, Murray JC, Hanson J (1996)  
Maternal alcohol use and risk of orofacial cleft birth defects.  
*Teratology* 54:27-33
- Murray JC, Buetow K, Bell GI (1986)  
RFLPs for the transforming growth factor alpha (TGF $\alpha$ ).  
*Nucleic Acids Res* 14:7136
- Nottoli T, Hagopian-Donaldson S, Zhang J, Perkins A, Williams T (1998)  
AP-2 null cells disrupt morphogenesis of the eye, face, and limbs in chimeric mice.  
*Proc Nat Acad Sci USA* 95:13714-13719
- Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K (1989)  
Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction.  
*Genomics* 5:874-879
- Ou CY, Stevenson RE, Brown VK, Schwartz CE, Allen WP, Khoury MJ, Rozen R, Oakley GP, Adams MJ (1996)  
5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphism as a risk factor for neural tube defects.  
*Am J Med Genet* 63:610-614
- Paros A, Beck S (1999)  
Folinic acid reduces cleft lip [CL(P)] in A/WySn mice.  
*Teratology* 60:344-347
- Peters H, Neubuser A, Kratochwil K, Balling R (1998)  
Pax9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities.  
*Genes Dev* 12:2735-2747
- Pfeifer G (Hrsg.)  
Lippen-Kiefer-Gaumenspalten.  
3. Internat. Symp. Hamburg  
Thieme, Stuttgart 1982
- Qian JF, Lazar-Wesley E, Breugnot C, May E (1993)  
Human transforming growth factor alpha: sequence analysis of the 4.5-kb and 1.6-kb mRNA species.  
*Gene* 132:291-296
- Qui M, Bulfone A, Ghattas I, Menses JJ, Christensen L, Sharpe PT, Presley R, Pedersen RA, Rubenstein JL (1997)  
Role of the Dlx homeobox genes in proximodistal patterning of the branchial arches: mutations of Dlx-1, Dlx-2, and Dlx-1 and -2 alter morphogenesis of proximal skeletal and soft tissue structures derived from the first and second arches.  
*Dev Biol* 185:165-184
- Rady PL, Tying SK, Hudnall SD, Vargas T, Kellner LH, Nitowsky H, Matalon RK (1999)  
Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): the incidence of mutations C677T and A1298C in the Ashkenazi Jewish population.  
*Am J Med Genet* 86:380-384

- Romitti PA, Lidral AC, Munger RG, Daack-Hirsch S, Burns TL, Murray JC (1999)  
Candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate and maternal cigarette smoking and alcohol consumption: evaluation of genotype-environment interactions from a population-based case-control study of orofacial clefts.  
*Teratology* 59:39-50
- Rosenquist TH, Ratshak SA, Sellhub J (1996)  
Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural-tube: effect of folic acid.  
*Proc Natl Acad Sci USA* 93:15227-15232
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989)  
Molecular cloning- a laboratory manual.  
Cold Spring Harbor, New York
- Sandgren EP, Luetkeke NC, Palmiter RD, Brinster RL, Lee DC (1990)  
Overexpression of TGF $\alpha$  in transgenic mice: Induction of epithelial hyperplasia, pancreatic metaplasia, and carcinoma of the breast.  
*Cell* 61:1121-1135
- Sassani R, Bartlett SP, Feng H, Goldner-Sauve A, Haq AK, Buetow KH, Gasser DL (1993)  
Association between alleles of the transforming growth factor- alpha locus and the occurrence of cleft lip.  
*Am J Med Genet* 45:565-569
- Sayetta RB, Weinrich MC, Coston GN (1989)  
Incidence and prevalence of cleft lip and palate: What we think we know.  
*Cleft Palate J* 26:242-247
- Schaid DJ, Sommer SS (1993)  
Genotype relative risks: methods for design and analysis of candidate-gene association studies.  
*Am J Hum Genet* 53:1114-1126
- Schlittgen  
Einführung in die Statistik  
Oldenbourg, 3. Auflage 1991
- Schneider JA, Rees DC, Liu Y-T, Clegg JB (1998)  
Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation.  
*Am J Hum Genet* 62:1258-1260
- Schutte BC, Murray JC (1999)  
The many faces and factors of orofacial clefts.  
*Hum Mol Genet* 8:1853-1859
- Sellhub J, Jaques PF, Bostom AF, D'Agostino RB, Wilson PW, Belanger AJ, O'Leary DH, Wolf PA, Rush D, Schaefer EJ, Rosenberg IH (1996)  
Relationship between plasma homocysteine, vitamin status and extracranial carotid-artery stenosis in Framingham Study population.  
*J Nutr* 26:1258S-1265S
- Semina EV, Reiter R, Leysens NJ, Alward WL, Small KW, Datson NA, Siegel-Bartelt J, Bierke-Nelson D, Bitoun P, Zabel BU, Carey JC, Murray JC (1996)  
Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene RIEG, involved in Rieger syndrome.  
*Nature Genet* 14:392-399

- Shaw GM, Rozen R, Finnell RH, Todoroff K, Lammer EJ (1998)  
 Infant C677T mutation in MTHFR, maternal periconceptional vitamin use, and cleft lip.  
*Am J Hum Gen* 80:196-198
- Shaw GM, Wasserman CR, Lammer EJ, O'Malley CD, Murray JC, Basart AM, Tolarova MM (1996)  
 Orofacial clefts, parental cigarette smoking, and transforming growth factor- alpha gene variants.  
*Am J Hum Genet* 58:551-561
- Shaw GM, Lammer EJ, Wassermann CR, O'Malley CD, Tolarova MM (1995)  
 Risks of orofacial clefts in children born to women using multivitamins containing folic acid perconceptionally.  
*Lancet* 345:393-396
- Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM (1993)  
 The sensitivity of single- strand confirmation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions.  
*Genomics* 16: 325-332
- Shiang R, Lidral AC, Ardinger HH, Buetow KH, Romitti PA, Munger RG, Murray J (1993)  
 Association of transforming growth factor- alpha polymorphisms with nonsyndromic cleft palate only (CPO).  
*Am J Hum Genet* 53:836-843
- Shum L, Turck CW, Derynck R (1996)  
 Cysteines 153 and 154 of transmembrane transforming growth factor- alpha are palmitoylated and mediate cytoplasmatic protein association.  
*J Biol Chem* 271: 28502-28508
- Spielmann RS, McGinnis RE, Ewens WJ (1993)  
 Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin- dependent diabetes mellitus (IDDM).  
*Am J Hum Genet* 52:506-516
- Stabler SP, Sampson DA, Wang LP, Allen RH (1997)  
 Elevations of serum cysteine and total homocysteine in pyridoxine-, folate- and cobalamin-deficient rats.  
*J Nutr Biochem* 8:279-289
- Stanley LA, Copp AJ, Pope J, Rolls S, Smelt V, Perry VH, Sim E (1998)  
 Immunochemical detection of arylamine N-acetyltransferase during mouse embryonic development an in adult mouse brain.  
*Teratology* 58:174-82
- Stegers-Theunissen RPM, Boers GHJ, Blom HJ, Nijhuis JG, Thomas CM, Borm GF, Eskes TK (1995)  
 Neural tube defects and elevated homocysteine levels in amniotic fluid.  
*AM J Obstet Gynecol* 172:1436-1441
- Stegers-Theunissen RPM, Boers GHJ, Trijbels FJM, Finkelstein JD, Blom HJ, Thomas CMG, Borm GF (1994)  
 Maternal hyperhomocysteinaemia: a risk factor for neural-tube defects?  
*Metabolism* 43:1475-1480

- Stegmann K, Ziegler A, Ngo ETKM, Kohlschmidt N, Schröter B, Ermert A, Koch MC (1999)  
Linkage disequilibrium of MTHFR genotypes 677CT/1298AC in the German population and association studies in probands with neural tube defects (NTD).  
Am J Med Genet 87:23-29
- Stevenson RE, Schwartz CE, Du Y-Z, Adams MJ (1997)  
Differences in methylenetetrahydrofolate reductase genotype frequencies, between Whites and Blacks.  
Am J Hum Genet 60:229-230
- Stoll C, Quian JF, Feingold J, Sauvage P, May E (1993)  
Genetic variation in transforming growth factor alpha: possible association of BamHI polymorphism with bilateral sporadic cleft lip and palate.  
Hum Genet 92:81-82
- Stoll C, Quian JF, Feingold J, Sauvage P, May E (1992)  
Genetic variation in transforming growth factor alpha: Possible association of BamHI polymorphism with bilateral sporadic cleft lip and palate.  
Am J Hum Genet 50:870-871
- Todaro GJ, Fryling C, De Larco JE (1980)  
Transforming growth factors produced by certain human tumor cells: polypeptides that interact with epidermal growth factor receptors.  
Proc Natl Acad Sci USA 77:5258-5262
- Thorogood P, Tickle C (1988)  
Craniofacial development.  
Development 103:1-257
- Tolarova MM, van Rooij IALM, Pastor M, van der Put NMJ, Goldberg AC, Hol F, Capozzi A, Thomas CMG, Pastor L, Mosby T, Ferrani C, Eskes TKAB, Steeger-Theunissen RPM (1998)  
A common mutation in the MTHFR gene is a risk factor for non-syndromic cleft lip and palate anomalies.  
Am J Hum Genet 63:A27
- Tolarova MM, Harris JA (1995)  
Reduced recurrence of orofacial clefts after periconceptional supplementation with high-dose folic acid and multivitamins.  
Teratology 51:71-78
- Tolarova M (1982)  
Periconceptional supplement with vitamins and folic acid to prevent recurrence of cleft lip.  
The Lancet ii: 217
- Tricopoli TV, Nakai H, Byers MG, Rall LB, Bell GI, Shows TB (1986)  
The gene for human transforming growth factor- $\alpha$  is on the short arm of chromosome 2.  
Cytogenet Cell Genet 42:94-98
- Ubbink JB (1997)  
The role of vitamins in the pathogenesis and treatment of hyperhomocysteinaemia.  
J Inherited Metab Dis 20:316-325
- Ubbink JB, Vermaak WJ, van der Merwe A, Becker PJ (1993)  
Vitamin B12, Vitamin B6, and folate nutritional status in men with hyperhomocysteinaemia.  
Am J Clin Nutr 57:47-53

- Vanderas AP (1987)  
Incidence of cleft lip, cleft palate and cleft lip and palate among races: a review.  
Cleft Palate J 24:216-225
- Van der Put NMJ, van den Heuvel LP, Steegers-Theunissen RPM, Trijbels FJM, Eskes TKAB, Mariman ECM, den Heyer M, Blom HJ (1997)  
Decreased methylene tetrahydrofolate reductase activity due to the 677C-T mutation in families with spina bifida offspring.  
J Mol Med 75:69
- Van der Put NMJ, Steegers-Theunissen RPM, Frosst P, Trijbels JMF, Eskes TKAB, van den Heuvel LPWJ, Mariman ECM, Heyer den M, Rozen R, Blom HJ (1995)  
Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida.  
Lancet 346:1070-1071
- Vintiner GM, Holder SE, Winter RM, Malcom S (1992)  
No evidence of linkage between the transforming growth factor- alpha gene in families with apparently autosomal dominant inheritance of cleft lip and palate.  
Journal of Med Genet 29:393-397
- Voet D, Voet JG (1995)  
Biochemistry.  
John Wiley & Sons , New York
- Volcik KA, Blanton SH, Tyerman GH, Jong ST, Rott EJ, Mier RJ, Romaine NK, Northrup H (1999)  
Analysis of the C677T and A1298C mutations of the MTHFR gene as a risk factor for spina bifida.  
Am J Hum Genet 65:A401
- Werler MM, Lammer EJ, Rosenberg L, Mitchell AA (1991)  
Maternal alcohol use in relation to selected birth defects.  
Am J Epidemiol 134:691-698
- Whitehead AS, Gallagher P, Mills JL, Kirke PN, Burke H, Molloy AM, Weir DG (1995)  
A genetic defect in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase in neural tube defects.  
Q J Med 88:763-766
- Wilcox JN, Derynck R (1988)  
Developmental expression of transforming growth factors alpha and beta in mouse fetus.  
Mol Cell Biol 8:3415-3422
- Wittkowski R, Opitz CH (1979)  
Familienberatung von Eltern mit Spaltkindern  
Stomatologie 29:656
- Wong WY, Eskes TKAB, Kuijpers-Jagtman AM, Spauwen PHM, Steegers EAP, Thomas CMG, Hamel BCJ, Blom HJ, Steegers-Theunissen RPM (1999)  
Nonsyndromic orofacial clefts: Association with maternal hyperhomocysteinaemia.  
Teratology 60:253-257
- Wyszynski DF and Diehl SR (2000)  
Infant C677T mutation in MTHFR, maternal periconceptual vitamin use and risk of nonsyndromic cleft lip.  
Am J Med Genet 92:79-80

Wyszynski DF, Beaty TH, Maestri NE (1996)  
Genetics of nonsyndromic oral clefts revisited.  
Cleft Palate Craniofac J 33:406-417

Wyszynski DF, Beaty TH (1996)  
Review of the role of potential teratogens in the origin of human nonsyndromic oral clefts.  
Teratology 53:309-317

**Fragebogen zur Ursachenforschung von Lippen-Kiefer-  
Gaumenspaltbildungen  
für die Eltern**

## Philipps-Universität Marburg

### -Klinik für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie-

## Fragebogen zur Ursachenforschung von Lippen-Kiefer-Gaumenspaltbildungen für die Mutter

Wir möchten Sie bitten, in Ruhe über unsere Fragen nachzudenken. Je genauer Ihre Angaben sind, desto genauer können wir die Ursachen erforschen. Es ist selbstverständlich, daß alle Ihre Angaben, die Sie machen, der ärztlichen Schweigepflicht und den gesetzlichen Vorschriften des Datenschutzes unterliegen. Wir sind natürlich gerne bereit, aufkommende Fragen zu beantworten.

<b>Die Mutter selbst</b>		Spalte		Haben Sie während der Schwangerschaft geraucht?	
		ja	nein	ja	nein
		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>eigene Kinder</b>		Spalte		Alkohol getrunken?	
		ja	nein	ja	nein
		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
erstes Kind	männl./weibl.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Medikamente eingenommen?	
zweites Kind	männl./weibl.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	ja	nein
drittes Kind	männl./weibl.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bemerkungen:					

<b>Geschwister der Mutter</b>		Spalte			ja nein unbekannt				
		ja	nein	unbekannt					
1.	männl./weibl.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	deren Kinder	1. m./w.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
						2. m./w.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2.	männl./weibl.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	deren Kinder	1. m./w.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
						2. m./w.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3.	männl./weibl.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	deren Kinder	1. m./w.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
						2. m./w.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4.	männl./weibl.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	deren Kinder	1. m./w.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
						2. m./w.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bemerkungen:									

<b>Eltern mütterlicherseits</b>		Spalte		ja nein unbekannt	
		ja	nein	unbekannt	
Vater		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Mutter		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

Bemerkungen:

---



---

**Philipps-Universität Marburg**
**-Klinik für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie-**


---

**Fragebogen zur Ursachenforschung von Lippen-Kiefer-Gaumenspaltbildungen für den Vater**

Wir möchten Sie bitten, in Ruhe über unsere Fragen nachzudenken. Je genauer Ihre Angaben sind, desto genauer können wir die Ursachen erforschen. Es ist selbstverständlich, daß alle Ihre Angaben, die Sie machen, der ärztlichen Schweigepflicht und den gesetzlichen Vorschriften des Datenschutzes unterliegen. Wir sind natürlich gerne bereit, aufkommende Fragen zu beantworten.

Der Vater selbst
------------------

Spalte	
ja	nein
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

eigene Kinder
---------------

		Spalte		
		ja	nein	unbekannt
erstes Kind	männl./weibl.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
zweites Kind	männl./weibl.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
drittes Kind	männl./weibl.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

 Bemerkungen :
 

---

Geschwister des Vaters
------------------------

			Spalte		
			ja	nein	unbekannt

1.	männl./weibl.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	deren Kinder	1. m./w.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
						2. m./w.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2.	männl./weibl.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	deren Kinder	1. m./w.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
						2. m./w.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3.	männl./weibl.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	deren Kinder	1. m./w.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
						2. m./w.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4.	männl./weibl.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	deren Kinder	1. m./w.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
						2. m./w.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

 Bemerkungen:
 

---

Eltern väterlicherseits
-------------------------

		Spalte		
		ja	nein	unbekannt
Vater		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Mutter		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

 Bemerkungen:
 

---



---

# 10 Anhang

## 10.1 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1-1:</b> Stoffwechselwege des Folsäuremetabolismus	5
<b>Abbildung 2-1:</b> Beispiele zur Einteilung kombinierter Spaltbildungen nach dem Modell der Thallwitzer Nomenklatur	13
<b>Abbildung 2-2:</b> Einteilung der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten nach Ausbreitung des Spaltbereiches	14
<b>Abbildung 3-1:</b> Identifizierung der 677C→T-Punktmutation im <i>MTHFR</i> -Gen auf einem nicht-denaturierenden 12% PAA-Gel (Silberfärbung)	22
<b>Abbildung 3-2:</b> Identifizierung der $\Delta 4$ bp Deletion auf einem 8% PAA-Gel bei Familie 5043 (Färbung mit Ethidiumbromid)	25
<b>Abbildung 7-1:</b> Symbole in Stammbäumen	70

## 10.2 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 2-1:</b> Aufschlüsselung der Probanden für molekulargenetische Analysen im <i>MTHFR</i> - und <i>TGF<math>\alpha</math></i> -Gen	10
<b>Tabelle 2-2:</b> Erblichkeitsprognose von LK/GS und GS	12
<b>Tabelle 3-1:</b> In dieser Arbeit verwendete Primer für die Amplifikation der <i>MTHFR</i> - und <i>TGF<math>\alpha</math></i> -Zielsequenzen	18
<b>Tabelle 3-2:</b> Reaktionsansatz	19
<b>Tabelle 3-3:</b> Agarosegel 2%	20
<b>Tabelle 3-4:</b> Polyacrylamidgel 12%	21
<b>Tabelle 3-5:</b> Nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel	23
<b>Tabelle 3-6:</b> TDT-Vierfeldertafel	28
<b>Tabelle 4-1:</b> Genotypen und Allelfrequenzen bei Kontrollpersonen, LK/GS-Patienten und deren Eltern	30
<b>Tabelle 4-2:</b> TDT-Vierfeldertafel für LK/GS-Familientrios zur familienbasierten Assoziationsanalyse der 677C→T-Punktmutation im <i>MTHFR</i> - Gen	32
<b>Tabelle 4-3:</b> Genotypen und Allelfrequenzen bei Kontrollpersonen, GS- Patienten und deren Eltern	33
<b>Tabelle 4-4:</b> TDT-Vierfeldertafel für GS-Familientrios zur familienbasierten Assoziationsanalyse der 677C→T-Punktmutation im <i>MTHFR</i> - Gen	35
<b>Tabelle 4-5:</b> Genotypen und Allelfrequenzen des Polymorphismus wt→ $\Delta$ 4 bp im <i>TGF<math>\alpha</math></i> -Gen bei Kontrollpersonen, LK/GS- Patienten und deren Eltern	36
<b>Tabelle 4-6:</b> TDT-Vierfeldertafel für LK/GS-Familientrios zur familienbasierten Assoziationsanalyse des Polymorphismus wt→ $\Delta$ 4 bp im Intron 5 des <i>TGF<math>\alpha</math></i> -Gen	38
<b>Tabelle 4-7:</b> Genotypen und Allelfrequenzen des Polymorphismus wt→ $\Delta$ 4 bp im <i>TGF<math>\alpha</math></i> -Gen bei Kontrollpersonen, GS- Patienten und deren Eltern	39
<b>Tabelle 4-8:</b> TDT-Vierfeldertafel für GS-Familientrios zur familienbasierten Assoziationsanalyse des Polymorphismus wt→ $\Delta$ 4 bp im Intron 5 des <i>TGF<math>\alpha</math></i> -Gens	41
<b>Tabelle 5-1:</b> Genotyp- und Allelfrequenzen für den Polymorphismus 677C→T im <i>MTHFR</i> -Gen in verschiedenen Populationen	48
<b>Tabelle 5-2:</b> Genotyp- und Allelfrequenzen für die Punktmutation 677C→T im <i>MTHFR</i> -Gen bei LK/GS-Patienten in verschiedenen Populationen	49
<b>Tabelle 5-3:</b> Genotyp- und Allelfrequenzen für die Punktmutation 677C→T im <i>MTHFR</i> -Gen bei GS-Patienten in verschiedenen Populationen	50

---

<b>Tabelle 5-4:</b> Genotyp- und Allelfrequenzen für die Punktmutation 677C→T im <i>MTHFR</i> -Gen bei Müttern und Vätern von LK/GS-Patienten in verschiedenen Populationen	53
<b>Tabelle 5-5:</b> Genotyp- und Allelfrequenzen für das seltene Allel $\Delta 4$ bp im <i>TGF<math>\alpha</math></i> -Gen in verschiedenen Populationen	57
<b>Tabelle 5-6:</b> Genotyp- und Allelfrequenzen des Allels $\Delta 4$ bp im <i>TGF<math>\alpha</math></i> -Gen bei LK/GS-Patienten in verschiedenen Populationen	58
<b>Tabelle 5-7:</b> Allelfrequenzen, Anteil der Patienten mit beidseitiger LK/GS und familiäre Häufung von LK/GS	60
<b>Tabelle 5-8:</b> Gene die während der Gesichtsentwicklung aktiv sind	65

## 10.3 Lebenslauf

Anke Selle  
Am Schwanhof 7  
35037 Marburg

### Persönliche Daten

Geburtsdatum	30.06.1972
Geburtsort	Hildesheim
Konfession	Evangelisch
Familienstand	Ledig
Staatsangehörigkeit	Deutsch

### Schulabschluss

1979-1992	Freie Waldorfschule Hannover Maschsee
21. Mai 1992	Allgemeine Hochschulreife

### Berufstätigkeit

Januar 1993- November 1994	Rettungssanitäterin Ambulanz Rettungsdienst KT GmbH Hannover
----------------------------	---

### Studium

November 1994- Juli 2000	Zahnmedizin Philipps-Universität Marburg
09. April 1996	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
03. April 1998	Zahnärztliche Vorprüfung
11. Dezember 2000	Zahnärztliche Prüfung
14. Dezember 2000	Approbation

## 10.4 Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die nachfolgenden Damen und Herren:

Aumüller	Hochban	Schumacher
Austermann	Holzheidt	Seifart
Barth	Jungclas	Siegel
Beato	Katschinsky	Stachniss
Berger	Kern	Stiletto
Brilla	Koch	Stoll
Cetin	Koolmann	Suske
Coca	Lehmann	Umstadt
Czubayko	Lippert	Weihe
Daut	Löffler	Wenz
Dibbets	Lotzmann	Werner
Feuser	Mengel	Westermann
Flores de Jacoby	Mittag	Wisser
Folz	Neumüller	Wolf
Fruhstorfer	Pieper	Vogel
Gente	Radsak	Voigt
Geus	Ramaswamy	
Gloerfeld	Röhm	
Göbel	Salomon	
Gotzen	Schachtschabel	
Habermehl	Schnabel	
Hardy	Schürmann	
Hasilik	Schulte	

## 10.5 Danksagung

Dem Leiter der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie Prof. Dr. Dr. Karl-Heinz Austermann danke ich dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat im Rahmen der Sprechstunde für Lippen-Kiefer-Gaumenspalten Eltern und Patienten mit unserem Projekt vertraut zu machen.

Prof. Dr. Dr. Walter Hochban danke ich für das Überlassen des interessanten Themas.

Ein großer Dank gilt den Mitarbeitern der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie:

- Dr. Oliver Hardy, Dr. Michael Holzheidt und Frau Sylvia Schwieder für die Unterstützung bei der Blutabnahme
- Peter Dirsch, Kirsten Schmeisser, Florian Will, Michael Venne und Claus Aletsee für die gute Zusammenarbeit im Rahmen der LKGS- Sprechstunde und die spaßigen Intermezzi auf "18" ☺.

Der Wolfgang Rosenthal Gesellschaft danke ich für die Veröffentlichung des Artikels "Molekulargenetische Analysen von Genen der Fehlbildung Lippen-Kiefer-Gaumenspalten" in der Zeitschrift "Gesichter" im August 1999, durch den wir zahlreiche Familien für unser Projekt gewinnen konnten.

Ein großer Dank gilt Frau Dr. Hillig und Frau Prof. Dr. Manuela C. Koch, die im Rahmen der humangenetischen Familienberatung der Philipps-Universität Marburg zahlreiche Probanden für unser Projekt interessieren konnten.

Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Grzeschik danke ich dafür, dass er es mir ermöglicht hat diese Arbeit am Institut für Humangenetik der Philipps-Universität Marburg durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt vor allem Frau Prof. Dr. Manuela C. Koch für Ihre Unterstützung bei fachlichen und organisatorischen Problemen, und die rasche Korrektur dieser Arbeit.

Besonderer Dank gilt auch den Mitarbeitern des Zentrums für Humangenetik:

- Gerti Panzner für die Einarbeitung in die Labormethoden
- Christopher Schwarz für die Silberfärbung und die lustigen Geschichten
- Meinen "Mitdoktoranden" Nadine Dersch und Jürgen Großmann für die vielen PCRs, die Einarbeitung in das Cyrillic-Programm, das geduldige Beantworten meiner Fragen und das unermüdliche Korrekturlesen
- Hartmut Engel für die PC-Hilfe
- Almut Schultealbert für ihre Hilfe beim "Auszählen"
- Bärbel Richter für ein offenes Ohr zu jeder Zeit

Für die finanzielle Unterstützung dieses Projektes bedanke ich mich bei dem Forschungspool der Philipps-Universität Marburg.

Dem Personal der Kinderklinik danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Ganz besonders möchte ich meiner Mutter für die langjährige Motivation und die finanzielle Unterstützung danken.



Ein großes Dankeschön auch allen anderen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben (Mo, Jens, Daniel, Muck, Olli, Peter).

## 10.6 Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

Assoziationsstudien für die Kandidatengene *MTHFR* und *TGF $\alpha$*  mit nicht-syndromalen Lippen-Kiefer-Gaumenspalten und Gaumenspalten

in der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie im Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Philipps-Universität Marburg

unter Leitung von Prof. Dr. Dr. Walter Hochban

mit Unterstützung durch

Prof. Dr. Manuela C. Koch

aus dem Institut für Humangenetik der Philipps-Universität Marburg

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt, und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

---

Marburg