

**Assoziationsanalysen  
zu MSX1 bei  
Patienten mit nicht-syndromalen  
LKGS-Spalten  
am Jenaer Krankengut**

**Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae dentariae (Dr. med.dent.)**

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Carolin Merwarth  
geboren am 02.10.1982 in Heidelberg

## **Gutachter**

1. Prof. Dr. Dr. St. Schultze-Mosgau, Jena
2. Prof. Dr. G. Mall, Jena
3. PD Dr. Dr. M. Thorwarth, Starnberg

## **Tag der öffentlichen Verteidigung:**

05.07.2011

## I. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
ABL1	Abelson murine leukaemia oncogene 1
APOC2	apolipoprotein C-ii gene
BCL	b cell lymphoma gene
BSA	bovine serum albumin
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CMYC	myelocytomatosis oncogene
COL	collagen gene
CRTL	cartilage link protein gene
CRTM	cartilage matrix protein gene
DLX	dixital less homeobox gene
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleintriphosphat
EDN	endothelin gene
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
ER	estrogen receptor gene
et al.	et aliter
G	Guanosin
GABRB	gamma-aminobutyric acid gene

GRL	gene resource locator
G-Spalte	isolierte Gaumenspalte
HOX	homeobox gene
HRAS	harvey rat sarcom viral oncogene homolog
HXB	human hexabrachion gene
IGF	insulin-like growth factor
LK(+/-G)-Spalte	Lippen-Kiefer-Spalte mit/ohne Gaumenspalte
LKGS-Spalte	Lippen-Kiefer-Gaumen-Segelspalte
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MSX	muscle segment homeobox gene
MTHFR	Methylentetrahydrofolat-Reduktase
OFC	orofacial cleft gene
PCR	polymerase chain reaction
PVRL	poliovirus receptor related gene
RARA	retinoic acid recetor gene alpha
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	real time polymerase chain reaction
T	Thymin
Taq	Thermus aquaticus
TCTE	T-complex-associated-testes-expressed-1 gene
TGF	transforming growth factor gene
VIM	vimentin gene
YAC	yeast artificial chromosome gene

## II. Inhaltsverzeichnis

I.	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	III
II.	<b>Inhaltsverzeichnis</b>	V
III.	<b>Zusammenfassung</b>	VII
1.	<b>Einleitung</b>	1
1.1	<b>Häufigkeit der LKGS-Spalte</b>	2
1.1.1	Ursachen für die Häufigkeitszunahme	2
1.1.2	Prävalenz der nichtsyndromalen LKGS-Spalten in verschiedenen Populationen	3
1.1.3	Spielen Umwelteinflüsse eine Rolle?	3
1.2	<b>Erscheinungsformen und Klassifikationen der LKGS-Spalten</b>	4
1.3	<b>Embryologie</b>	8
1.4	<b>Auf der Suche nach den verantwortlichen Genen</b>	11
1.4.1	Das Kandidatengen MSX1	12
1.4.2	Tierstudien zu MSX1	12
1.4.3	Humanstudien zu MSX1	13
2.	<b>Ziel der Arbeit</b>	16
3.	<b>Material und Methoden</b>	17
3.1	<b>Patientengut und Untersuchungsmaterial</b>	17
3.2	<b>Molekulargenetische Methoden</b>	17
3.2.1	DNA-Extraktion	18
3.2.2	DNA-Quantifizierung mittels RT-PCR	19
3.2.3	PCR-Amplifikation	20
3.2.4	Fragmentlängenanalyse	23
3.2.5	Sequenzanalyse	23
3.3	<b>Statistische Tests</b>	24
4.	<b>Ergebnisse</b>	27

<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>34</b>
5.1	Die Kandidatengene	34
5.2	Klassische Fall-Kontroll-Studie und familien- basierte Assoziationsstudie: Vor- und Nachteile	36
5.3	Anzahl und Basenpaarlänge der ermittelten Allele	37
5.4	Häufigkeitsverteilung der ermittelten Allele	39
5.5	Schlussfolgerung	42
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>44</b>
	Lebenslauf	55
	Ehrenwörtliche Erklärung	56
	Danksagung	57

### **III. Zusammenfassung**

Die Lippen-Kiefer-Gaumen-Segelspalten (LKGS-Spalten) zählen zu den zweithäufigsten angeborenen Fehlbildungen des Menschen. Eine Methode, ihrer Entstehung vorzubeugen, existiert bisher nicht, da die kausale Spaltgenese – vor allem die der nichtsyndromalen LKGS-Spalten – noch nicht ausreichend geklärt ist. Man geht von einem Zusammenspiel aus Umwelteinflüssen und genetischen Faktoren aus, wobei die genetische Komponente eine größere Rolle zu spielen scheint. Weltweit befassen sich zahlreiche Forschungsgruppen mit der Frage nach der kausalen Genese von nichtsyndrom-assoziierten LKGS-Spalten. Ihr Augenmerk gilt einer Anzahl von Genen, die für die Entstehung der isolierten LKGS-Spalten ursächlich zu sein scheinen.

Ein bereits vielfach erforschtes Gen ist MSX1. Versuche an transgenen Mäusen zeigten u. a. eine Mitbeteiligung dieses Gens an der Bildung des Viscerocraniums und des Zahnsystems.

Weiterhin wurde in zahlreichen Humanstudien (Assoziations-, Kopplungs- und Mutationsanalysen) ein möglicher Zusammenhang dieses Gens an der Bildung von nichtsyndromalen LKGS-Spalten aufgezeigt. MSX1 ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 4 lokalisiert und weist einen CA-Dinucleotid-Repeat mit vier Allelen auf. Diese Markerallele waren jedoch nicht in allen Studien gleich: Padanilam et al. (1992) erhielten in ihrer Analyse die Allele 169 bp, 171 bp, 173 bp und 175bp, während Schmidt et al. (2007) die Allele 171 bp, 173 bp, 175 bp und 177 bp nachweisen konnten.

In einigen Studien (klassische Fall-Kontroll-Studien und familienbasierte Assoziationsstudien) wurde nach signifikanten Unterschieden in der Häufigkeitsverteilung dieser vier Markerallele zwischen Spaltträgern und gesunden Kontrollpersonen geforscht. Leitgedanke war hierbei, dass ein signifikanter Unterschied in der Häufigkeitsverteilung eines Allels die Schlussfolgerung zuließe, dass dieses für eine Spaltbildung prädisponiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen waren jedoch nicht einheitlich, in einigen Analysen konnten signifikante Unterschiede nachgewiesen werden, in anderen dagegen nicht.

Basierend auf diese Studien wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl eine klassische Fall-Kontroll-Studie, als auch eine familienbasierte Assoziationsstudie für eine deutsche Population durchgeführt. Die Stichprobe umfasste 76 (40 männliche und 36 weibliche)

nichtverwandte Träger einer nichtsyndrom-assoziierten LKGS-Spalte und 82 (44 männliche und 38 weibliche) gesunde Kontrollpersonen ohne Spaltanamnese in der Familie.

Zusätzlich wurden 10 gesunde Elternpaare der Spaltträger zur Stichprobe hinzugezogen. Es wurde daraufhin mittels molekulargenetischer Methoden bestimmt, wie viele verschiedene Allele des CA-Dinucleotid-Repeats des MSX1-Gens für unser Untersuchungsgut vorliegen. Die entsprechenden DNA-Proben wurden sowohl aus peripheren Blutzellen, als auch aus Mundschleimhaut gewonnen. Anhand des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson bzw. des Exakten Tests nach Fisher wurde überprüft, ob zwischen Spaltträgern und Kontrollen (in der familienbasierten Assoziationsstudie wurde die Kontrollgruppe von den Allelen gebildet, die nicht von den Eltern an die betroffenen Kinder weitergegeben wurden) signifikante Unterschiede in der Allelhäufigkeitsverteilung bestehen und daraus für unser Krankengut auf eine Assoziation von MSX1 zu LKGS-Spalten geschlossen werden kann.

Die vorliegende Analyse ergab vier verschiedene Allele, die mit den von Padanilam et al. (1992) ermittelten Allelen übereinstimmen: 169 bp, 171 bp, 173 bp und 175 bp.

Bei Untersuchung der Allelhäufigkeitsverteilung kann kein signifikanter Unterschied zwischen der gesamten Spaltträgergruppe und der gesamten Kontrollgruppe festgestellt werden ( $p = 0,37; 0,6; 0,14; 0,32$ ). Ein positives Ergebnis lässt sich jedoch für die Allele 171 bp und 173 bp beim Vergleich der gesamten männlichen Spaltträger und der gesamten männlichen Kontrollen verzeichnen ( $p = 0,04; 0,03$ ). Bei Betrachtung der Untergruppen beobachtet man bei den männlichen Trägern einer Gaumenspalte mit simplexer Familienanamnese ( $p = 0,04$ ; Allel 169 bp), bei den weiblichen Trägern einer LK(+/-G)-Spalte mit multiplexer Familienanamnese ( $p = 0,04$ ; Allel 171 bp) und bei den gesamten männlichen Trägern einer LK(+/-G)-Spalte ( $p = 0,04$ ; Allel 173 bp) einen statistisch signifikanten Unterschied. Bei Untersuchung der 10 Familientrios konnte kein statistisch signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Interessanterweise konnte jedoch beim Vergleichen der männlichen und weiblichen Kontrollen für die Allele 169 bp und 171 bp statistische Signifikanz verzeichnet werden.

# 1. Einleitung

Patienten mit Lippen-Kiefer-Gaumen-Segelspalten (LKGS-Spalten) waren früher weitgehend aus der Gesellschaft ausgegrenzt. Dies war sowohl auf das äußere Erscheinungsbild als auch auf Störungen der Nahrungsaufnahme, Sprachlautbildung und anderer Formen der sozialen Kommunikation zurückzuführen. Weiterhin bestanden kaufunktionelle Schwierigkeiten bei narbenbedingter maxillärer Mikrognathie, welche durch frühen Zahnverlust mit daraus resultierender Alveolarfortsatzatrophie verstärkt wurde.

Um derartigen Problemen entgegenwirken zu können und im Erwachsenenalter ein ästhetisch und funktionell optimales Ergebnis erzielen zu können, müssen heute im Rahmen eines interdisziplinären Behandlungskonzeptes wichtige Komponenten beachtet werden. Zuerst müssen vor allem günstige anatomische Voraussetzungen für eine normale morphologische und funktionelle Entwicklung geschaffen werden. Ferner ist eine kieferorthopädische Behandlung notwendig, um Wachstumsstörungen und Zahnstellungsanomalien korrigieren zu können. Einen weiteren Eckpfeiler im Behandlungskonzept bilden Prophylaxe und Therapie von Hörstörungen und die logopädische Betreuung. Die zahnärztliche Frühbehandlung und Überwachung sind ebenfalls wichtige Bestandteile des Therapieplans.

Für die Therapie eines Spaltpatienten ist somit ein interdisziplinäres Behandlungsteam aus Mund-Kiefer-Gesichtschirurgen, Hals-Nasen-Ohrenärzten, Phoniatern und Pädaudiologen, Kieferorthopäden und Zahnärzten, Pädiatern sowie gegebenenfalls Kinderpsychologen erforderlich. In den letzten Jahren wurde insbesondere von mund-kiefer-gesichtschirurgischer und kieferorthopädischer Seite die Therapie stetig verbessert. Diese sehr aufwendige Behandlung erstreckt sich bei einem Großteil der Fälle vom Säuglings- bis ins junge Erwachsenenalter und fordert den Patienten und ihren Eltern viel Geduld ab.

Eine Methode, der Entstehung von LKGS-Spalten vorzubeugen, existiert bisher nicht. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die kausale Spaltgenese, insbesondere der isolierten LKGS-Spalten, noch weitgehend unbekannt ist. Bisherigen Erkenntnissen zufolge sind sowohl Umwelteinflüsse als auch genetische Faktoren an der Entstehung beteiligt, wobei die genetische Komponente eine größere Rolle zu spielen scheint. Weltweit befassen sich zahlreiche Forschungsgruppen mit der Frage nach der kausalen Genese von isolierten LKGS-Spalten. Ihr Augenmerk gilt Genen wie TGF A, TGF B 1-3, BCL 3, DLX 2 und MSX1. Letzteres ist auch Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Zahlreiche Tier- und Humanstudien sprechen für einen Zusammenhang zwischen MSX1 und LKGS-Spalten.

MSX1 befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 4 und weist einen CA-Dinucleotid-Repeat mit vier Allelen auf, die sich um jeweils zwei Basenpaare (bp) unterscheiden: 169, 171, 173, 175 bp (*Padanilam et al. 1992*). Desweiteren wurde von Allelen mit den Basenpaarlängen 167 (*Marazita et al. 2002*) und 177 berichtet (*Marazita et al. 2002, Schmidt et al. 2007*).

## **1.1 Häufigkeit der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten**

Lippen-Kiefer-Gaumen-Segelspalten zählen nach dem Klumpfuß zu den zweithäufigsten angeborenen Fehlbildungen des Menschen. Mit deutlichem Abstand folgen Spina bifida, Polydaktylie und angeborene Herzfehler. Die Prävalenz in der deutschen Population beträgt 1:500. Die Spalten entstehen in 10 bis 34 % der Fälle im Zusammenhang mit einer oder mehreren weiteren Fehlbildungen in Form von Syndromen, Sequenzen oder Assoziationen.

Bisher sind etwa 250 Syndrome bekannt, bei denen Lippen-Kiefer-Gaumenspalten ein obligates oder fakultatives Begleitsymptom darstellen. Hierzu zählen beispielsweise die Pierre-Robin-Sequenz, das van-der-Woude-Syndrom oder das Goldenhar-Syndrom. Die isolierte Form einer Lippen-Kiefer-Gaumenspalte kommt jedoch wesentlich häufiger vor, wobei die Angaben zwischen 63 und 90 % variieren. Die Fehlbildung tritt dabei ohne weitere, egal wie geartete, Entwicklungsstörung auf. Ihre Ätiologie ist noch weitgehend unbekannt.

Totale Lippen-Kiefer-Gaumenspalten sind häufiger beim männlichen Geschlecht zu beobachten (3:2), isolierte Gaumenspalten werden dagegen häufiger bei Mädchen verzeichnet. Man vermutet die Ursache in einer späteren Fusion des sekundären Gaumens beim weiblichen Geschlecht.

### **1.1.1 Ursachen für die Häufigkeitszunahme**

Statistiken ist zu entnehmen, dass sich der Anteil an Spaltfrequenzen in den letzten 100 Jahren fast verdreifacht hat. Dies ist zum einen auf die Reduktion der hohen Säuglingssterblichkeit durch verbesserte medizinische und hygienische Verhältnisse zurückzuführen. Andererseits werden heute mehr Mikroformen und partielle Spalten in den Statistiken erfasst als früher.

Spaltträger sind heute eher bereit, eine Familie zu gründen und ihre Erbanlagen weiterzugeben. Auch dies ist als Folge des medizinischen Fortschritts anzusehen, der eine fast komplette medizinische Rehabilitation ermöglicht. Wohlstandserscheinungen in den Industrieländern führten zum häufigeren Auftreten bestimmter Krankheiten, somit auch zum vermehrten Vorkommen von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten.

### **1.1.2 Prävalenz der nichtsyndromalen Lippen-Kiefer-Gaumenspalten in verschiedenen Populationen**

Es existieren globale und ethnische Unterschiede im auftreten von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten. Sowohl in der Bevölkerung der Ureinwohner Australiens, Amerikas und Indiens als auch in der Bevölkerung asiatischer Abstammung treten Spalten häufiger auf. Den geringsten Anteil an Spaltträgern findet man in Bevölkerungsgruppen afrikanischer Herkunft. Die kaukasische Bevölkerung liegt im Mittelfeld. *Wyszinski et al. (1996)* beschäftigten sich mit der Häufigkeit des Auftretens von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten in der US-amerikanischen Bevölkerung. Bei der indianischen Population zeigte sich eine Prävalenz von 1:278, wohingegen diese bei den Kaukasiern nur 1:850 betrug. Die negroide Bevölkerung wies sogar nur eine Frequenz von 1:3333 auf.

### **1.1.3 Spielen Umwelteinflüsse eine Rolle?**

Verschiedenen Studien zufolge sollen Rauchen, Alkoholkonsum und die Einnahme verschiedener Medikamente in der frühen Schwangerschaft das Risiko für eine Spaltbildung erhöhen. Eine besondere Gefahr besteht am 6. Entwicklungstag (Stadium der Blastozyste), am 14. Entwicklungstag (Primitivstreifenbildung), in der 5. Entwicklungswoche (Extremitätenknospungsstadium) und in der 7. Entwicklungswoche (Aufrichtung der Gaumenplatten) (*Sadler 1998*). *Van den Boogaard et. al (2008)* untersuchten 107 Familientrios mit mindestens einem Spaltträger und 66 Kontrolltrios. Sie konnten einen Zusammenhang zwischen Nikotinkonsum homozygoter Mütter in der Schwangerschaft und Bildung einer Lippen-Kiefer-Gaumenspalte bei homozygoten Kindern nachweisen. Weiterhin erhöhe sich das Risiko ebenfalls, wenn homozygote Mütter nicht täglich Vitamin B einnehmen.

## 1.2 Erscheinungsformen und Klassifikation der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten

Je nach Zeitpunkt und Schweregrad der Entwicklungsstörung während der Schwangerschaft treten verschiedene Erscheinungsformen auf.

Eine der einfachsten Spaltformen ist die Lippenkerbe, bei der oft lediglich die Muskulatur unterhalb der intakten Haut gespalten und nur ein Teil der Oberlippe (Lippenrot) betroffen ist. Bei der Lippenspalte sind alle Gewebsschichten in ihrer Kontinuität unterbrochen und der betroffene Bereich erstreckt sich entlang der Philtrumkante vom Lippenrot oft bis zum Naseneingang, und der Nasenflügel ist auf der betroffenen Seite abgeplattet und verzogen. Lippenkerben und Lippenspalten können einseitig (unilateral) oder beidseitig (bilateral) auftreten. Bei beidseitigen Lippenspalten ist das zentrale Segment der Oberlippe isoliert (Abb. 1.1).



**Abb. 1.1:**  
**Patient mit linksseitiger Lippenkerbe und rechtsseitiger unvollständiger Lippenspalte**  
**(oben: präoperativ, unten: postoperativ)**  
(Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie/Plastische Chirurgie der FSU Jena)

Zusätzlich zur Lippe kann noch der zahntragende Teil des Oberkiefers (Alveolarkamm) betroffen sein. Die Spaltbildung erstreckt sich hier entlang der Philtrumkante und des seitlichen Schneidezahnes des Oberkiefers. Diese Lippen-Kieferspalte kann ebenfalls ein- oder beidseitig auftreten. Isolierte Kieferspaltentretten nicht auf.



**Abb. 1.2:**  
**Patient mit doppelseitiger Lippen-Kiefer-Gaumen-Segelspalte (oben: präoperativ, unten: postoperativ)**  
(Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie/Plastische Chirurgie der FSU Jena)

Bei der häufigsten Form, der einseitigen Lippen-Kiefer-Gaumen-Segelspalte sind zusätzlich zu Lippe und Kiefer auch noch Gaumendach und Nasenboden (harter Gaumen) sowie Muskulatur und Weichteile des Gaumensegels mit der Uvula (weicher Gaumen) gespalten. Die schwerwiegendste Form ist die doppelseitige Lippen-Kiefer-Gaumen-Segelspalte (Abb. 1.2). Die Nasenspitze ist oft abgeflacht, da der Nasensteg kaum noch vorhanden ist. Der isolierte Zwischenkiefer kann je nach vorhandener Anzahl an Zahnanlagen in seiner Größe variieren und wird nur von Vomer und Nasenseptum getragen. Es kann jedoch auch eine isolierte Spaltbildung des harten und/oder weichen Gaumens auftreten (Abb. 1.3). Beim

geringsten Schweregrad tritt nur eine Spaltbildung des Zäpfchens auf (uvula bifida). Weiterhin existieren verdeckte Spalten (submuköse Gaumenspalten), bei denen die gespaltene Muskulatur durch die darüber liegende, intakte Schleimhaut kaschiert wird.



**Abb. 1.3:**  
**Patient mit Gaumen-Segelspalte im Rahmen einer Alkoholembryopathie**  
(Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie/Plastische Chirurgie der FSU Jena)

Zählt man sämtliche Spaltvarianten von den Mikroformen über die partiellen Spalten bis hin zu den doppelseitigen totalen Lippen-Kiefer-Gaumen-Segelspalten zusammen, erhält man über 30 verschiedene Spaltformen..

An die systematische Klassifikation von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten werden von mehreren Seiten hohe Anforderungen gestellt. Grundlagenforscher bevorzugen eine entwicklungsgeschichtliche Einteilung, Kliniker hingegen wünschen eine übersichtliche und therapieorientierte Klassifikation. Entsprechend diesen Anforderungen basieren die bisherigen Klassifikationen je nach Fragestellung auf folgende Aspekte:

- 1) embryonale Entwicklung
- 2) anatomisch-morphologisches Erscheinungsbild

Die von *Davies und Ritchi 1922* vorgeschlagene Klassifikation stützt sich im Wesentlichen auf morphologische Gesichtspunkte: Die Lippen-Kiefer-Gaumenspalten werden in präalveoläre, postalveoläre und alveoläre Spalten unterteilt. Anatomische Trennmarke zwischen Lippen- und Gaumenspalten stellt der Processus alveolaris dar.

*Veau* unterteilte die Lippen-Kiefer-Gaumenspalten 1931 in vier Formen. Lippen-Kieferspalten bleiben bei dieser Einteilung unberücksichtigt:

- I) Spalten des weichen Gaumens
- II) Spalten des harten Gaumens
- III) einseitige durchgehende Lippen-Kiefer-Gaumenspalten
- IV) beidseitige durchgehende Lippen-Kiefer-Gaumenspalten

*Fogh-Andersen* propagierte 1942, isolierte Gaumenspalten stellten nicht nur entwicklungsgeschichtlich, sondern auch erblich einen besonderen Spalttyp dar. Er plädierte für ein Klassifikationssystem mit nur zwei Kategorien (primäre und sekundäre Spalten), welches sich aber nicht durchsetzte.

Den Veröffentlichungen von *Kernahan und Stark (1958)* ist folgendes zu entnehmen: Lippenspalten und Gaumenspalten sind voneinander unabhängige Fehlbildungen, die zu unterschiedlichen Zeiten der embryonalen Entwicklung entstehen. Die anatomische Grenzmarke wird durch das Foramen incisivum gebildet. Im Gegensatz zu *Fogh-Andersen* wurden die Spaltbildungen des primären Gaumens noch unterteilt:

- I) Spalten des primären Gaumens (Lippen- und Lippen-Kieferspalten)
- II) Spalten des sekundären Gaumens (Gaumen- und Segelspalten)
- III) Spalten des primären und sekundären Gaumens

*Koch* führte 1963 die sogenannte „Thallwitzer Nomenklatur“ ein. Der Spaltverlauf ist hier in vier topographische Bereiche unterteilt. Der weiche Gaumen trägt die Bezeichnung Segel (S), alle anderen Regionen die entsprechenden Kürzel: Lippen (L), Kiefer (K) und Gaumen (G). Ab 1964 wurde jeder Abschnitt zusätzlich mit einer Zahl von 1 - 3 versehen, die den Schweregrad wiedergab.

Auf dem vierten internationalen Kongress für plastische Chirurgie und Wiederherstellungschirurgie in Rom 1967 einigten sich Chirurgen aus über 50 Ländern auf eine einheitliche Klassifikation, die auf Richtlinien von *Fogh-Andersen, Kernahan und Stark* basiert. Diese setzt sich aus einer embryologischen und anatomischen Gliederung zusammen.

**Tabelle 1: Internationale Klassifikation der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten  
(4th Congress of the International Confederation for Plastic Surgery, Rom 1967)**

<b>Gruppe 1</b>	Spaltformen des vorderen (primären) embryonalen Gaumens
	Lippe uni- und bilateral Kiefer uni- und bilateral
<b>Gruppe 2</b>	Spaltformen des vorderen (primären) und des hinteren (sekundären) embryonalen Gaumens
	Lippe uni- und bilateral Kiefer uni- und bilateral harter Gaumen uni- und bilateral weicher Gaumen median
	Spaltformen des hinteren (sekundären) embryonalen Gaumens
	harter Gaumen uni- und bilateral weicher Gaumen median
<b>Gruppe 4</b>	seltene Gesichtsspalten

Die International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD 10) der Weltgesundheitsorganisationen beschrieb ein weiteres Klassifikationssystem. Dieses bezieht sich auf die betroffenen anatomisch-topographischen Regionen: L = lip, A = alveolus, H = hard palate, S = soft palate. Zusätzlich zu der Lokalisation können sämtliche Spaltkombinationen und Mikroformen bezeichnet werden.

### 1.3 Embryologie

Die Bildung einer Lippen-Kiefer-Gaumenspalte kann nur zwischen der 5. und 12. Entwicklungswoche stattfinden. In der vierten Embryonalwoche treten die sogenannten Kiemenbögen auf. Sie entstehen, wenn Zellen aus der Neuralleiste in die zukünftige Kopf- und Nackenregion einwandern. Bedeutend für die Entwicklung des Mittelgesichts ist das erste Kiemenbogenpaar, welches die Anlagen der jeweils paarigen Ober- und Unterkieferwülste trägt. Zusätzlich zu diesen beteiligt sich der unpaare Stirnwulst an der Mittelgesichtsentwicklung. Diese fünf Gesichtswülste umschließen in der vierten Woche die ektodermale Mundbucht. Gegen Ende der vierten Embryonalwoche findet die Verschmelzung der medialen Abschnitte der Unterkieferwülste statt. Aus Ihnen bilden sich Unterkiefer und Unterlippe. Am unteren Ende des Stirnnasenwulstes tritt eine ovale Ektodermverdichtung auf, die sogenannte Riechplakode. An deren Rändern werden durch Mesenchymproliferation an jeder Seite ein medialer und lateraler Nasenwulst, sowie ein hufeisenförmiger Wulst gebildet. Durch letzteren wird die Riechplakode in die Tiefe

verlagert und zur Riechgrube umgewandelt. Währenddessen wachsen die Oberkieferwülste aufeinander zu und es kommt zur Vereinigung mit dem medialen Nasenwulst. In der 6. und 7. Entwicklungswoche verschmelzen die beiden medialen Nasenwülste.

Es kommt am Grund der die Gesichtswülste abgrenzenden Furchen zur Auflösung der aneinander liegenden Epithelien, Mesenchymbildung und -durchwachsung, durch welche diese Vertiefungen verbunden und nivelliert werden. Dabei bildet sich das Zwischenkiefersegment, aus welchem das Philtrum (mittlerer Teil der Oberlippe), der primäre Gaumen und der die Schneidezähne tragende Teil des Oberkiefers hervorgehen. Unterbleibt die Vereinigung der beiden Oberkieferfortsätze mit dem Nasenfortsatz, so entsteht eine uni- oder bilaterale Lippen-Kieferspalte. Aus dem Oberkieferwulst entstehen außerdem die seitlichen Teile der Oberlippe, des Oberkiefers und des sekundären Gaumens.

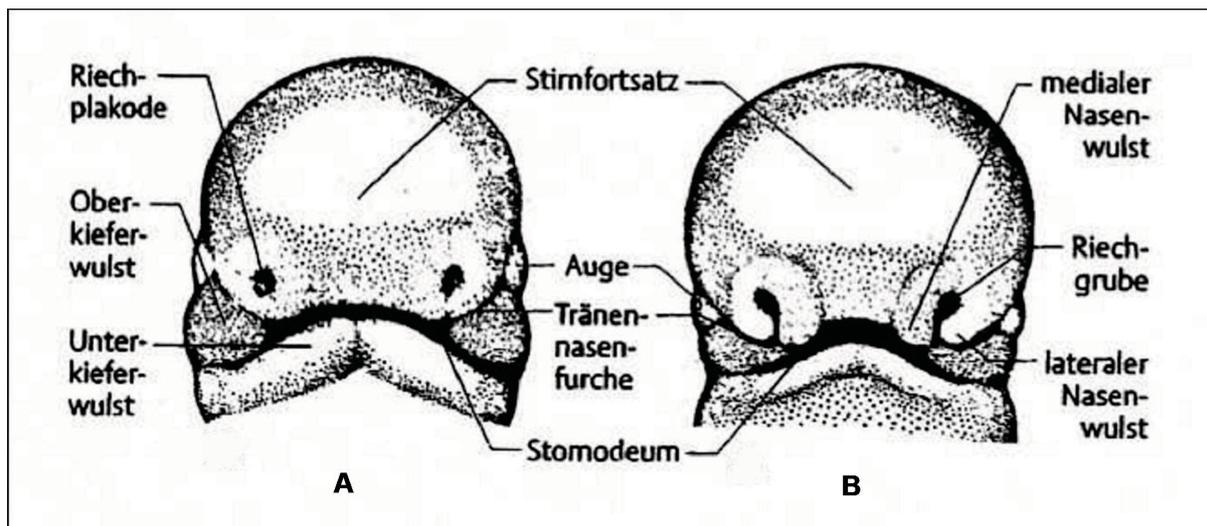


Abb. 1.4:

A) 5 Wochen alter Embryo

B) 6 Wochen alter Embryo

Die Nasenwülste grenzen sich allmählich vom Oberkieferwulst durch tiefe Furchen ab.

**In der normalen Entwicklung kommt es im Bereich der Furchen nicht zu einer Spaltbildung.**

(Aus: Thomas W. Sadler 1998. Medizinische Embryologie. Die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen. Stuttgart - New York, Thieme Verlag, S. 342)

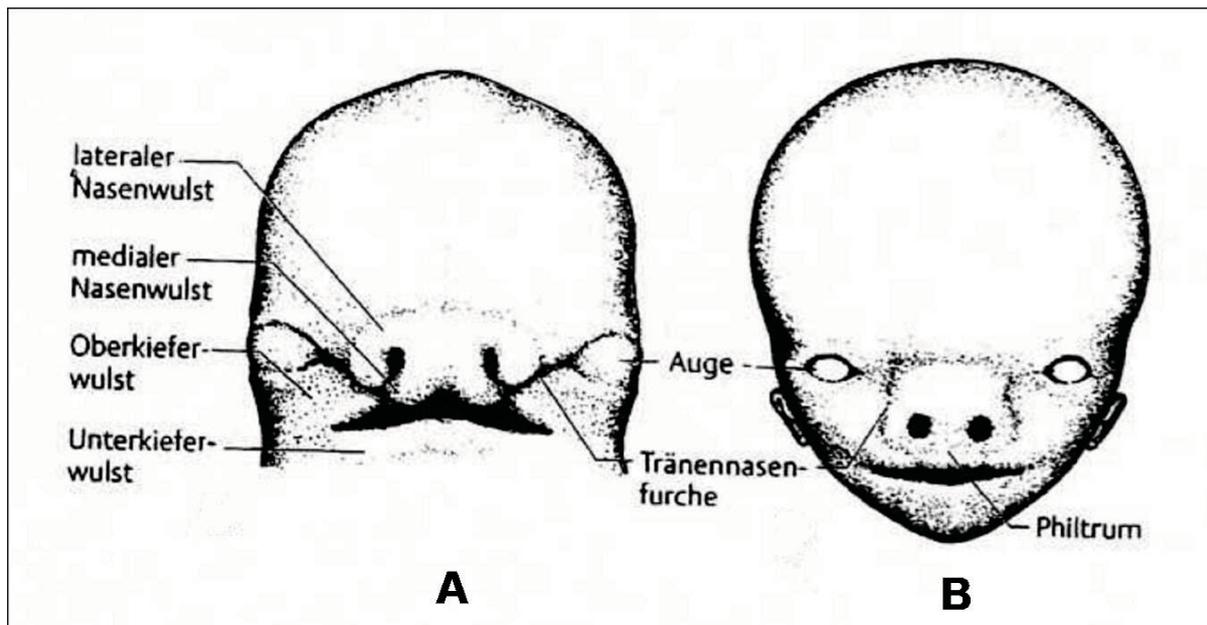


Abb. 1.5:

A) 7 Wochen alter Embryo

Die Oberkieferfortsätze sind mit den medialen Nasenwülsten verschlossen.

B) 10 Wochen alter Embryo

(Aus: Thomas W. Sadler 1998. Medizinische Embryologie. Die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen. Stuttgart - New York: Thieme Verlag, S. 343)

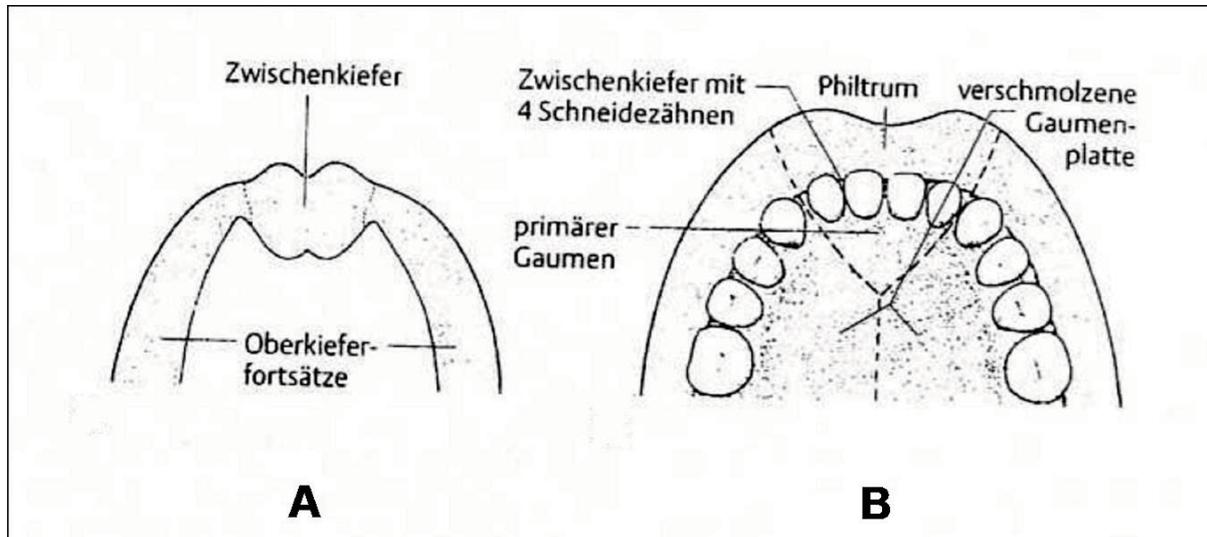


Abb. 1.6: Bildung des primären Gaumens

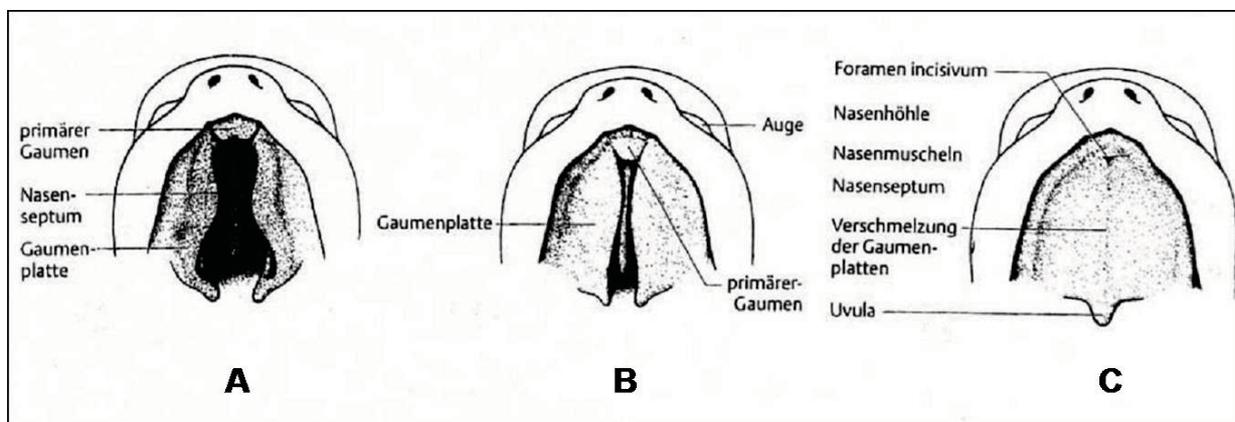
A) Das Zwischenkiefersegment geht aus den beiden medialen Nasenwülsten hervor.

B) Aus dem Zwischenkiefersegment.

(Aus: Thomas W. Sadler. 1998. Medizinische Embryologie. Die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen. Stuttgart - New York: Thieme-Verlag, S.344)

An den medialen Enden jedes Oberkieferwulstes bilden sich in der 7. Entwicklungswoche vertikal gestellte Gaumenfortsätze. Diese schwenken in die Horizontale und wachsen danach

aufeinander zu. Als nächstes vereinigen sie sich mit dem unpaaren primären Gaumen, es bildet sich eine Epithelnaht. Dabei kommt es zu einer Epithelverklebung und zum programmierten Tod der Epithelzellen an der Verschmelzungszone, welche anschließend von Mesenchymzellen durchwachsen wird. Dieser Prozess schreitet von der 8. bis zur 12. Entwicklungswoche von vorn nach hinten fort. Der harte Gaumen entsteht aus dem vorderen Anteil des Gaumens durch Verknöcherung, aus dem hinteren Abschnitt gehen das Gaumensegel und die Uvula hervor. Letztere wird oftmals erst postnatal vollständig geschlossen. Bei Störungen dieses Prozesses bildet sich eine Gaumenspalte.



**Abb. 17: Bildung des sekundären Gaumens**

**A) 4 Wochen alter Embryo**

**B) 7 1/2 Wochen alter Embryo**

**C) 10 Wochen alter Embryo**

(Aus: Thomas W. Sadler. 1998. Medizinische Embryologie. Die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen. Stuttgart - New York: Thieme-Verlag, S.344-346)

## 1.4 Auf der Suche nach den verantwortlichen Genen

Seit etwa zwei Jahrzehnten befassen sich zahlreiche Forschungsgruppen mit der Frage, ob die Entstehung von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten genetischen Ursprungs ist. Sie stützten ihre Untersuchungen auf eine Anzahl von Genen, wie zum Beispiel TGFA, TGFB, MSX1, BCL3 und DLX2, von denen es Hinweise gibt, dass sie bei der Spaltentwicklung eine Rolle spielen.

Im folgenden Abschnitt wird das MSX1-Gen, welches Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist, vorgestellt.

---

### 1.4.1 Das Kandidatengen MSX1

Das Kandidatengen MSX1 gehört zu den Homeoboxgenen. Diese nehmen während der Embryonalentwicklung eine Sonderstellung ein. Sie liefern Informationen für Proteine, welche die Transkription anderer Genkomplexe regulieren (*Gehring 1993*). Alle Homeoboxgene besitzen einen Bereich von 180 Basenpaaren, die Homeobox, welche für einen Proteinabschnitt von 60 Aminosäuren (Homeodomäne) codiert. Dieser Proteinabschnitt formiert sich zu einem sogenannten Helix-turn-Helix-Motiv („Spirale-Kurve-Spirale“), welches sich auf einen bestimmten DNA-Abschnitt nachgeschalteter Gene setzen kann. Durch Interaktion mit anderen Zellbestandteilen schaltet es diejenigen Gene an oder aus, vor die es sich gesetzt hat. Die Homeobox weist bei allen Tieren eine erstaunliche Ähnlichkeit mit Werten von 60 – 80% auf. Die von der Homeobox kodierte Proteinabschnitte sind sich jedoch noch ähnlicher. Die Antennapedia-Homeodomäne der *Drosophila* unterscheidet sich beispielsweise von der homologen Homeodomäne beim Menschen (Hox-2 Cluster) nur um eine einzige Aminosäure.

Eine Unterfamilie der Homeoboxgene stellen die sogenannten Hox-Gene dar. Sie zeichnen sich durch besondere Sequenzeigenschaften innerhalb des Helix-turn-Helix-Motivs aus. Bei der *Drosophila* ist nur ein einziger Komplex von Hox-Genen bekannt, Wirbeltiere tragen vier ähnliche Komplexe auf vier Chromosomen. Die Komplexe tragen die Namen Hox a, Hox b, Hox c, Hox d und können bis zu 13 Hox-Gene besitzen. Die MSX-Familie der Homeobox-Gene umfasst MSX1 und MSX2, deren Transkripte bei der Embryonalentwicklung verschiedener Säugetiere eine Rolle spielen.

Es wurden bisher zahlreiche Tier- und Humanstudien zu MSX1 veröffentlicht, die sich aber in ihren Ergebnissen unterschieden. Ein einheitlicher Zusammenhang zwischen MSX1 und einer Spaltbildung konnte bisher nicht beschrieben werden.

### 1.4.2 Tierstudien zu MSX1

*Satokata und Maas (1994)* konnten in ihrer Studie mit transgenen Mäusen, bei denen das MSX1-Gen nicht funktionsfähig war, erstmals die Bildung sekundärer Gaumenspalten und weitere Fehlbildungen des Neuro- und Viscerocraniums aufzeigen.

*Bei et al. (2000)* führten eine Studie mit MSX1-Knockout-Mäusen durch, bei denen die Zahnentwicklung zum Stillstand kam, da MSX1 für die Bildung des Zahnmesenchyms

---

benötigt wird. *Zhang et al. (2002, 2003)* wiesen nach, dass MSX1 bzw. das ihm vorgeschaltete Bmp4 durch Induktion von Dlx5 und Cbfa1 die Bildung des Alveolarknochens reguliert und MSX1-Mutationen sowohl die Bildung von LKGS-Spalten als auch die Nichtanlage von Zähnen entscheidend beeinflussen.

### 1.4.3 Humanstudien zu MSX1

#### a) Kopplungsanalysen

Kopplungsanalysen werden verwendet, um herauszufinden, wie häufig sich genetische Merkmale eines Chromosoms bei Rekombinationsereignissen getrennt haben. Unter Rekombination versteht man die getrennte Vererbung zweier Genorte (Loci). Liegen diese auf zwei verschiedenen Chromosomen oder weit voneinander auf demselben Chromosom, ist eine Rekombination wahrscheinlich. Je näher sie jedoch beieinander liegen, desto unwahrscheinlicher ist eine Trennung bei einem Rekombinationsereignis, das heißt beide Allele werden gemeinsam weitervererbt.

Die Kopplungsanalyse bietet somit die Möglichkeit, krankheitsverursachende Gene zu lokalisieren. Man untersucht multiplexe Familien. Hierbei handelt es sich um Familien, in denen mehrere Generationen von der entsprechenden Erkrankung betroffen sind. Nach Bestimmung eines genetischen Markers ist es möglich, eines seiner Allele in der unmittelbaren Nähe des krankheitsverursachenden Gens überzufällig häufig nachzuweisen.

In den letzten Jahren wurden einige Kopplungsanalysen bezüglich MSX1 und LKGS-Spalten mit unterschiedlichen Ergebnissen durchgeführt.

*Lidral et al. (1998)* konnten beispielsweise in ihrer Studie mit 194 US-Spaltträgerfamilien eine Kopplung von MSX1 zu LKGS-Spalten aufzeigen, während *Marazita et al. (2002)* in ihrer 36 chinesischen Familientrios umfassenden Analyse über keine signifikanten Ergebnisse berichten konnten.

#### b) Assoziationsanalysen

Wesentliches Ziel einer Assoziationsanalyse ist es, krankheitsverursachende Gene im menschlichen Genom zu lokalisieren. Im Unterschied zu Kopplungsanalysen verwendet man Markerdaten von Personen mit einem bestimmten Krankheitsmerkmal und von

---

Kontrollpersonen, die dieses Merkmal nicht besitzen. Während einer Assoziationsanalyse lässt sich bei Signifikanz ein Zusammenhang zwischen bestimmten Allelen und einer Krankheit nachweisen.

### **Familienbasierte Assoziationsanalysen**

*Jugessur et al. (2003)* konnten anhand 262 norwegischer Familientrios (davon 174 LK+/-G-Spalträger und 88 G-Spalträger) eine Assoziation zwischen MSX1 und G-Spalträgern nachweisen. Ganz besonders deutlich wurde diese bei G-Spaltpatienten, die bezüglich des MSX1-CA A4 Allels homozygot waren. *Fallin et al. (2003)* führten eine Studie mit 206 Spaltpatienten und deren Eltern durch und konnten einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von LKGS-Spalten und MSX1 aufzeigen. *Suazo et al. (2004)* untersuchten 60 chilenische Spalträgerfamilientrios und konnten ebenfalls einen Zusammenhang in der Allelfrequenz von MSX1 und der Entstehung von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten feststellen. Auch *Wu et al. (2007)* gelang dies an 129 Familientrios.

### **Klassische Fall-Kontroll-Studien**

*Lidral et al. (1997)* führten als eine der Ersten eine Fall-Kontroll-Studie in der philippinischen Bevölkerung durch, konnten allerdings keine Unterschiede in der Allelfrequenz zwischen Spalträgern und Kontrollpersonen aufzeigen. *Romitti et al. (1999)* gelang dies jedoch in ihrer US-amerikanischen Studie. *Beaty et al. (2001)* verglichen 171 Spalträger mit 182 Kontrollpersonen bezüglich der Allelverteilung bei MSX1 zwischen diesen beiden Gruppen. Es konnten ebenfalls signifikante Unterschiede nachgewiesen werden. In der von *Blanco et al. (2004)* durchgeführten Studie wurden 56 Patienten mit LKGS-Spalten 59 Kontrollpersonen gegenübergestellt. Es konnte jedoch kein Beweis gefunden werden, dass MSX1 bei der Entstehung von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten eine Rolle spielt. *Otero et al. (2007)* führten in Kolumbien eine Studie durch, in der sie Unterschiede in der Allelfrequenz von MSX1 zwischen 94 Spalträgern und 93 gesunden, unverwandten Kontrollpersonen untersuchten. Sie konnten einen Zusammenhang in der Allelverteilung von MSX1 und der Entstehung von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten nachweisen. Ebenso gelang dies *Park et al. (2007)*, die 52 koreanische Spaltpatienten mit 96 Kontrollen verglichen. *Zhang et al. (2008)* konnten in ihrer Fall-Kontroll-Studie keine signifikanten Abweichungen zwischen Spalträgern und entsprechenden Kontrollen feststellen.

**c) Mutationsanalysen**

Für die Durchführung von Mutationsanalysen werden Studien benötigt, bei denen zwischen Spaltträgern und Kontrollen ein signifikanter Unterschied in der Häufigkeitsverteilung eines bestimmten Allels ermittelt wurde. Man vermutet, dass Mutationen des entsprechenden Allels zur Entstehung von LKGS-Spalten beitragen.

Im letzten Jahrzehnt ist es verschiedenen Forschungsgruppen gelungen, in ihren Untersuchungen diverse Mutationen nachzuweisen. Im nachfolgenden Abschnitt sind die neuesten erfolgreichen Mutationsanalysen dargestellt.

*Lace et al.* gelang es 2006 in 53 Blutproben von LKGS-Patienten 16 verschiedene DNA-Sequenzvariationen nachzuweisen, 6 davon waren zuvor noch nicht beschrieben worden.

*Tongkobpetch et al. (2006)* verglichen 100 thailändische Patienten mit nichtsyndrom-assoziierten LKGS-Spalten mit 162 gesunden Kontrollpersonen bezüglich Mutationen in codierenden DNA-Abschnitten. Es gelang, Mutationen im MSX1-Gen der Spaltträger nachzuweisen, die bei den gesunden Kontrollen nicht vorhanden waren.

*Zhang et al. (2008)* konnten jedoch in ihrer Analyse weder bei LKGS-Patienten noch bei gesunden Kontrollen Mutationen im MSX1-Gen feststellen.

---

## 2. Ziel der Arbeit

Die kausale Genese von isolierten LKGS-Spalten ist weiterhin ungeklärt. Derzeit geht man von einem multifaktoriellen System mit additiver Polygenie und Schwellenwerteffekt aus, wobei Tierversuche darauf hinweisen, dass den genetischen Faktoren der größte Stellenwert zukommt.

MSX1 ist ein Kandidatengen, das im Fokus zahlreicher Arbeiten steht. MSX1 ist auch Gegenstand einer Fall-Kontroll-Studie an einem Krankengut der Klinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie der Friedrich-Schiller-Universität Jena (*Schmidt et al. 2007*). In dieser Studie wurden vier verschiedene Allele des CA-Dinucleotid-Repeats des MSX1-Gens mit den Basenpaarlängen 171, 173, 175 und 177 bp identifiziert. Während drei der ermittelten Basenpaarlängen mit den von *Padanilam et al. (1992)* erstmals beschriebenen übereinstimmten, konnte in der Arbeit das Allel 169 nicht bestimmt werden. Stattdessen wurde das Allel 177 identifiziert. Ein signifikanter Unterschied bezüglich der Allelhäufigkeitsverteilung zwischen Spaltträgern und Kontrollpersonen wurde nicht festgestellt.

Ziel der vorliegenden klassischen Fall-Kontroll-Studie bzw. familienbasierten Assoziationsstudie ist die Untersuchung einer weiteren Stichprobe aus dem Patientengut der Klinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie der Friedrich-Schiller-Universität Jena auf das Vorliegen von MSX1-CA-Dinucleotid-Repeats bei folgenden Fragestellungen:

1. Wie viele verschiedene Allele liegen vor?
2. Welche Basenpaarlängen lassen sich bei diesen Allelen ermitteln? Kann hierbei das Ergebnis der Arbeit von *Schmidt et al. 2007* reproduziert werden?
3. Lässt sich ein signifikanter Unterschied der Allelhäufigkeitsverteilung zwischen Spaltträgern und Kontrollpersonen erheben?

## **3. Material und Methoden**

### **3.1 Patientengut und Untersuchungsmaterial**

Für die vorliegende Studie wurden 76 (36 weibliche und 40 männliche) Patienten aus dem Krankengut der Klinik und Poliklinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie/Plastische Chirurgie der Friedrich-Schiller-Universität Jena untersucht, die sich zum Zeitpunkt der Materialentnahme ambulant in der Spaltträgersprechstunde vorstellten bzw. stationär einer operativen Therapie unterzogen. Es handelte sich um nicht miteinander verwandte Träger einer isolierten Spalte. Diese entstammten überwiegend simplexen Familien (N = 62). Eine multiplexe Familienanamnese fand sich bei 14 der Patienten.

Bei 10 Spaltträgern war es möglich, zusätzlich genetisches Material beider biologischen Eltern zu gewinnen, wobei diese keine Spalte aufwiesen.

Die Kontrollgruppe, die sich aus Patienten des studentischen Behandlungskurses, Mitarbeitern und Studenten der Friedrich-Schiller-Universität Jena oder deren Angehörigen zusammensetzte, bestand aus 82 (38 weibliche und 44 männliche) gesunden und nicht miteinander verwandten Personen. Diese wiesen keine Spaltanamnese in der Familie auf.

Alle untersuchten Personen waren deutscher Herkunft.

Nach Aufklärung über Gegenstand und Ziel der vorliegenden Arbeit wurde von den Probanden bzw. von ihren Eltern das Einverständnis zur Teilnahme in schriftlicher Form eingeholt. Anschließend erfolgte die Entnahme von Mucosazellen von der Wangeninnenseite mittels eines Watteträgers. Bei 10 der Spaltträger wurden stattdessen im Rahmen einer ohnehin anstehenden Blutentnahme ca. 2 ml venöses EDTA-Blut für diese Studie gewonnen.

### **3.2 Molekulargenetische Methoden**

Die molekulargenetischen Untersuchungen wurden im Labor des rechtsmedizinischen Institutes der Friedrich-Schiller-Universität Jena durchgeführt.

### **3.2.1. DNA-Extraktion**

#### **a) DNA-Extraktion aus Blut mittels QIAmpDNA Mini Kit (50erKit) (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland)**

1,2 ml Protease wurden solvent zur lysophilisierten Protease gegeben und das Ganze wurde gemischt. Zum AW1-Puffer-Konzentrat (19 ml) wurden 25 ml absolutes Ethanol gegeben, alles wurde gemischt und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Zum AW2-Puffer-Konzentrat (13 ml) wurden 30 ml absolutes Ethanol gegeben, das Ganze wurde wiederum gemischt und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Anschließend wurden die Blutproben auf Raumtemperatur äquilibriert und ein Heizblock auf 56°C vorgeheizt. Der Elutionspuffer wurde auf Raumtemperatur äquilibriert und der Lysepuffer zum Auflösen der Präzipitate auf 56°C erwärmt.

Anschließend gab man 20 µl Protease mit 200 µl Blut und 200 µl Lysepuffer in ein 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß. Das ganze wurde 15 Sekunden gevortext, bei 56°C 10 Minuten inkubiert und anschließend kurz anzentrifugiert.

Dann wurden 200 µl absolutes Ethanol zum Ansatz gegeben, 15 Sekunden gevortext und kurz anzentrifugiert. Der Ansatz wurde auf eine QIAmp-Spin-Säule gegeben, verschlossen und 1 Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Die Säule musste man dann in ein neues 2 ml Sammelgefäß setzen. Dann wurde sie vorsichtig geöffnet, nach Zugabe von 500 µl Puffer AW1 wieder verschlossen und erneut bei 8000 rpm 1 Minute zentrifugiert. Die Säule wurde wiederum in ein neues Sammelgefäß gesetzt, vorsichtig geöffnet und nach Zugabe von 500 µl Puffer AW2 erneut verschlossen und bei 14000 rpm 3 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gesetzt, vorsichtig geöffnet und es wurden 200 µl Elutionspuffer dazugegeben. Das Ganze wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 8000 rpm 1 Minute zentrifugiert.

#### **b) DNA-Extraktion aus Mundschleimhaut mittels Invisorb spin Swab Kit (250) (Invitex GmbH, Berlin, Deutschland)**

Zunächst wurde der Elutionspuffer auf 65°C erhitzt. Ein ganzer Abrieb (Watte eines Stäbchens mit der daran haftenden DNA) wurde mit 600 µl Lysis buffer G und 20 µl Proteinase K versetzt. Das Ganze wurde bei 65°C 15 Minuten inkubiert. Anschließend

wurden 300 µl Binding buffer T zu dem Ansatz gegeben und alles kurz anzentrifugiert. Der gesamte Ansatz wurde nun auf einen Filter gegeben, es erfolgte eine 1-minütige Zentrifugation bei 10000 rpm.

Danach wurde der Durchfluss verworfen und es wurden 700 µl Wash buffer auf den Filter gegeben, woran sich wiederum eine Zentrifugation von 30 Sekunden bei 10000 rpm anschloss. Dieser Waschschrift wurde einmal wiederholt, der Durchfluss anschließend verworfen und das Ganze erneut 2 Minuten zentrifugiert. Der Filter wurde anschließend in einem neuen 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß mit 50 µl Elutionspuffer versehen und das Gemisch wurde 1 Minute inkubiert. Abschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 10000 rpm für 1 Minute. Der Durchfluss enthielt die gewünschte DNA.

#### **3.2.2 DNA-Quantifizierung mittels RT-PCR**

Die Real-Time-quantitative-PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und bietet zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung. Ein Fluoreszenzfarbstoff, der dem PCR-Ansatz beigemischt ist, bindet nach jedem Zyklus unspezifisch an doppelsträngige DNA. Dabei kommt es zur Emission eines Fluoreszenz-Signals, welches detektiert wird. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, was eine Quantifizierung möglich macht

In der vorliegenden Arbeit wurde das Quantifiler Human DNA Quantifikation Kit (Applied Biosystems by life technologies, New York, NY, USA) verwendet, dem als Qualitätskontrollmaterial Quantifiler Human DNA Standard beigefügt war.

Das Ansetzen der Standards ist in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Danach wurde der Mastermix angesetzt. Dieser ließ sich aus folgendem Grundprotokoll für eine Probe auf die gesamte Anzahl von Proben berechnen:

- Quantifiler Human Primer Mix / 10, 5 µl
- Quantifiler PCR reaction Mix / 12, 5 µl

**Tabelle 3.1: Ansetzen der Standards**

<b>Probe</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Mischung</b>	<b>Verdünnungsfaktor</b>
Standard 1	50,0 ng/μl	10 μl Standard 30 μl TE-Puffer	4x
Standard 2	16,7 ng/μl	10 μl Standard 1 20 μl TE-Puffer	3x
Standard 3	5,65 ng/μl	10 μl Standard 2 20 μl TE-Puffer	3x
Standard 4	1,85 ng/μl	10 μl Standard 3 20 μl TE-Puffer	3x
Standard 5	0,82 ng/μl	10 μl Standard 4 20 μl TE-Puffer	3x
Standard 6	0,21 ng/μl	10 μl Standard 5 20 μl TE-Puffer	3x
Standard 7	0,068 ng/μl	10 μl Standard 6 20 μl TE-Puffer	3x
Standard 8	0,023 ng/μl	10 μl Standard 7 20 μl TE-Puffer	3x

Die ersten 16 Reaktionsgefäße wurden für den Standard verwendet (Standard 1 – 8 Doppelbestimmung), die letzten 4 Reaktionsgefäße für die Leerwerte (Reaktion ohne DNA). In diese 0,1 ml Reaktionsgefäße wurden nun jeweils 23 μl des Mastermixes vorgelegt und anschließend 2 μl DNA dazugegeben. Bei den Leerwerten wurde anstatt DNA jeweils 2 μl Aqua ad injectabilia zupipetiert.

Anschließend erfolgte die software-gestützte Amplifikation und Auswertung der Analyse. Die Software wurde von Applied Biosystems by life technologies, New York, NY, USA bereitgestellt.

### **3.2.3 PCR-Amplifikation**

Die Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ist eine sehr bedeutende Methode zur Amplifizierung (Vermehrung) eines definierten DNA-Bereiches. Das Prinzip beruht auf der zyklischen Synthese spezifischer DNA-Teile und zwar der gleichzeitigen Vermehrung komplementärer DNA-Stränge. Allerdings müssen die Sequenzen an den Enden des gewünschten Bereichs bekannt sein. Dies ermöglicht die Synthese von zwei kurzen Starteroligonucleotiden, die sich an die DNA-Zielsequenz anlagern. Zur Amplifikation wird

die sogenannte Taq-Polymerase benutzt. Dieses Enzym ist thermostabil und wird daher durch Hitze nicht denaturiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende, von Padanilam et al. (1992) erstmals beschriebene Primer verwendet:

Vorwärts-Primer: 5'-GGGCATGTTGATGTCTGCTGAC-3'  
 Rückwärts-Primer: 5'-TTAGATTGTCATCAGTCCTC-3')

Der praktische Ablauf gestaltet sich wie folgt: Trennen der DNA in Einzelstränge durch Erhitzung, Hybridisierung der Primer für die Synthese der komplementären Nucleotidstränge und Synthese der komplementären DNA-Stränge durch die Taq-Polymerase.

**Tabelle 3.2: Reaktionsansatz für PCR**

<b>Reagenzien</b>	<b>Menge</b>
DNA	0,3 ng
Vorwärts-Primer (5'-GGGCATGTTGATGTCTCGTGAC-3')	2,5 µl
Rückwärts-Primer (5'-TTAGATTGTCATCAGTCCTC-3')	2,5 µl
dNTPs (A,C,G,T)	1,0 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl
BSA (bovine serum albumin)	0,5 µl
Puffer	5,0 µl
Aqua bidest.	35,3 µl
MgCl <sub>2</sub>	3,0 µl

Das Reagenziengemisch für die PCR (Tabelle 3.2) enthielt jeweils 0,3 ng des DNA-Extraktes, 5 µl PCR-Puffer, 3 µl MgCl<sub>2</sub>, 1 µl dNTPs [Desoxyadenosin(A), -cytosin(C),

-guanosin(G) und -thymin(T)], 0,5 µl BSA, 2,5 µl von jedem Primer (Der Rückwärts-Primer war fluoreszenzmarkiert.), 0,2 µl Taq-Polymerase und 35,3 µl steriles Aqua bidest.

Die DNA-Proben wurden kurz an zentrifugiert. Danach wurden die Ansätze hergestellt, das Ganze nochmals an zentrifugiert und in den Thermocycler Biometra (Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) gegeben.

Das Programm startete mit einer 3-minütigen Erhitzung des Reaktionsgemisches auf 94°C, um die DNA-Doppelhelix in Einzelstränge aufzutrennen. Diese dienten als Matrize für die Synthese komplementärer DNA-Stränge. Es wurden danach jeweils folgende Schritte durchlaufen:

1. Denaturierung der DNA für 1 Minute bei 94°C
2. 1-minütige Senkung der Temperatur auf 54°C, um die Anlagerung der Primer an die Einzelstränge zu gewährleisten (Annealing)
3. 30 s lange Erhöhung der Temperatur auf 72°C, damit die Synthese komplementärer DNA-Stränge durch die Taq-Polymerase durchgeführt werden konnte (Elongation)

Diese Reaktion wurde insgesamt in 34 Zyklen bei exponentieller Zunahme der DNA-Menge durchlaufen (Tabelle 3.3).

**Tabelle 3.3: Einstellungsparameter für PCR (34 Zyklen)**

<b>Zyklusschritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>
Denaturierung	94°C	60 sec
Annealing	54°C	60 sec
Elongation	72°C	30 sec

### 3.2.4 Fragmentlängenanalyse

Um die Fragmentlängenanalyse durchführen zu können, wurde ein homozygoter Patient mit bekannter Sequenz (CA-Dinucleotid-Repeat des Allels 169 bp) als Referenzwert festgelegt. 0,5 µl des PCR-Produktes wurden mit 12 µl deionisiertem Formamid und 0,5 µl eines Längenstandards versetzt und 3 Minuten bei 95°C denaturiert. Danach wurde die Fragmentlängenanalyse im ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Die Funktion des ABI PRISM 3130 beruht auf dem Prinzip einer Kapillarelektrophorese. Die größenabhängige Trennung von fluoreszenzmarkierten DNA-Molekülen erfolgt unter Einwirkung eines Stromflusses bei definierter Temperatur in einem polymergefüllten Kapillarrohr, nachdem zuvor eine definierte Spannung angelegt wurde. Die DNA-Fragmente wandern gemäß ihrer Kettenlänge durch die Kapillare und emittieren nach Anregung durch einen Laser eine für sie spezifische Fluoreszenz. Am Ende der Kapillare passieren sie ein Detektionsfenster, die Fluoreszenzintensität wird in Daten umgewandelt. Ferner wird die Intensität eines Längenstandards bestimmt. Mit Hilfe dieses Standards kann die GeneScan-Software-gestützte Analyse der Fragmentlängen erfolgen.

#### **3.2.5 Sequenzanalyse**

Um die genauen Basenpaarlängen feststellen zu können, wurde das PCR-Produkt im ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer stichprobenartig sequenziert.

Zuerst wurde eine Qiagen-Reinigung [QIAquick PCR-Purifikation Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland)] durchgeführt, um das PCR-Produkt von Verunreinigungen zu befreien. Das Kit enthält eine Qiagen-Spin-Säule mit einer Kieselsäure-Gel-Membran.

Durch Zugabe eines Bindungspuffers, der einen pH-Wert-Indikator enthält, kann das PCR-Produkt an diese Membran binden. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses in der Qiagen-Spin-Säule mit dem fünffachen Volumen Bindungspuffer vermischt und 2 Minuten bei 15000 U/min zentrifugiert. Der Puffer sorgt für optimale pH-Bedingungen, damit die DNA an die Membran binden und störende Zusätze entfernt werden können. Danach wurde der Bindungspuffer verworfen und 750µl Elutionspuffer dazugegeben, welcher die DNA von der Membran löst. Das Ganze wurde erneut 2 Minuten bei 15000 U/min zentrifugiert und der Elutionspuffer anschließend verworfen. Dann erfolgte wiederum eine 2-minütige Zentrifugation bei 15000 U/min, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.

Nach der Qiagen-Reinigung erfolgte die Sequenzierreaktion, bei der 5 µl des gereinigten PCR-Produktes mit 3,2 µl eines unmarkierten Sequenzierprimers und 4 µl eines Reaktionsmixes (ABI PRISM BigDye Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit) versetzt und das ganze mit Aqua bidest. auf 20 µl aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde gevortext und 1 Minute bei 13000 U/min zentrifugiert. Im Thermocycler Biometra erfolgte zunächst eine 30 Sekunden lange Denaturierung bei 96°C, danach folgten 25 Zyklen mit jeweils 15 Sekunden Denaturierung bei 96°C, 15 Sekunden bei 50°C und 4 Minuten bei 60°C.

Vor dem Auftragen auf den ABI PRISM 3130 wurde das Sequenzierungsprodukt mit 2 µl Natriumacetat (pH = 4,6-5,0) und 50 µl absolutem Ethanol versetzt, das Ganze gevortext und 10 Minuten ins Eisfach gegeben, dann 25 Minuten bei 15000 U/min sedimentiert. Es erfolgte das Abheben des Ethanols und das Waschen des Präzipitats mit 250 µl 70 %-igem Ethanol für 20 Minuten bei 15000 u/min und 4°C. Das Ethanol wurde verworfen und das entstandene Produkt in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, in 12 µl Formamid aufgenommen, gevortext und 2 Minuten bei 15000 U/min zentrifugiert.

### **3.3 Statistische Tests**

In der Statistik versteht man unter einer Hypothese eine anhand empirischer Daten zu prüfende Annahme. Als Gegensatzpaar werden Nullhypothese (H<sub>0</sub>) und Alternativhypothese (H<sub>A</sub> oder H<sub>1</sub>) unterschieden. Die Nullhypothese ist die Annahme über die Wahrscheinlichkeitsverteilung einer Zufallsvariabel. Die Alternativhypothese ist eine durch Beobachtungen oder Überlegungen begründete Annahme oder Vermutung, die es möglich macht, bestimmte Phänomene zu erklären. In der vorliegenden Studie wird nun untersucht, ob die ermittelten Ergebnisse zufällig entstanden sind (H<sub>0</sub>) oder ob ein tatsächlicher Effekt vorliegt (H<sub>1</sub>). Nullhypothese und Alternativhypothese dürfen sich nicht überschneiden. Ziel eines statistischen Tests ist die Verwerfung (Ablehnung) der Nullhypothese.

Man bezeichnet Unterschiede zwischen Messgrößen oder Variablen als signifikant, wenn die Wahrscheinlichkeit, dass sie durch Zufall so zustande kommen würden, nur gering ist. Auch statistisch signifikante Unterschiede können zufälligen Ursprungs sein (zwischen 0 und 100 %). Der Prozentwert hängt von der Auswahl der untersuchten Messgrößen ab. Zur Überprüfung der Signifikanz werden statistische Tests durchgeführt, die eine Abschätzung der Irrtumswahrscheinlichkeit erlauben. Die Irrtumswahrscheinlichkeit ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein Wert auch außerhalb des gewählten Vertrauensbereiches

zufällig vorkommen kann. Das festzulegende Quantil der maximal zulässigen Irrtumswahrscheinlichkeit wird als Signifikanzniveau  $\alpha$  bezeichnet. In der Regel wird es auf  $\alpha = 0,05$  festgelegt, das heißt, die maximal zulässige Wahrscheinlichkeit für irrtümliches Ablehnen einer eigentlich richtigen Nullhypothese beträgt 5 % (Fehler 1. Art). Mit 5 %-iger Wahrscheinlichkeit treten die Ergebnisse nur aufgrund eines ungünstigen Zufalls auf. Ist die Wahrscheinlichkeit kleiner als das vereinbarte Signifikanzniveau, kann  $H_0$  verworfen und das Ergebnis als signifikant aufgeführt werden.

In der vorliegenden Studie werden der Chi-Quadrat-Test nach Pearson und, wenn notwendig, der Exakte Test nach Fisher durchgeführt. Bei beiden wird jeweils noch der dazugehörige p-Wert ermittelt. Mit Hilfe von Chi-Quadrat-Tests werden zwei nominal oder ordinal skalierte Merkmale ( $M_1, M_1'$ ) anhand von beobachteten Häufigkeiten ihrer Merkmalsausprägungen ( $M_2, M_2'$ ) analysiert. Die Berechnung erfolgt anhand einer Kontingenztafel, in der die jeweiligen Merkmale anhand ihrer Merkmalsausprägungen gegenübergestellt werden. Jeder Eintrag in diese Kreuztabelle entspricht der Anzahl Individuen, die die jeweilige Merkmalsausprägung aufweisen. In der letzten Spalte und untersten Zeile werden die Randsummen notiert (Abb. 3.1).

<b>Merkmal</b>	<b>M2</b>	<b>M2'</b>	<b>gesamt</b>
<b>M1</b>	a	b	a+b
<b>M1'</b>	c	d	c+d
<b>Gesamt</b>	a+c	b+d	n = a+b+c+d

**Abb.3.1: Kontingenztafel für den Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest**

Die beobachteten Häufigkeiten in jeder Zeile werden nun mit den bei Unabhängigkeit erwarteten Häufigkeiten verglichen. Je größer die Differenz, desto eher spricht dies für eine Abhängigkeit zwischen beiden Merkmalen. Die erwarteten Häufigkeiten einer Zeile berechnen sich aus Zeilensumme x Spaltensumme/Gesamtzahl.

Dieser Sachverhalt soll nun in einem auf die vorliegende Studie bezogenen Beispiel verdeutlicht werden.  $M_1$  stellt hier die gesamte Spaltträgergruppe,  $M_1'$  die gesamte Kontrollgruppe dar. Es wird untersucht, wie oft ein bestimmtes Allel (hier 169 bp) vorhanden ( $M_2$ ) bzw. nicht vorhanden ( $M_2'$ ) ist (Abb. 3.2).

		Allel 169 bp		Gesamt
		nicht vorhanden	vorhanden	
Spaltträgergruppe	Anzahl	66	86	152
	% von Stichprobe	(43,4%)	(56,6%)	(100,0%)
Kontrollgruppe	Anzahl	80	84	164
	% von Stichprobe	(48,8%)	(51,2%)	(100,0%)
Gesamt	Anzahl	146	170	316
	% von Stichprobe	(46,2%)	(53,8%)	(100,0%)

**Abb.3.2:**

**Häufigkeitsverteilung des Allels 169 bp bei der gesamten Spaltträgergruppe und der gesamten Kontrollgruppe**

Voraussetzung ist aber, dass die erwarteten Häufigkeiten nicht kleiner als 5 sind. Ist dies jedoch der Fall, wird anstelle des Chi-Quadrat-Tests der Exakte Test nach Fisher verwendet. Dieser liefert auch bei einer geringen Anzahl von Beobachtungen zuverlässige Resultate.

Der p-Wert ist eine Kennzahl zur Auswertung statistischer Tests, er steht in enger Beziehung zum Signifikanzniveau. Der p-Wert eines Versuchsausgangs ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein zufälliger Versuch bei gültiger Nullhypothese mindestens so ausgeht wie der beobachtete Versuch. Die Nullhypothese wird verworfen, wenn der p-Wert kleiner als das vereinbarte Signifikanzniveau alpha ist. Das Ergebnis kann als statistisch signifikant angesehen werden.

## 4. Ergebnisse

Die molekulargenetische Untersuchung ergab vier verschiedene Allele mit den Basenpaarlängen 169, 171, 173 und 175 bp. Dieses Ergebnis stimmt mit den Untersuchungen von Padanilam et. al. (1992) überein.

Ein Allel mit der Basenpaarlänge 177 konnte nicht nachgewiesen werden. Somit konnte das Ergebnis der vorangegangenen Fall-Kontroll-Studie an einem Krankengut der Klinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie der Friedrich-Schiller-Universität Jena (*Schmidt et al. 2007*) nicht reproduziert werden.

### Klassische Fall-Kontroll-Studie

Um die Allelhäufigkeitsverteilung zwischen LKGS-Patienten und Kontrollpersonen ermitteln zu können, erfolgte eine Unterteilung der Spaltträger in männlich und weiblich, dazu in Spaltträger mit totaler und partieller Spalte sowie Spaltträger mit simplexer und multiplexer Familienanamnese (Tabelle 4.1).

Bei Betrachtung von Allelhäufigkeiten ist die Anzahl von Kopien eines Genortes  $2N$  und nicht die Probandenanzahl  $N$  entscheidend.

**Tabelle 4.1:**  
Häufigkeitsverteilung der Allele bei Unterscheidung zwischen totalen und partiellen Spalten sowie  $S_x$  und  $M_x$

Gruppe	Verteilung der Allele				Vergleichs- gruppe	Chi-Quadrat/p-Wert			
	169 bp	171 bp	173 bp	175 bp		169 bp	171 bp	173 bp	175 bp
<u>Tot.S. <math>S_x</math></u>									
m (2N = 40)	<b>23</b> (57,5)	<b>1</b> (2,5)	<b>10</b> (25)	<b>6</b> (15)	K (m)	2,26/0,18	1,83/0,27	2,27/0,16	0,99/0,37
w (2N = 30)	<b>17</b> (56,7)	<b>1</b> (3,3)	<b>7</b> (23,3)	<b>5</b> (16,7)	(w) K (w)	0,01/1	0,04/1	0,03/1	0,04/1
m+w (2N = 70)	<b>40</b> (57,1)	<b>2</b> (2,9)	<b>17</b> (24,3)	<b>11</b> (15,7)	K (m+w)	0,69/0,49	0,76/0,51	1,51/0,28	1,02/0,39

Fortsetzung von Tabelle 4.1

Gruppe	Verteilung der Allele				Vergleichs- gruppe	Chi-Quadrat/p-Wert				
	169 bp	171 bp	173 bp	175 bp		169 bp	171 bp	173 bp	175 bp	
<u>Part.S.Sx</u>										
m (2N = 24)	<b>15</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	K (m)	(w)	2,82/0,11	2,35/0,2	2,63/0,15	1,13/0,29
	(62,5)	(0)	(20,8)	(16,7)			0,19/0,78	1,66/0,5	0,25/0,75	0,53/0,69
w (2N = 30)	<b>17</b>	<b>2</b>	<b>8</b>	<b>3</b>	K (w)		0,13/0,83	2,24/0,19	0,03/1	0,2/0,76
	(56,7)	(6,7)	(26,7)	(10)						
m+w (2N = 54)	<b>32</b>	<b>2</b>	<b>13</b>	<b>7</b>	K (m+w)		1,06/0,35	0,27/0,74	1,31/0,31	0,16/0,81
	(59,3)	(3,7)	(24,1)	(13)						
<u>Alle.S.Sx</u>										
m (2N = 64)	<b>38</b>	<b>1</b>	<b>15</b>	<b>10</b>	K (m)	(w)	3,87/0,07	3,77/0,08	3,92/0,06	1,52/0,31
	(59,4)	(1,6)	(23,4)	(15,6)			0,09/0,86	1,17/0,35	0,04/1	0,13/0,8
w (2N = 60)	<b>34</b>	<b>3</b>	<b>15</b>	<b>8</b>	K (w)		0,21/0,73	1,59/0,32	0/1	0/1
	(56,7)	(5)	(25)	(13,3)						
m+w (2N = 124)	<b>72</b>	<b>4</b>	<b>30</b>	<b>18</b>	K (m+w)		1,33/0,28	0,84/0,41	2,27/0,15	0,81/0,38
	(58,1)	(3,2)	(24,2)	(14,5)						
<u>Tot.S.Mx</u>										
m (2N = 10)	<b>6</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	K (m)	(w)	1,03/0,34	0,6/1	3,21/0,09	3,94/0,08
	(60)	(0)	(10)	(30)			0,18/1	1,32/0,44	0,72/0,56	0,79/0,59
w (2N = 8)	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	K (w)		0,33/0,71	3,9/0,18	0/1	0/1
	(50)	(12,5)	(25)	(12,5)						
m+w (2N = 18)	<b>10</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	K (m+w)					
	(55,6)	(5,6)	(16,7)	(22,2)						
<u>Part.S.Mx</u>										
m (2N = 6)	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	K (m)	(w)	0,11/1	0,6/1	0,07/1	0,37/0,46
	(50)	(0)	(33,3)	(16,7)			0,63/0,57	1,67/0,4	0,28/1	0,74/1
w (2N = 4)	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	K (w)		1,98/0,3	8,75/0,1	1,23/0,28	0,6/1
	(25)	(25)	(50)	(0)						
m+w (2N = 10)	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	K (m+w)		0,48/0,53	0,35/0,46	0,25/0,73	0,01/1
	(40)	(10)	(40)	(10)						
<u>Alle.S.Mx</u>										
m (2N = 16)	<b>9</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	K (m)	(w)	0,93/0,42	1,58/0,35	2,34/0,16	3,36/0,09
	(56,3)	(0)	(18,8)	(25)			0,58/0,7	2,87/0,18	0,78/0,42	1,3/0,36
w (2N = 12)	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	K (w)		1,51/0,35	7,42/0,05	0,37/0,5	0,22/1
	(41,7)	(16,7)	(33,3)	(8,3)						
m+w (2N = 28)	<b>14</b>	<b>2</b>	<b>7</b>	<b>5</b>	K (m+w)		0,01/1	0,12/0,66	0,6/0,51	1,07/0,34
	(50)	(7,1)	(25)	(17,9)						

Fortsetzung von Tabelle 4.1

Gruppe	Verteilung der Allele				Vergleichs- gruppe	Chi-Quadrat/p-Wert			
	169 bp	171 bp	173 bp	175 bp		169 bp	171 bp	173 bp	175 bp
<u>Tot.S,Sx+Mx</u>									
m (2N = 50)	<b>29</b> (58)	<b>1</b> (2)	<b>11</b> (22)	<b>9</b> (18)	K (m)	2,8/0,11	2,36/0,16	4,02/0,06	2,34/0,2
w (2N = 38)	<b>21</b> (55,3)	<b>2</b> (5,3)	<b>9</b> (23,7)	<b>6</b> (15,8)	K (w)	0,07/0,83	0,7/0,58	0,04/1	0,08/1
m+w (2N = 88)	<b>50</b> (56,8)	<b>3</b> (3,4)	<b>20</b> (22,7)	<b>15</b> (17)	K (m+w)	0,72/0,43	0,55/0,55	2,56/0,15	1,9/0,2
<u>Part.S,Sx+Mx</u>									
m (2N = 30)	<b>18</b> (60)	<b>0</b> (0)	<b>7</b> (23,3)	<b>5</b> (16,7)	K (m)	2,54/0,14	2,93/0,2	2,31/0,18	1,31/0,31
w (2N = 34)	<b>18</b> (52,9)	<b>3</b> (8,8)	<b>10</b> (29,4)	<b>3</b> (8,8)	K (w)	0,32/0,62	2,78/0,24	0,3/0,78	0,9/0,46
m+w (2N = 64)	<b>36</b> (56,3)	<b>3</b> (4,7)	<b>17</b> (26,6)	<b>8</b> (12,5)	K (m+w)	0,47/0,56	0,06/1	0,72/0,43	0,11/0,8
<u>Alle S,Sx+Mx</u>									
m (2N = 80)	<b>47</b> (58,8)	<b>1</b> (1,3)	<b>18</b> (22,5)	<b>14</b> (17,5)	K (m)	4,07/0,05	<b>5,08/0,04</b>	<b>5,11/0,03</b>	2,6/0,12
w (2N = 72)	<b>39</b> (54,2)	<b>5</b> (6,9)	<b>19</b> (26,4)	<b>9</b> (12,5)	K (w)	0,32/0,62	3,24/0,1	0,31/0,71	0,74/0,5
m+w (2N = 152)	<b>86</b> (56,6)	<b>6</b> (3,9)	<b>37</b> (24,3)	<b>23</b> (15,1)	K (m+w)	0,91/0,37	0,41/0,6	2,47/0,14	1,21/0,32

Tot.S = totale Spalte, Part.S = partielle Spalte, K = Kontrolle, m = männlich, w = weiblich, Sx = simplexe Familienanamnese, Mx = multiplexe Familienanamnese, 2N = Anzahl der Allele, bp = Basenpaare, **fett gedruckt** = ermittelte Anzahl des jeweiligen Allels, (in Klammern) = prozentualer Anteil innerhalb der untersuchten Gruppe

In einer zweiten Einteilung wurde neben Differenzierung der Geschlechter sowie simplerer und multiplexer Familienanamnese eine Unterteilung zwischen LK(+/-G)-Spalten und G-Spalten vorgenommen (Tabelle 4.2).

**Tabelle 4.2:**  
Häufigkeitsverteilung der Allele bei Unterscheidung zwischen LK(+/-G)- und G-Spalten sowie für Sx und Mx

Gruppe	Verteilung der Allele				Vergleichsgruppe	Chi-Quadrat/p-Wert				
	169 bp	171 bp	173 bp	175 bp		169 bp	171 bp	173 bp	175 bp	
<u>LK(+/-G), Sx</u>										
m (2N=52)	<b>30</b>	<b>1</b>	<b>13</b>	<b>8</b>	K (m)	(w)	2,76/0,12	2,79/0,15	2,73/0,14	1,28/0,28
	(57,7)	(1,9)	(25,0)	(15,4)			0,25/0,68	0,04/1	0,68/0,81	0,76/0,43
w (2N=40)	<b>21</b>	<b>1</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	K (w)		0,69/0,43	0,22/1	0,09/0,82	1,67/0,29
	(52,5)	(2,5)	(22,5)	(22,5)			0,42/0,6	1,57/0,34	2,01/0,2	2,81/0,13
m+w (2N=92)	<b>51</b>	<b>2</b>	<b>22</b>	<b>17</b>	K (m+w)					
	(55,4)	(2,2)	(23,9)	(18,5)						
<u>G, Sx</u>										
m (2N=10)	<b>8</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	K (m)	(w)	4,89/ <b>0,04</b>	0,99/1	3,21/0,09	0,01/1
	(80,0)	(0,0)	(10,0)	(10,0)			1,33/0,34	0,97/1	1,2/0,39	0,35/0,53
w (2N=22)	<b>13</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	K (w)		0,02/1	3,48/0,13	0,05/0,79	1,27/0,45
	(59,1)	(9,1)	(27,3)	(4,5)			2,23/0,18	0,03/1	1,37/0,3	0,65/0,54
m+w (2N=32)	<b>21</b>	<b>2</b>	<b>7</b>	<b>2</b>	K (m+w)					
	(65,6)	(6,3)	(21,9)	(6,3)						
<u>LK(+/-G), Mx</u>										
m (2N=14)	<b>8</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	K (m)	(w)	0,95/0,39	1,39/0,6	3,14/0,13	4,42/0,06
	(57,1)	(0,0)	(14,3)	(28,6)			0,69/0,68	3,06/0,16	0,87/0,62	1,22/0,36
w (2N=10)	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	K (w)		1,53/0,31	9,16/ <b>0,04</b>	0,12/0,71	0,08/1
	(40,0)	(20,0)	(30,0)	(10,0)			0,01/1	0,31/0,64	0,83/0,47	2,47/0,16
m+w (2N=24)	<b>12</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	K (m+w)					
	(50,0)	(8,3)	(22,7)	(22,7)						
<u>G, Mx</u>										
m (2N=2)	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	K (m)	(w)	0,037/1	0,2/1	0,11/1	0,2/1
	(50,0)	(0,0)	(50,0)	(0,0)			0/1	-	0/1	-
w (2N=2)	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	K (w)		0,09/1	0,03/1	0,64/0,45	0,3/1
	(50,0)	(0,0)	(50,0)	(0,0)			0/1	0,32/1	0,55/0,56	0,49/1
m+w (2N=4)	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	K (m+w)					
	(50,0)	(0,0)	(50,0)	(0,0)						
<u>LK(+/-G), Sx+Mx</u>										
m (2N=66)	<b>38</b>	<b>1</b>	<b>15</b>	<b>12</b>	K (m)	(w)	3,13/0,1	3,93/0,08	4,4/ <b>0,04</b>	2,76/0,15
	(57,6)	(1,5)	(22,7)	(18,2)			0,66/0,46	1,72/0,31	0,17/0,83	0/1
w (2N=50)	<b>25</b>	<b>3</b>	<b>13</b>	<b>9</b>	K (w)		1,34/0,27	2,15/0,3	0,02/1	0,55/0,46
	(50,0)	(6,0)	(26,0)	(18,0)			0,267/0,63	0,64/0,57	2,21/0,14	2,88/0,11
m+w (2N=116)	<b>63</b>	<b>4</b>	<b>28</b>	<b>21</b>	K (m+w)					
	(54,3)	(3,4)	(24,1)	(18,1)						

## Fortsetzung von Tabelle 4.2

Gruppe	Verteilung der Allele				Vergleichsgruppe	Chi-Quadrat/p-Wert			
	169 bp	171 bp	173 bp	175 bp		169 bp	171 bp	173 bp	175 bp

G, Sx+Mx									
m (2N=12)	<b>9</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	K (m)	4,23/0,07	1,19/0,59	2,21/0,2	0/1
	(75,0)	(0,0)	(16,7)	(8,3)	(w)	0,96/0,47	1,06/0,54	0,67/0,69	0,27/1
w (2N=24)	<b>14</b>	<b>2</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	K (w)	0,04/1	3,48/0,13	0,17/0,79	1,51/0,29
	(58,3)	(9,1)	(29,2)	(4,2)					
m+w (2N=36)	<b>23</b>	<b>2</b>	<b>9</b>	<b>2</b>	K (m+w)	1,9170,2	0/1	0,74/0,43	0,97/0,54
	(63,9)	(5,6)	(25,0)	(5,6)					

LK(+/-G) = Lippenkieferspalte mit/ohne Gaumenspalte, G = isolierte Gaumenspalte, K = Kontrolle, m = männlich, w = weiblich, Sx = simplexe Familienanamnese, Mx = multiplexe Familienanamnese, 2N = Anzahl der Allele, bp = Basenpaare, **fett gedruckt** = ermittelte Anzahl des jeweiligen Allels, (in Klammern) = prozentualer Anteil innerhalb der untersuchten Gruppe

In Tabelle 4.3 ist die Häufigkeitsverteilung der Allele getrennt nach Geschlecht für die Kontrollgruppe dargestellt.

**Tabelle 4.3 Häufigkeitsverteilung der Allele bei der Kontrollgruppe**

Gruppe	Verteilung der Allele				Vergleichsgruppe	Chi-Quadrat/p-Wert			
	169 bp	171 bp	173 bp	175 bp		169 bp	171 bp	173 bp	175 bp
Kontrolle									
m (2N=88)	<b>38</b>	<b>8</b>	<b>34</b>	<b>8</b>	K (w)	4,91/ <b>0,03</b>	4,75/ <b>0,04</b>	3,47/0,07	0,69/0,46
	(43,2)	(9,1)	(38,6)	(9,1)					
w (2N=76)	<b>46</b>	<b>1</b>	<b>19</b>	<b>10</b>	-	-	-	-	-
	(60,5)	(1,3)	(25,0)	(13,2)					
m+w (2N=164)	<b>84</b>	<b>9</b>	<b>53</b>	<b>18</b>	-	-	-	-	-
	(51,2)	(5,5)	(32,2)	(11,0)					

K = Kontrolle, m = männlich, w = weiblich, 2N = Anzahl der Allele, bp = Basenpaare, **fett gedruckt** = ermittelte Anzahl des jeweiligen Allels, (in Klammern) = prozentualer Anteil innerhalb der untersuchten Gruppe

Basierend auf den o. g. Einteilungen wurden alle Spaltträger mit allen männlichen bzw. weiblichen Kontrollpersonen bezüglich der Allelhäufigkeiten verglichen. Weiterhin wurde ein Vergleich zwischen den männlichen und weiblichen Probanden innerhalb der Spaltträger- bzw. Kontrollgruppe angestellt, um auch hier einen ggf. vorhandenen Unterschied der Allelhäufigkeitsverteilung zwischen beiden Geschlechtern der jeweiligen Gruppe zu ermitteln.

Das Allel 169 bp ist bei Betrachtung der gesamten Spaltträgergruppe mit 56,6 % am häufigsten vertreten. Dann folgt Allel 173 bp mit 24,3 %. Die Allele 171 bp und 175 bp sind

bei 3,9 % bzw. 15,1 % der untersuchten Spaltträger nachweisbar. Bei der Kontrollgruppe kommt Allel 169 bp mit 51,2 % ebenfalls am häufigsten vor, gefolgt von Allel 173 bp mit 32,3 %, Allel 175 mit 11 % und Allel 171 mit 5,5 %. Es lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der gesamten Spaltträgergruppe und der gesamten Kontrollgruppe bezüglich der Allelhäufigkeitsverteilung nachweisen ( $p = 0,37; 0,6; 0,14; 0,32$ ).

Anders verhält es sich jedoch bei Untersuchung aller männlichen Spaltträger. Allel 171 bp ist hier nur mit 1,3 % vertreten, bei den männlichen Kontrollen jedoch mit 9,1 %. Es besteht somit ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,04$ ). Die prozentuale Verteilung für das Allel 173 bp beträgt bei den männlichen Spaltträgern 22,5 %, bei den Kontrollen 38,6 %. Für den p-Wert ergibt sich 0,03, das heißt auch hier besteht ein signifikanter Unterschied.

Betrachtet man die Untergruppen, lassen sich bei den männlichen Trägern einer G-Spalte mit simplexer Familienanamnese für das Allel 169 bp, bei den weiblichen Probanden mit LK(+/-G)-Spalten mit multiplexer Familienanamnese für das Allel 171 bp und bei allen männlichen Patienten mit LK(+/-G)-Spalte für das Allel 173 bp beim Vergleich mit der jeweiligen Kontrollgruppe signifikante Unterschiede in der Allelhäufigkeitsverteilung nachweisen ( $p = 0,04$ ).

Bei den Einteilungen nach totalen und partiellen Spalten lassen sich jedoch keine Unterschiede feststellen. Auch zwischen weiblichen und männlichen Spaltträgern liegt keine signifikante Abweichung vor.

Vergleicht man jedoch die weiblichen und männlichen Kontrollpersonen, ist das Allel 171 bp bei den männlichen Kontrollen achtmal (9,1 %), bei den weiblichen Probanden hingegen nur einmal (1,3 %) vertreten. Es ergibt sich ein p-Wert von 0,03. Auch bei Allel 169 bp unterscheiden sich die Häufigkeitsverteilungen (43,2 %; bzw. 60,5 %) bei männlichen und weiblichen Kontrollen signifikant ( $p = 0,04$ ).

## **Familienbasierte Assoziationsstudie**

Wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, beteiligten sich an dieser Studie 10 Familientrios (Vater, Mutter und betroffenes Kind). Im Unterschied zur bereits beschriebenen Fall-Kontroll-Studie besteht hier die Kontrollgruppe nicht aus unverwandten

Individuen, sondern aus den von den Eltern nicht an die betroffenen Kinder weitergegebenen Allelen. Das Ergebnis ist in Tabelle 4.4 dargestellt.

**Tabelle 4.4: Ergebnis der analysierten Familientrios**

Gruppe	Anzahl der Allele				Vergleichsgruppe	Chi-Quadrat/p-Wert			
	169 bp	171 bp	173 bp	175 bp		169 bp	171 bp	173 bp	175 bp
SP (2N =20)	<b>13</b> (65)	<b>0</b> (0)	<b>4</b> (20)	<b>3</b> (15)	K	0,11/1	1,03/1	0/1	1,11/0,61
K (2N =20)	<b>14</b> (70)	<b>1</b> (5)	<b>4</b> (20)	<b>1</b> (5)	-	-	-	-	-
SP+K (2N=40)	<b>27</b> (67,5)	<b>1</b> (2,5)	<b>8</b> (20)	<b>4</b> (10)	-	-	-	-	-

SP = Spalträger, K = Kontrollen, 2N = Anzahl der Allele, bp = Basenpaare, **fett gedruckt** = ermittelte Anzahl des jeweiligen Allels, (in Klammern) = prozentualer Anteil innerhalb der untersuchten Gruppe

Tabelle 4.4 zeigt, dass keine Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung zwischen Spalten und Kontrollen bestehen. Das heißt, es wird kein bestimmtes Allel gehäuft von den Eltern an die betroffenen Kinder weitergegeben.

## 5. Diskussion

### 5.1 Die Kandidatengene

Wie in den vorangegangenen Abschnitten bereits erwähnt, handelt es sich bei MSX1 um eines von insgesamt 54 untersuchten Kandidatengenen, die für einen Zusammenhang mit LKGS-Spalten in Betracht gezogen werden.

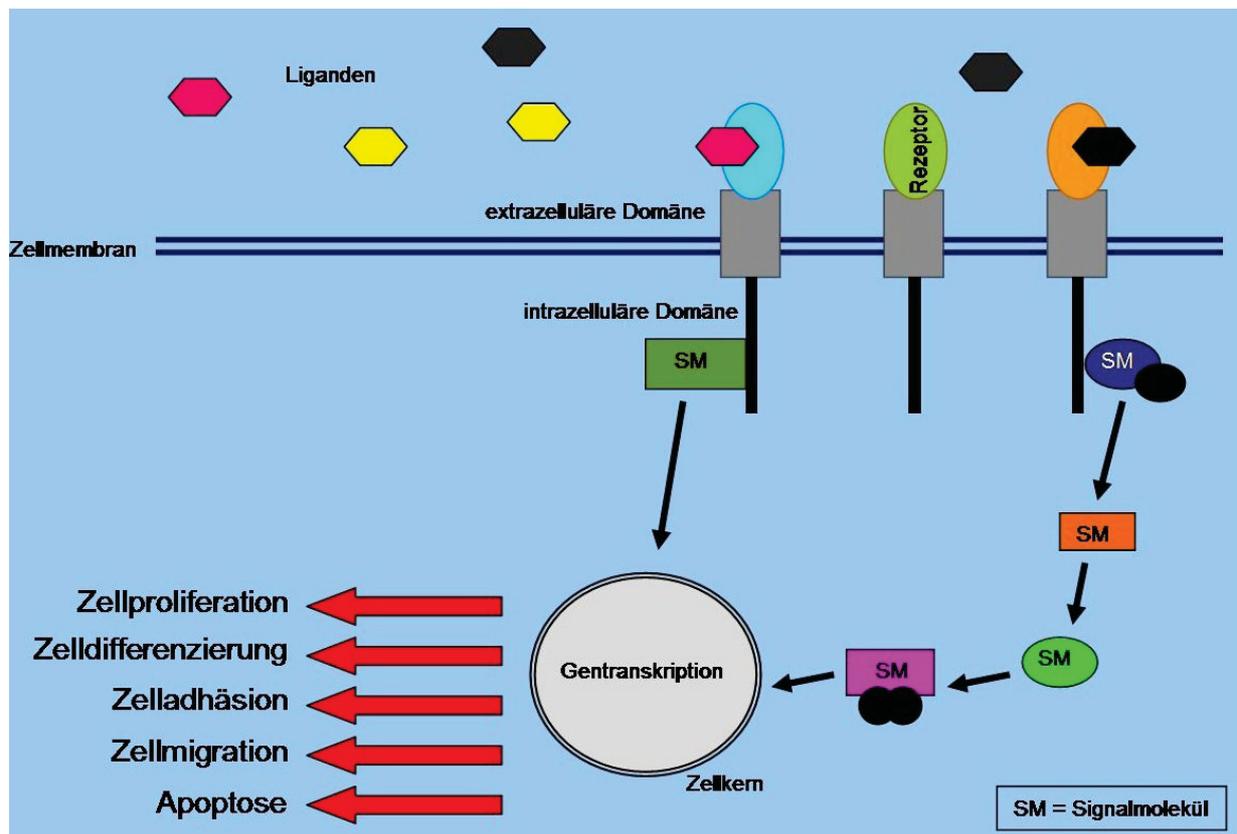
Tabelle 5.1 zeigt eine Auflistung aller bisher in der Literatur beschriebenen Kandidatengene.

**Tab. 5.1: Auflistung aller bisher beschriebenen Kandidatengene**

(Tab. wurde zur Verfügung gestellt von Dr. Michelle Schmidt, Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie / Plastische Chirurgie Jena)

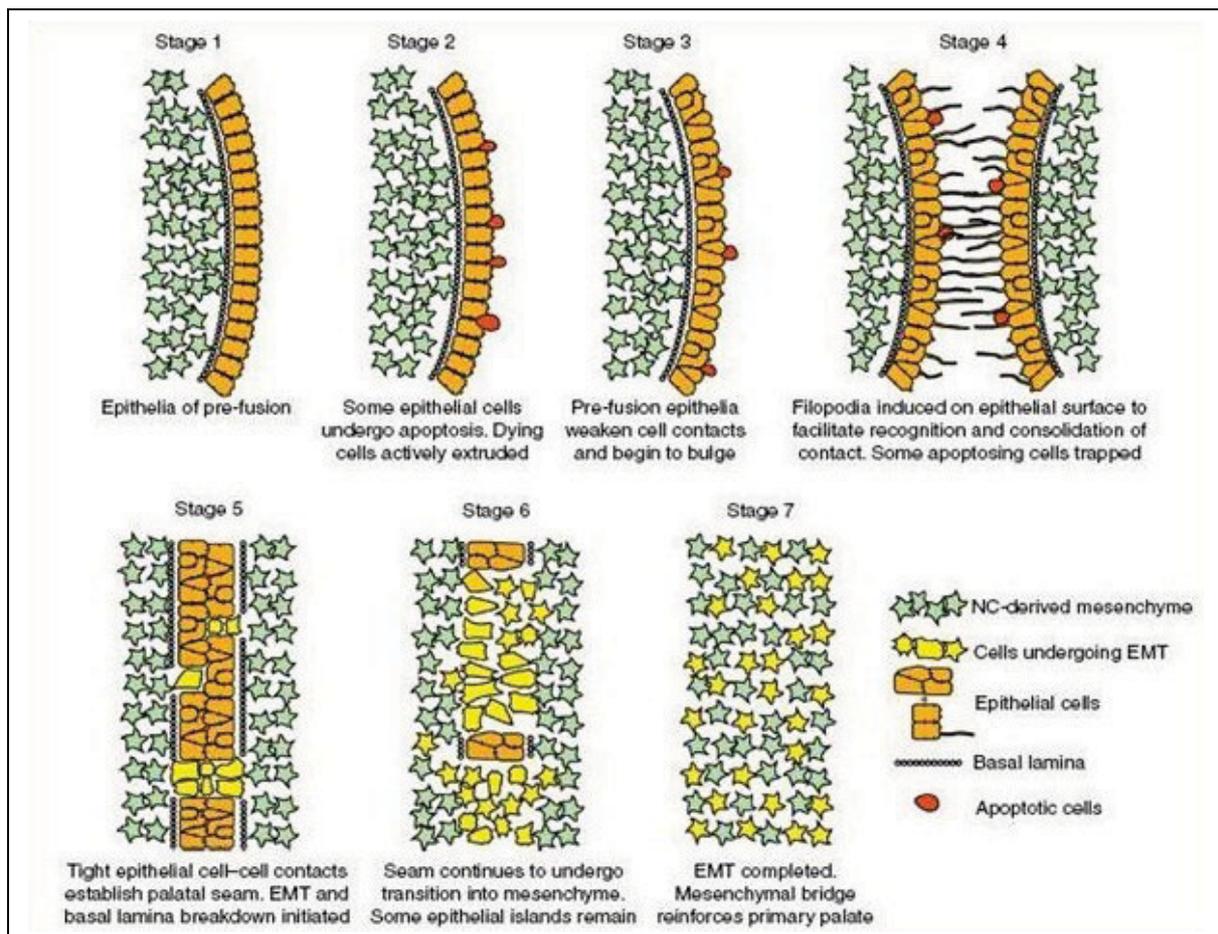
<b><u>Kandidatengen</u></b>	<b><u>Lokalisation</u></b>	<b><u>Kandidatengen</u></b>	<b><u>Lokalisation</u></b>
ABL1	9q34.1	EGFR	7p12
APOC2		EN2	7q36
BCL2	18q21.3	ER	6q24.27
BCL3	19q13.1	F13A	6p25.24
CMYC	8q24.12	GABRB3	15q11.2 - q12
COL2A1	12q12-q13.2	GATA185H	
COL9A1	16q	GRL	5q11.13
COL11A1	1p21	HOX2B	17q21-2
COL11A2	6p21.2	HOX2F	17q21-22
CRTL1	5q15-14	HOX2G	17q21-22
CRTM	1p35	HRAS	11p
DLX2		HXB	9q32-34
D2S443	2p13	IGF2	11p
D4S175	4q31	MSX1 (HOX7)	4p16.1-16.3
D4S192	4q31	MSX2 (HOX8)	5q35
D4S194	4q31	MTHFR	
D6S89	6p23	OFC1	6p24.3
D6S105	6p	OFC2	2p13 - p14
D6S109	6p	PVRL1	11q.23
D14S61		RARA	17q21.1
D17S250		TCTE	6p
D17S579	17q21	TGF $\alpha$	2p13
D19S49		TGF $\beta$ 1	19q13.1
D19S178	19q	TGF $\beta$ 2	1q41
D19S574	19q	TGF $\beta$ 3	14q24
EDN1		VIM	10p13
EGF	4q25	YAC	6p24.3

Bei dieser langen Liste stellt sich natürlich die Frage nach Gemeinsamkeiten der aufgezeigten Gene. Allgemein ist zu sagen, dass die aufgelisteten Kandidatengene als Liganden entweder direkt oder auch über Signalkaskaden ein weites Spektrum zellulärer Funktionen wie Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Zelladhäsion, Zellmigration, aber auch Apoptosevorgänge, regulieren (Abb. 5.1).



**Abb. 5.1:**  
**Schematische Darstellung direkter und indirekter Ligandenfunktionen**  
 (Abb. wurde zur Verfügung gestellt von Dr. Michelle Schmidt, Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie/ Plastische Chirurgie Jena)

Dies sind Faktoren, die u. a. im Rahmen der Gesichtsentwicklung die Ausbildung und anschließende Auflösung der Hochstetter'schen Epithelmauer und damit im entsprechenden Embryonalstadium die Fusionsvorgänge der entsprechenden Gesichtsfortsätze bedingen (Abb. 5.2).



**Abb. 5.2:**

**Entstehung und Auflösung der Hochstetter'schen Epithelmauer**

(Cox TC. Taking it to the max: The genetic and developmental mechanisms coordinating midfacial morphogenesis and dysmorphology. Clin.Genet. 2004; 65: 163-176)

## 5.2 Klassische Fall-Kontroll-Studie und familienbasierte Assoziationsstudie: Vor- und Nachteile

Für die vorliegende Arbeit entschieden wir uns, zusätzlich zu einer klassischen Fall-Kontroll-Studie mit unverwandten Probanden, eine familienbasierte Assoziationsstudie durchzuführen. Der Vorteil dieser Studienvariante besteht darin, dass Patienten und Kontrollen einer genetisch einheitlichen Population entstammen. Führt man Assoziationsstudien mit Patienten und Kontrollen aus verschiedenen Populationen durch, können die einzelnen Populationen unterschiedliche Markerallele aufweisen und es können falsch positive Assoziationen entstehen.

Trotz dieses Vorteils der familienbasierten Assoziationsstudie gegenüber der klassischen Fall-Kontroll-Studie erwies sich ihre Durchführung als schwierig, da die benötigten Probanden (Vater, Mutter und betroffenes Kind) während des Zeitraumes nur in äußerst geringer Zahl vorhanden waren. Die Gründe hierfür lagen darin, dass die Spaltträgergruppe einerseits aus erwachsenen Patienten bestand, die ohne ihre Eltern in der Spaltträgersprechstunde bzw. zur stationären Aufnahme in der Klinik erschienen. Bei den restlichen Patienten war es aufgrund einer vorliegenden Scheidungs- bzw. Trennungssituation oder Berufstätigkeit eines Elternteils meistens nicht möglich, von beiden Eltern DNA-Proben zu gewinnen. Häufig handelte es sich auch um Adoptiv- bzw. Pflegekinder oder Patienten mit unbekannter Vaterschaft. Zudem wurden für die Studie keine entsprechenden Tests (z. B. Vaterschaftstest), die eine biologische Familienschaft beweisen, durchgeführt.

### 5.3 Anzahl und Basenpaarlänge der ermittelten Allele

*Padanilam et al.* berichteten 1992 erstmals über die Identifizierung und Charakterisierung eines CA-Dinucleotid-Repeats in einem nichtkodierenden DNA-Abschnitt. Die Erstellung spezieller Primer ermöglichte eine Amplifikation der entsprechenden DNA-Abschnitte. Durch Genotypisierung des CA-Dinucleotid-Repeats konnten vier verschiedene Allele nachgewiesen werden, die sich um jeweils zwei Basenpaare unterschieden: 169, 171, 173 und 175 bp. In den nachfolgenden Jahren führten verschiedene Arbeitsgruppen zahlreiche Studien (Kopplungs-, Assoziations- und Mutationsanalysen) bezüglich der Häufigkeitsverteilung der vier von *Padanilam et al. (1992)* beschriebenen Allele durch. In einigen Analysen wurde die Häufigkeitsverteilung dieser Allele bei Spaltträgern und gesunden Kontrollpersonen dargestellt (*Blanco et al. 1998, 2001, 2004*). Tritt ein Allel bei der Spaltträgergruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe gehäuft bzw. weniger gehäuft auf, könnte auf eine Mitbeteiligung dieses Allels bei der Spaltbildung geschlossen werden. *Blanco et al. (1998, 2001)* konnten in zwei ihrer Studien signifikante Unterschiede zwischen Spaltträgern und Kontrollen aufzeigen. In diesen Analysen stimmten die ermittelten Basenpaarlängen mit denen von *Padanilam et al. (1992)* überein (169, 171, 173, 175 bp). Basierend auf diesen Untersuchungen entschieden sich *Schmidt et al. (2007)* erstmalig eine Assoziationsanalyse für eine deutsche Population durchzuführen. Die Spaltträgerstichprobe entstammte dem Krankengut der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der

---

Friedrich-Schiller-Universität Jena. Es handelte sich um eine klassische Fall-Kontroll-Studie, in der zunächst die Allelzahl des Ca-Dinucleotid-Repeats ermittelt wurde. Anschließend wurde nach Bestimmung der Allelverteilung untersucht, ob signifikante Unterschiede in der Allelhäufigkeitsverteilung zwischen Spaltträgern und gesunden Kontrollpersonen vorliegen. Die Analyse ergab ebenfalls vier verschiedene Allele, anstatt der oben beschriebenen Basenpaarlängen von 169, 171, 173 und 175 resultierten jedoch Basenpaarlängen von 171, 173, 175 und 177.

In der vorliegenden Studie konnten, wie zuvor von *Padanilam et al. (1992)* beschrieben, vier verschiedene Allele mit den Basenpaarlängen 169, 171, 173 und 175 ermittelt werden. Das Ergebnis von *Schmidt et al. (2007)* konnte somit nicht reproduziert werden.

Ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse könnten systematische Fehler, wie z.B. Eich- und /oder Funktionsfehler der Analysegeräte sein. Dies ist jedoch wenig wahrscheinlich, da beide Analysen im Genlabor des rechtsmedizinischen Instituts der FSU Jena stattfanden. Dort werden die Geräte regelmäßig kontrolliert und neu geeicht.

Weiterhin entstammten die Probanden beider Studien derselben Population. Es wurden ausschließlich deutsche Spaltträger und Kontrollpersonen untersucht, die aus Thüringen, Sachsen, Sachsen-Anhalt und Hessen stammten. Die oben beschriebenen Populationseffekte sind also auszuschließen. Außerdem ist anzumerken, dass sowohl *Padanilam et al. (1992)* als auch *Blanco et al. (1998, 2001, 2004)* die gleichen Basenpaarlängen erzielten wie die vorliegende Analyse, obwohl ihre Stichproben aus den USA bzw. aus Chile stammten.

Sowohl *Schmidt et al. (2007)* als auch wir führten Amplifikation und Fragmentlängenanalyse nach dem Protokoll von *Padanilam et al. (1992)* durch. *Schmidt et al. (2007)* verwendeten für die Fragmentlängenanalyse allerdings den ABI PRISM 310, während für unsere Analyse das Nachfolgegerät ABI PRISM 3130 benutzt wurde. Möglicherweise könnte hier die Ursache für die divergierenden Ergebnisse liegen, die Wahrscheinlichkeit ist jedoch gering.

In der vorliegenden Studie wurden die Proben mehrmals den oben beschriebenen Untersuchungen unterzogen, wobei sich immer die selben Basenpaarlängen von 169, 171, 173 und 175 ergaben. Auch die Proben von *Schmidt et al. (2007)* wurden in einem Zeitraum von elf Monaten mehrfach untersucht, die anfangs bestimmten Basenpaarlängen von 171, 173, 175 und 177 änderten sich nicht.

Als weitere Fehlerquelle sind fehlerhafte Primer in Betracht zu ziehen. In der vorliegenden Arbeit wurden wie zuvor bei *Schmidt et al. (2007)* Primer der Firma QIAGEN (Hilden, Deutschland) verwendet, diese entsprachen den von *Padanilam et al. (1992)* beschriebenen Primern (vorwärts 5'-GGGCATGTTGATGTCTGCTGAC-3' und rückwärts 5'-

---

TTAGATTGTCATCAGTCCTC-3'). Durch die von uns durchgeführte Sequenzanalyse der zu den Primern komplementären DNA-Abschnitten können indirekt Fehler in der Basenabfolge der verwendeten Primer ausgeschlossen werden.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass aufgrund der Übereinstimmung der hier ermittelten Basenpaarlängen mit den Ergebnissen der Erstbeschreiber *Padanilam et al. (1992)* und nachfolgender Studien davon auszugehen ist, dass es sich hierbei um die tatsächlich vorliegenden Basenpaarlängen handelt. Vor dem Hintergrund, dass die Studienbedingungen bei *Schmidt et al. (2007)*, abgesehen vom Analysegerät, analog zu denen der vorliegenden Arbeit waren, scheint ein systematischer Fehler bei *Schmidt et al. (2007)* unwahrscheinlich, lässt sich jedoch nicht sicher ausschließen.

#### 5.4 Häufigkeitsverteilung der ermittelten Allele

In der vorliegenden Arbeit wurden 76 nicht miteinander verwandte Spaltträger (m = 40, w = 36) und 82 gesunde, ebenfalls nicht miteinander verwandte Kontrollpersonen (m = 44, w = 38) untersucht. Beim Vergleich der gesamten männlichen Spaltträger mit den männlichen Kontrollen ergaben sich für die Allele 171 und 173 bp signifikante Unterschiede in der Allelhäufigkeitsverteilung ( $p = 0,04$  bzw.  $0,03$ ). Allel 171 bp war bei der Spaltträgergruppe nur einmal (1,3 %), in der Kontrollgruppe dagegen achtmal (9,1 %) vertreten. Allel 173 bp kam in der Kontrollgruppe fast doppelt so häufig vor (34 mal, 38,6 %) wie in der Spaltträgergruppe (18 mal, 22,5 %).

In einer von *Blanco et al. 1998* durchgeführten Analyse wurden 73 Probanden mit einer nichtsyndromalen LKGS-Spalte 77 nichtverwandten Kontrollpersonen gegenübergestellt. Zusätzlich wurden in dieser Studie 127 gesunde Verwandte der Spaltträger untersucht. Beim Vergleich der männlichen Spaltträger (multiplexe Familienanamnese) mit den männlichen Kontrollpersonen konnten von den vier ermittelten Allelen (169 bp, 171bp, 173 bp und 175 bp) bei zwei Allelen signifikante Unterschiede festgestellt werden, es handelte sich ebenfalls um das Allel 173 bp sowie um das Allel 169 bp. Weiterhin bestand bei diesen Allelen zwischen den gesunden männlichen Verwandten der Spaltträger und den männlichen Kontrollen eine statistische Signifikanz. Stellte man die weiblichen Kontrollpersonen den gesunden weiblichen Verwandten gegenüber, ergab sich für die Allele 169 bp und 175 bp ein signifikanter Unterschied in der Allelhäufigkeitsverteilung.

---

2001 veröffentlichten *Blanco et al.* eine weitere Studie, in der sie wiederum 73 Patienten mit einer nichtsyndrom-assoziierten LKGS-Spalte und 77 gesunde Kontrollpersonen untersuchten. Auch hier zeigten sich signifikante Unterschiede in der Verteilung des Allels 173 bp, die bei Gegenüberstellung der männlichen Spaltpatienten mit multiplexer Familienanamnese und der männlichen Kontrollen besonders deutlich hervortraten.

In der vorliegenden Studie kamen in noch zwei weiteren Untergruppen mit männlichen Probanden statistische Signifikanzen vor, es handelte sich zum einen um Gaumenspaltpatienten mit simplexer Familienanamnese (Allel 169 bp), zum anderen um Träger einer LK(+/-G)-Spalte (Allel 173 bp). Im Vergleich zur männlichen Kontrollgruppe ließ sich in beiden Fällen ein Unterschied in der Häufigkeitsverteilung der entsprechenden Allele nachweisen.

Für die gesamten weiblichen Patienten konnte in Bezug auf die weibliche Kontrollgruppe kein statistisch signifikantes Ergebnis erzielt werden. Bei den weiblichen Probanden konnte nur in einer Untergruppe ein Unterschied in der Häufigkeitsverteilung nachgewiesen werden. Es handelte sich hierbei um Trägerinnen einer LK(+/-G)-Spalte. Verglichen mit den weiblichen Kontrollen ergab sich hier für das Allel 171 bp ein Wert von 0,04.

In der zuvor erläuterten Studie von *Schmidt et al. (2007)* konnte von den vier ermittelten Allelen (171 bp, 173 bp, 175 bp und 177 bp) weder für das Allel 171 bp noch für das Allel 173 bp in einer der Untergruppen ein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Spaltträgern und den Kontrollen bezüglich der Allelhäufigkeitsverteilung festgestellt werden. Lediglich für das Allel 175 bp konnte in einer Untergruppe statistische Signifikanz nachgewiesen werden, allerdings handelte es sich um den Vergleich von männlichen und weiblichen Spaltträgern.

In der vorliegenden Studie konnte für das Allel 175 bp in keiner Untergruppe ein Häufigkeitsunterschied bezüglich der Allelverteilung festgestellt werden. Da das von *Schmidt et al. (2007)* beschriebene Allel 177 bp in unserer Arbeit nicht ermittelt wurde, kann für dieses Markerallel auch keine Ergebnisdiskussion erfolgen.

Weiterhin konnte in unserer Arbeit auch innerhalb der Kontrollgruppe ein signifikanter Unterschied aufgezeigt werden. Für die Allele 169 bp und 171 bp wurde ein p-Wert von 0,03 bzw. 0,04 bestimmt. Weder bei *Schmidt et al. (2007)* noch bei anderen Assoziationsanalysen konnte über eine Abweichung zwischen weiblichen und männlichen Kontrollen berichtet werden. Da aber diese Studien eine relativ kleine Anzahl von Probanden umfassen (hier 82 Kontrollen), könnte die hier ermittelte Abweichung zufälligen Ursprungs sein.

Bei Untersuchung der 10 Familientrios konnte kein signifikanter Unterschied in der Allelhäufigkeitsverteilung bestimmt werden. Allerdings stellt sich die Frage, ob dieses Ergebnis aufgrund der äußerst geringen Probandenzahl von entscheidender Bedeutung ist. Familienbasierte Assoziationsstudien, bei denen ein positives Ergebnis zu verzeichnen ist, umfassten eine wesentlich größere Anzahl von Probanden, wie z.B. *Fallin et al. (2003)*, an deren Studie sich 206 Patienten beteiligten oder *Wu et al. (2007)*, deren Studie 129 Familientrios umfasste.

In Tabelle 5.2 sind alle Kandidatengenstudien im Zeitraum zwischen 1995 und 2010 zusammengefasst, in denen ein Zusammenhang zwischen nicht-syndromassoziierten LKGS-Spalten und MSX1 untersucht wurde. Es konnte kein einheitliches Ergebnis beschrieben werden.

**Tabelle 5.2:**

**Kandidatengenstudien zu MSX1 im Zeitraum zwischen 1995 und 2010**

<u>Lokalisation</u>	<u>Autor</u>	<u>Jahr</u>	<u>Population</u>	<u>Studiendesign</u>			
				<u>Kopplung</u>	<u>Fall-Kontroll</u>	<u>Familientrios</u>	<u>Mutation</u>
4p16.1 – 16.3	Stein et al.	1995	USA,England	(-)			
	Lidral et al.	1997	Philippinen		(-)		
	Blanco et al.	1998	Chile		(-)		
	Blanco et al.	1998	Chile		(+)		
	Hwang et al.	1998	USA		(-)		
	Lidral et al.	1998	USA	(+)			(+)
	Romitti et al.	1999	USA		(+)		
	Beaty et al.	2001	USA		(+)		
	Blanco et al.	2001	Chile		(+)		
	Mitchell et al.	2001	Dänemark		(-)		
	Beaty et al.	2002	USA	(+)		(+)	
	Hecht et al.	2002	diverse		(-)		
	Marazita et al.	2002	China	(-)		(-)	
	Scapoli et al.	2002	Italien	(-)		(-)	
	Fallin et al.	2003	USA			(+)	
	Jezewski et al.	2003	diverse				(+)
	Jugessur et al.	2003	Norwegen			(+)	
	Koilinen et al.	2003	Finnland	(+)		(+)	
	Vieira et al.	2003	Südamerika			(+)	
	Blanco et al.	2004	Chile		(-)		

Fortsetzung von Tabelle 5.2

<u>Lokalisation</u>	<u>Autor</u>	<u>Jahr</u>	<u>Population</u>	<u>Studiendesign</u>			
				<u>Kopplung</u>	<u>Fall-Kontroll</u>	<u>Familientrios</u>	<u>Mutation</u>
4p16.1 – 16.3	Field et al.	2004	Indien	(-)		(-)	
	Suazo et al.	2004	Chile		(+)		
	Suzuki et al.	2004	Vietnam			(+)	(+)
	Vieira et al.	2004	Chile				(+)
	Vieira et al.	2005	USA				(+)
	Lace et al.	2006	Lettland				(+)
	Modesto et al.	2006	USA				(+)
	Tongkopetch et al.	2006	Thailand				(+)
	Otero et al.	2007	Kolumbien		(+)		
	Park et al.	2007	Korea		(+)		
	Schmidt et al.	2007	Deutschland		(+)		
	van den Boogaard	2007	diverse		(+)	(+)	
	Wu et al.	2007	China			(+)	
	Zhang et al.	2008	China				(-)
	Ingersoll et al.	2010	diverse		(+)	(+)	

(+) = signifikante Ergebnisse

(-) = keine signifikanten Ergebnisse

## 5.5 Schlussfolgerung

An der Aufklärung der kausalen Genese der LKGS-Spalten versuchten sich bisher weltweit zahlreiche Forschungsgruppen. Einigen davon ist es gelungen, signifikante Ergebnisse zu erzielen, jedoch weichen diese zum Teil sehr stark voneinander ab. Zur eindeutigen Klärung der Entstehungsursache von LKGS-Spalten reichten sie nicht aus. Für die Divergenzen der einzelnen Ergebnisse werden unter anderem Populationseffekte verantwortlich gemacht, jedoch sind auch bei Studien, die in derselben Population durchgeführt wurden, die Ergebnisse nicht einheitlich. Als Beispiel ist die vorliegende Studie zu nennen. Das Ergebnis von *Schmidt et al. (2007)* konnte nicht reproduziert werden, obwohl beide Analysen in derselben Population durchgeführt wurden. In der vorliegenden Studie gelang es, die Anzahl und Basenpaarlängen der Allele der Erstbeschreiber *Padanilam et al. (1992)* zu reproduzieren. Das Ergebnis von *Schmidt et al. (2007)* konnte, wie schon erwähnt, nicht nachvollzogen werden. Ob damals gegebenenfalls ein systematischer Fehler vorlag, lässt sich nicht mit Sicherheit sagen. Um diese Frage zu beantworten, müssten die damaligen Proben nochmals untersucht werden.

Die in der vorliegenden Analyse ermittelten Abweichungen in den Allelhäufigkeitsverteilungen könnten tatsächlich ein Hinweis auf eine Rolle von MSX1 in der

Spaltgenese sein. Besonders gilt dies für die männlichen Spaltträger, bei denen auch in vorherigen Studien vor allem für das Allel 173 bp signifikante Ergebnisse erzielt wurden.

Da sich die hier aufgeführten Analysen jedoch alleinig auf MSX1 als Untersuchungsgegenstand stützten, sind weiterführende Untersuchungen für eine vollständige Aufklärung notwendig. Sinnhafte Ansätze für zukünftige Studien sind Stichprobenpooling, Paralleluntersuchungen mehrerer Gene mit Beleuchtung von Gen-Umwelt- und Gen-Gen-Interaktionen sowie Anwendung verschiedener sich ergänzender Methoden.

## 6. Literaturverzeichnis

**Andrä A, Neumann HJ.**

Lippen-Kiefer-Gaumenspalten: Entstehung – Klinik – Behandlungskonzepte.  
Einhorn-Press Verlag GmbH, Reinbek 1996

**Baume LJ.**

Die Entwicklungsmechanik des Mittelgesichts aus embryogenetischer Sicht.  
Deutsche Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, 1962.

**Beaty TH, Hetmanski JB, Zeiger JS, Fan YT, Liang KY, VanderKolk CA, McIntosh I.**

Testing candidate genes for non-syndromic oral clefts using a case parent trio design.  
Genet.Epidemiol. 2002 Jan; 22 (1):1-11.

**Beaty TH, Wang H, Hetmanski JB, FanYT, Zeiger JS, Liang KY, Chiu YF, Vanderkolk CA, Seifert KC, Wulfsberg EA, Raymond G, Panny SR, McIntosh I.**

A case-control study of nonsyndromic oral clefts in Maryland.  
Ann. Epidemiol. 2001 Aug; 11 (6): 434-442

**Bei M, Kratochwil K, Maas RL.**

BMP4 rescues a non-cell autonomous function of Msx1 in tooth development.  
Development. 2000 Nov; 127 (21): 4711-8.

**Blanco R, Suazo J, Santos JL, Carreno H, Palomino H, Jara L.**

No evidence for linkage and association between 4q microsatellite markers and nonsyndromic cleft lip and palate in Chilean case-parent trios.  
Cleft Palate Craniofac J. 2005 May; 42 (3): 267-71.

**Blanco R, Suazo J, Santos LJ, Paredes M, Sung H, Carreno H, Jara L.**

Association between 10 microsatellite markers and non syndromic cleft lip palate in the Chilean population.  
Cleft Palate Craniofac J. 2004 Mar; 41 (2): 163-167

**Blanco R, Chakraborty R, Barton SA, Carreno H, Paredes M, Jara L, Palomino H, Schull WJ.**

Evidence of a sex-dependent association between the MSX1 locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Chilean population.

Hum Biol. 2001 Feb; 73 (1): 81-89.

**Blanco R, Jara L, Villaseca MC.**

Genetic variation of MSX1 has a sexual dimorphism in non syndromic cleft palate in the Chilean population.

Rev. Med. Chil. 1998 Jun; 126 (6): 637-645.

**Blanco R, Jara LS, Villaseca MCG.**

Association between the genetic variation of MSX1(Hox-7) and non syndromic cleft lip palate in Chilean subjects.

Rev. Med. Chile 1998; 126: 637-645.

**Bortz J.**

Statistik: Für Human-und Sozialwissenschaftler.

Springer Verlag Berlin, 2005.

**Carmichael SL, Shaw GM, Yang W, Lammer EJ, Zhu H, Finnell RH.**

Limb deficiency defects, MSX1, and exposure to tobacco smoke.

Am J Med Genet A. 2004 Mar 15; 125 A (3): 285-9.

**Carter TC, Molloy AM, Panginilinan F, Troendle JF, Kirke PN, Conley MR, Orr DJ, Earley M, Mc Kiernan E, Lynn EC, Doyle A, Scott JM, Brody LC, Mills JL.**

Testing reported associations of genetic risk factors for oral clefts in a large Irish study population.

Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2010 Feb; 88 (2): 84-93.

**Cox TC.**

Taking it to the max : The genetic and developmental mechanisms coordinatng midfacial morphogenesis and dysmorphology.

Clin. Genet. 2004; 65:163-176.

**Fallin MD, Hetmanski JB, Park J, Scott AF, Ingersoll R, Fuernkranz, McIntosh I, Beaty TH.**

Family-based analysis of MSX1 haplotypes for association with oral clefts.  
Genet. Epidemiol. 2003 Sep; 25 (2): 168-175.

**Field LL, Ray AK, Cooper ME, Goldstein T, Shaw DF, Marazita ML.**

Genome scan for loci involved in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in families from West Bengal, India.  
Am J Med Genet A. 2004 Oct 15; 130A (3): 265-71.

**Fogh-Andersen P (1942).**

Inheritance of harelip and cleft palate.  
Arnold Busck Co., Copenhagen.

**Fujiwara K, Yamada T, Mishima K, Imura H, Suaghara T.**

Morphological and immunohistochemical studies on cleft palates induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in mice.  
Congenit Anom (Kyoto) 2006 jun; 48 (2): 68-73.

**Gehring WJ.**

Exploring the homeobox.  
Gene 1993; 135:215-221.

**Hecht JT, Mulliken JB, Blanton SH.**

Evidence for a cleft palate only locus on chromosome 4 near MSX1.  
Am J Med Genet. 2002 Jul 15; 110 (4): 406-407.

**Houzelstein D, Cohen A, Buckingham ME, Robert B.**

Insertional mutation of the mouse MSX1 homeobox gene by an nlacZ reporter gene.  
Mech Dev. 1997 Jul; 65 (1-2): 123-133.

**Hwang SJ, Beaty TH, McIntosh I, Hefferson T, Panny S.**

Association between homeobox-containing gene MSX1 and the occurrence of limb deficiency.

Am J Med Genet. 1998; 75: 419-423.

**Ichikawa E, Watanabe A, Nakano Y, Akita S, Hirano A, Kinoshita A, Kondo S, Kishino T, Uchiyama T, Niikawa N, Yoshiura K,**

PAX 9 and TGFB3 are linked to susceptibility to nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Japanese: population-based and family-based candidate gene analysis.

J Hum Genet. 2006; 51 (1): 38-46 , Epub 2005 Oct 25.

**Ingersoll RG, Hetmanski J, Park JW, Fallin MD, McIntosh I, Wu-Chou YH, Chen PK, Yeow V, Chong SS, Cheah F, Sull JW, Jee SH, Wang H, Wu T, Murray T, Huang S, Ye X, Jabs EW, Redett R, Raymond G, Scott AF, Beaty TH.**

Association between genes on chromosome 4p16 and nonsyndromic oral clefts in four populations.

Eur J Hum Genet. 2010 Jun; 726-32. Epub 2010 Jan 20.

**Jara L, Blanco R, Chiffelle I, Palomino H, Carreno H.**

Association between alleles of the transforming growth factor alpha locus and cleft lip and palate in the Chilean population.

Am J Med Genet. 1995; 57: 548-551.

**Jezewski PA, Vieira AR, Nishimura C, Ludwig B, Johnson M, O'Brian, Daack-Hirsch S, Schultz RE, Weber A, Nepomucena B, Romitti PA, Christensen K, Orioli IM, Castilla EE, Machida J, Natsume N, Murray JC.**

Complete sequencing shows a role for MSX1 in non-syndromic cleft lip and palate.

J Med Genet. 2003 Jun; 40 (6): 399-407.

**Jugessur A, Lie PT, Wilcox AJ, Murray JC, Taylor JA, Saugstad OD, Vindenes HA, Abyholm F.**

Variants of developmental genes (TGFA, TGFB and MSX1) and their associations with orofacial clefts: A case-parent triad analysis.

Genet.Epidemiol. 2003 Apr; 24 (3): 230-239.

**Koch J.**

Zur Diagnostik der Lippen-, Kiefer- und Gaumenspalten.

Dtsch Stomatol 1963; 13: 660.

**Koilinen H, Ollikainen V, Rautio J, Hukki J, Kere J.**

Linkage and linkage disequilibrium searched for between non-syndromic cleft palate and four candidate loci.

J Med. Genet. 2003; 40: 464-468.

**Kriens O.**

LHASAHL – a concise documentation system for cleft lip, alveolus and palate diagnoses.

In: Kriens O (ed) What is a cleft lip and palate? A multidisciplinary update.

Workshop, Bremen 1987: Thieme Stuttgart.

**Lace B, Vasiljeva I, Dundure I, Barkane B, Akota I, Krumina A.**

Mutation analysis of the MSX1 gene exons and introns in patients with nonsyndromic cleft lip and palate.

Stomatologija. 2006; 8(1): 21-24.

**Lidral AC, Romitti PA, Basart AM, Doetschman T, Leysens NJ, Daack-Hirsch S, Semina EV, Johnson LR, Machida J, Burds A, Parnell TJ, Rubenstein JL, Murray JC.**

Association of MSX1 and TGFB3 with nonsyndromic clefting in humans.

Am J Hum Genet. 1998 Aug; 63 (2): 557-568.

**Lidral AC, Murray JC, Buetow KH, Basart AM, Schearer H, Shiang R, Naval A, Layda E, Magee K, Magee W.**

Studies of the candidate genes TGFB2, MSX1, TGFA, and TGFB3 in the etiology of cleft lip and palate in the Phillipines.

Cleft Palate Craniofac J. 1997 Jan; 34 (1): 1-6.

**Marazita ML, Field LL, Coper ME, Tobias R, Maher Bs, Peanchitlertkajorn S, Liu YE.**

Genome Scan for Loci Involved in Cleft Lip With or Without Cleft Palate, in Chinese Multiplex Families.

Am J Hum Genet 2002; 71: 349-364.

**Marazita ML, Field LI, Cooper ME, Tobias R, Maher BS, Peanchitlertkajorn S, Liu YE.**

Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in China: assessment of candidate regions.

Cleft Palate Craniofac J. 2002 Mar; 39 (2): 149-156.

**Marken J.**

Humangenetik.

Georg Thieme Verlag, 2006.

**Mitchell LE, Murray JC, O'Brien S, Christensen K.**

Evaluation of two putative susceptibility loci for oral clefts in the Danish population.

Am J Epidemiol. 2001 May 15; 153 (10): 1007-15.

**Modesto A, Moreno LM, Krahn K, King S, Lidral AC.**

MSX1 and orofacial clefting with and without tooth agenesis.

J Dent. Res. 2006 Jun; 85 (6): 542-546.

**Moore KL.**

Embryologie. Lehrbuch und Atlas der Entwicklungsgeschichte des Menschen.

Schattauer Verlag 1990.

**Morkuniene A, Steponaviciut D, Utkus A, Kucinskas V.**

Few associations of candidate genes with nonsyndromic orofacial clefts in the population in Lithuania.

J Appl Genet. 2007; 48 (1): 89-91.

**Nugent P, Greene RM.**

MSX1 gene expression and regulation in embryonic palatal tissue.

In Vitro Cell Dev Biol Anim. 1998 Nov-Dec; 34 (10): 831-5.

**Otero L, Gutierrez S, Chaves M, Vargas C, Bermudez L.**

Association of MSX1 with nonsyndromic cleft lip and palate in a Colombian population.

Cleft Palate Craniofac J. 2007 Nov; 44 (6): 653-6.

**Padanilam BJ, Stadler HS, Mills KA, McLeod LB, Solursh M, Lee B, Ramirez F, Buetow KH, Murray JC.**

Characterization of the human HOX 7 cDNA and identification of polymorphic markers.  
Hum Mol Genet. 1992; 1:407-410.

**Palomino H, Cerda-Flores RM, Blanco R, Palomino HM, Barton SA, de Andrade M, Chakraborty R.**

Complex segregation analysis of facial clefting in Chile.  
J Craniofac Genet Dev Biol. 1997 Apr-Jun; 17 (2):57-64.

**Park J, Park BY, Kim HS, Lee JE, Suh I, Nam CM, Kang DR, Kim S, Yun JE, Go EN, Jee SH, Beaty TH.**

MSX1 polymorphism associated with risk of oral cleft in Korea: evidence from case-parent trio and case-control studies.  
Yonsei Med J. 2007 Feb 28; 48 (1):101-8.

**Pezetti F, Scapoli L, Martinelli M, Carinci F, Bodo M, Carinci P, Tognon M.**

A locus in 2p13-p14 (OFC2), in addition to that mapped in 6p23, is involved in nonsyndromic familial orofacial cleft malformation.  
Genomics. 1998 Jun 15; 50 (3):299-305.

**Proetzel G, Pawlowski SG, Wiles MV, Yin M, Boivin GP, Howles PN, Ding J.**

Transforming growth factor- beta 3 is required for secondary palate fusion.  
Nature Genet. 1995; 11: 409-414.

**Romitti PA, Lidral AC, Munger RG, Daack-Hirsch S, Burns TL, Murray JC.**

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. 1999 Jan; 59 (1): 39-50.

**Sadler TW, Langman J.**

Medizinische Embryologie.  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 1998.

**Sassani R, Barlett SP, Feng H, Goldner-Sauve A, Haq AK, Buetow KH, Gasser DL.**

Association between alleles of the Transforming Growth Factor-Alpha locus and the occurrence of cleft lip.

Am J Med Genet. 1993; 45: 565-569.

**Satokata I, Maas R.**

MSX1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development.

Nat.Genet. 1994 Apr; 6 (4):348-356.

**Scapoli L, Martinelli M, Pezzetti F, Carinci F, Bodo M, Tognon M, Carinci P.**

Linkage disequilibrium between GABRB3 gene and nonsyndromic familial cleft lip with or without cleft palate.

Hum Gnet. 2002 Jan; 110 (1): 15-20.

**Schaid DJ, Sommer SS.**

Genotype relative risks: methods for design and analysis of candidate-gene association studies.

Am J Hum Genet. 1993; 5: 1114-1126.

**Schmidt M, Schultze-Mosgau S.**

Assoziationsstudie zu MSX1 bei nicht-syndromassozierten LKGS-Spalten am Jenaer Krankengut.

**Schumacher GH.**

Embryonale Entwicklung des Menschen.

Verlag Volk und Gesundheit, 1988.

**Stein J, Mulliken JB, Stal S, Gasser DL, Malcolm S, Winter R, Blanton SH, Amos C, Seemanova E, Hecht JT.**

Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: evidence of linkage to BCL3 in 17 multigenerational families.

Am J Hum Genet. 1995 Aug; 57 (2): 257-272.

**Suazo J, Santos JL, Carreno H, Jara L, Blanco R.**

Linkage disequilibrium between MSX1 and non-syndromic cleft lip/palate in the Chilean population.

J Dent Res. 2004 Oct; 63 (10): 782-5.

**Suzuki Y, Jezewski PA, Machida J, Watanabe Y, Shi M, Cooper ME, Viet LT, Tin NTD, Hai H, Natsume N, Shimozato K, Marazita ML, Murray JC.**

In a Vietnamese population, MSX1 variants contribute to cleft lip and palate.

Genetics in Medicine 2004 Jun; 6 (3): 117-125.

**Tongkobpetch S, Siriwan P, Shotelersuk V.**

MSX1 mutations contribute to nonsyndromic cleft lip in a Thai population.

J Hum Genet. 2006; 51 (8): 671-676.

**Van den Boogaard MJ, de Costa D, Krapels IP, Liu F, van Duijn C, Sinke RJ, Lindhout D, Steegers-Theunissen RP.**

The MSX1 allele 4 homozygous child exposed to smoking at periconception is most sensitive in developing nonsyndromic orofacial clefts.

Hum Genet. 2008 Dec; 124 (5): 525-34. Epub 2008 Oct 19.

**Vieira AR, Avila JR, Daack-Hirsch S, Dragan E, Felix TM, Rahimov F, Harrington J, Schultz RR, Watanabe Y, Johnson M, Fang J, Brien SE, Orioli IM, Castilla EE, FitzPatrick DR, Jiang R, Marazita ML, Murray JC.**

Medical Sequencing of Candidate Genes for Nonsyndromic Cleft Lip and Palate.

PLoS Genet. 2005 Dec; 1 (6): 651-659.

**Vieira AR, Castillo Taucher S, Aravena T, Astete C, Sanz P, Tastets ME, Monasterio L, Murray JC.**

Mutational analysis of the muscle segment homeobox gene 1 (MSX1) in Chilean patients with cleft lip/palate.

Rev Med Chil. 2004 Jul; 132 (7): 816-22.

**Vieira AR, Orioli IM, Castilla EE, Cooper ME, Marazita ML, Murray JC.**

MSX1 and TGFB3 contribute to clefting in South America.

J Dent Res. 2003 Apr; 82 (4): 289-292.

**Wu PA, Li YL, Fan GZ, Wang K.**

Association study on microsatellite polymorphisms of MSX1 gene and nonsyndromic cleft lip and palate.

Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi. 2007 Jun; 24 (3): 325-7.

**Wu PA, Li YL, Wu HJ, Wang K, Fan GZ.**

Transmission disequilibrium test for nonsyndromic cleft lip and palate and segment homeobox gene-1 gene.

Zhonghua Kou qiang Yi Xue Za Zhi. 2007 Sep; 42 (9): 561-3.

**Wyszynski DF, Beaty TH, Maestri NE.**

Genetics of nonsyndromic oral clefts revisited.

Cleft Palate Craniofac J 1996; 33: 406-417.

**Wyszynski DF, Maestri N, Lewanda AF, McIntosh I, Smith EA, Garcia-Delgado C, Vingeras-Guarneros E.**

No evidence of linkage for cleft lip with or without cleft palate to a marker near the transforming growth factor alpha locus in two populations.

Hum Hered. 1997; 47: 101-109.

**Zhang Z, Song Y, Zhao X, Zhang X, Fermin C, Chen Y.**

Rescue of cleft palate in Msx-1 deficient mice by transgenic Bmp4 reveals a network of BMP and Shh signaling in the regulation of mammalian palatogenesis.

Development. 2002 Sep; 129 (17): 4135-4146.

**Zhang Z, Zhang X, Avniel WA, Song Y, Jones SM, Jones TA, Fermin C, Chen Y.**

Malleal Processus Brevis is dispensable for normal hearing in mice.

Developmental Dynamics 2003; 227:69-77.

**Zhang L, Tang JL, Liang SZ.**

Association of muscle segment homeobox gene 1 polymorphism with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate.

Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. 2008 Jun; 26 (3):256-7, 261.

**Zhuang F, Nguyen MP, Shuler C, Liu YH.**

Analysis of MSX1 and MSX 2 transactivation function in the context of the heat shock 70 (Hspa1b) gene promoter.

Biochem Biophys Res Commun. 2009 Apr 3; 381 (2): 241-6. Epub 2009 Feb 11.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Carolin Merwarth  
Geboren am: 02.10.1982 in Heidelberg  
Familienstand: ledig  
Wohnhaft in: 68199 Mannheim, Mönchwörthstr. 43

### Schulbildung

08/1993 – 06/2002 Moll-Gymnasium Mannheim;  
Abschluss: Abitur

### Studium

10/2002 – 12/2009 Zahnmedizinstudium an der Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg sowie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
01/2010 Approbation

### Beruflicher Werdegang

seit 03/2010 Weiterbildungsassistentin in der Zahnarztpraxis Dr. Thomas  
Weber in Hochstadt (Pfalz)

---

Carolin Merwarth

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind, mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. Dr. S. Schultze-Mosgau

Dr. Michelle Schmidt

Dr. Juliane Sanft

Dipl.-Biol. Juliane Strien,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

---

Ort, Datum, Unterschrift des Verfassers

## Danksagung

Danken möchte ich allen, die durch ihre freundliche Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Insbesondere danke ich

- Herrn Prof. Dr. Dr. S. Schultze-Mosgau für die Überlassung des interessanten und aktuellen Themas, für seine fachliche Begleitung der Arbeit und die Vermittlung wichtiger Kontakte.
- Frau Dr. M. Schmidt für die Übernahme der Betreuung der Promotion, sachliche Kritik und die tatkräftige Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.
- Frau Prof. Dr. G. Mall, Frau Dr. J. Sanft und Frau J. Strien für die Durchführung der molekulargenetischen Untersuchungen im Labor des Institutes für Rechtsmedizin der FSU Jena.

Weiterhin danke ich allen Patienten und Kontrollpersonen bzw. deren Eltern für ihre Kooperation.