

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

**X-Inaktivierung bei heterozygoten Überträgerinnen
X-chromosomal gebundener Adrenoleukodystrophie**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Esther Maria Maier
aus Garmisch-Partenkirchen
2002

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. A. A. Roscher

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. A. Kretzschmar
Priv. Doz. Dr. M. Dichgans
Priv. Doz. Dr. J. Walter

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dr. med. Dr. rer. nat. A. Braun

Dekan:

Prof. Dr. med. Dr. h. c. Peter

Tag der mündlichen Prüfung:

13.06.2002

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGEN		iii
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	X-chromosomal gebundene Adrenoleukodystrophie	1
1.1.1.	Historischer Überblick	1
1.1.2.	X-chromosomal gebundene Adrenoleukodystrophie: Definition, klinische Verlaufsformen, Pathogenese, Diagnose und Therapie	1
1.1.3.	ALD-Gen und ALD-Protein	7
1.1.4.	Identifizierung heterozygoter ALD-Mutationsträgerinnen	9
1.2.	X-Inaktivierung	10
1.2.1.	Charakteristika der X-Inaktivierung	10
1.2.2.	Methoden zur Darstellung der X-Inaktivierung	13
1.2.3.	X-Inaktivierung heterozygoter ALD-Überträgerinnen	15
1.3.	Zielsetzung der Arbeit	16
2.	MATERIAL UND METHODEN	17
2.1.	Mutationsanalyse des ALD-Gens	17
2.1.1.	Extraktion genomischer DNA aus Vollblut und kultivierten Fibroblasten	17
2.1.1.1.	Durchführung	17
2.1.1.2.	Puffer-Lösungen	18
2.1.2.	Amplifikation der kodierenden Abschnitte des ALD-Gens mittels PCR	19
2.1.3.	Nicht-radioaktive Sequenzierung der ALD-Fragmente mittels <i>Cycle Sequencing</i>	21
2.2.	Untersuchung der X-Inaktivierung	23
2.2.1.	Prinzip des Androgenrezeptor-Testes	23
2.2.2.	Durchführung des Androgenrezeptor-Testes	24
2.2.2.1.	Restriktionsverdau genomischer DNA	24
2.2.2.2.	Amplifikation des polymorphen CAG-Repeats im Androgenrezeptor	25
2.2.2.3.	Fragmentanalyse	27
2.2.2.4.	Berechnung des X-Inaktivierungsverhältnisses	27
2.2.3.	Sequenzierung der Restriktionsschnittstellen	28
2.2.4.	Extraktion von mRNA aus kultivierten Fibroblasten, Reverse Transkription und Sequenzierung von cDNA-Fragmenten	29
2.2.5.	Bestimmung der Konzentration überlangkettiger Fettsäuren (VLCFA) in Plasma und Fibroblasten	30
2.2.6.	Southern Blot Analyse	30
2.3.	Etablierte Methoden	30
2.4.	Patientenkollektiv und Kontrollen	31

3.	ERGEBNISSE	32
3.1.	Mutationsanalyse des <i>ALD</i>-Gens	32
3.2.	Untersuchung der X-Inaktivierung	38
3.2.1.	Etablierung und Optimierung der Methode	38
3.2.2.	Untersuchung der X-Inaktivierung in peripheren Blutleukozyten heterozygoter <i>ALD</i> -Überträgerinnen, Nicht-Überträgerinnen aus <i>ALD</i> -Familien und Kontrollen	48
3.2.3.	Korrelation der X-Inaktivierung mit biochemischen Parametern	51
3.2.4.	X-Inaktivierung und Aktivitätszustand des mutierten <i>ALD</i> -Allels in kultivierten Fibroblasten heterozygoter <i>ALD</i> -Überträgerinnen	54
4.	DISKUSSION	56
4.1.	Mutationsanalyse des <i>ALD</i> -Gens	56
4.2.	Untersuchung der X-Inaktivierung	61
5.	ZUSAMMENFASSUNG	70
	LITERATURVERZEICHNIS	72
	DANKSAGUNG	77
	LEBENS LAUF	78
	VERÖFFENTLICHUNGEN	79

ABKÜRZUNGEN**A**

A	Adenin
ACALD	<i>Adult cerebral Adrenoleukodystrophy</i>
ADO	<i>Addison only Adrenoleukodystrophy</i>
AdolCALD	<i>Adolescent cerebral Adrenoleukodystrophy</i>
ALD	Adrenoleukodystrophie
ALDP	Adrenoleukodystrophie-Protein
AR	Androgen-Rezeptor

B

bp	Basenpaare
----	------------

C

C	Cytosin
CCALD	Childhood Cerebral ALD
cDNA	komplementäre DNA
CpG-Inseln	Cytosin-Phosphat-Guanosin-Inseln

D

deaza-dGTP	7-deaza-2'-Desoxyguanosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

E

EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
------	---------------------------

F

FAM	5-carboxy-fluorescein
-----	-----------------------

G

G	Guanin
G6PD	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GTE	Glyzerintrierukat
GTO	Glyzerintrioleat

H

HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HUMARA	<i>Human Androgen Receptor Gene-Assay</i>

I

ISD	Iduronat-2-Sulfatase
-----	----------------------

K

Kb	Kilobasen
----	-----------

M	
mRNA	messenger-RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
N	
nm	Nanometer
NO	Stickoxid
P	
4-PB	4-Phenylbutyrat
PBS	<i>Posphate-Buffered-Saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
R	
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
ROX	6-carboxy-X-rhodamin
RT-PCR	Reverse-Transkriptions-PCR
S	
SCID	<i>Severe Combined Immunodeficiency</i>
T	
T	Thymin
TAMRA	N,N,N',N'-tetramethyl-6-carboxyrhodamin
TE	Tris-EDTA
V	
VLCFA	<i>Very long chain fatty acids</i> (überlangkettige Fettsäuren)
VLCS	Very long-chain acyl-CoA-Synthetase
VNTR	<i>Variable Number Tandem Repeat</i>
W	
WAS	Wiskott-Aldrich-Syndrom
X	
X-ALD	X-chromosomal gebundene Adrenoleukodystrophie
Xic	X-Inaktivierungszentrum
Xist	<i>X inactivation specific transcript</i>
Z	
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 X-chromosomal gebundene Adrenoleukodystrophie

1.1.1. Historischer Überblick

Die X-chromosomal gebundene Adrenoleukodystrophie (X-ALD, MIM 300100) wurde erstmals 1923 beschrieben. Siemerling und Creutzfeldt berichteten von einem Jungen, der sich bis zum Alter von 4 bis 5 Jahren unauffällig entwickelt hatte und zunächst durch seine stark pigmentierte Haut auffiel. Im Alter von 6 1/2 Jahren verschlechterte sich der Zustand des Jungen rapide: er wurde verwirrt, hatte zunehmend Schwierigkeiten zu sprechen, zu schlucken und zu laufen, und es traten zerebrale Krampfanfälle auf. Er verstarb innerhalb eines halben Jahres. Bei der Obduktion des Jungen zeigte sich eine Atrophie der Nebennierenrinden und eine diffuse Sklerosierung des Gehirns. In den sechziger Jahren wurde erstmals das X-chromosomale Vererbungsmuster der Krankheit beschrieben. Michael Blaw prägte 1970 angesichts der Nebenniereninsuffizienz und des Untergangs von weißer Hirnsubstanz den Namen Adrenoleukodystrophie (ALD).

Die Beobachtung fetthaltiger Einschlußkörperchen in den Nebennierenrindenzellen der Patienten und der Nachweis, daß diese vorwiegend überlangkettige Fettsäuren (> 22:0) enthalten, bereiteten den Boden für die Erforschung der Krankheit. Die Entwicklung von Methoden zur Bestimmung der Konzentrationen überlangkettiger Fettsäuren (VLCFA = *very long chain fatty acids*) in Blut, kultivierten Fibroblasten und Amnionzellen ermöglichte eine prä- und postnatale Diagnosestellung sowie die Überwachung von Therapieansätzen. Die Identifizierung des *ALD*-Gens erfolgte 1994 durch positionelles Klonieren.

1.1.2. X-chromosomal gebundene Adrenoleukodystrophie:

Definition, klinische Verlaufsformen, Pathogenese, Diagnose und Therapie

Definition und Häufigkeit. Die X-ALD stellt eine angeborene Störung der peroxisomalen β -Oxidation von Fettsäuren dar, die zu erhöhten Konzentrationen überlangkettiger Fettsäuren in allen Körperflüssigkeiten führt. Die Akkumulation dieser Fettsäuren ist mit einer entzündlichen Demyelinisierung des ZNS, peripherer Neuropathie sowie adrenokortikaler und testikulärer Insuffizienz assoziiert. Mit einer Häufigkeit von 1:20 000 – 1:50 000 männlichen

Geburten ist die X-ALD die häufigste peroxisomale Erkrankung. Sie ist in allen ethnischen Gruppen zu finden.

Klinik und Verlaufsformen. Die X-ALD manifestiert sich in verschiedenen phänotypischen Varianten, die sich bezüglich ihrer Progressionsgeschwindigkeit, der Lokalisation innerhalb des Nervensystems, der Art der Symptomatik und des Alters, in dem die Erkrankung auftritt, unterscheiden (Moser *et al.*, 1995) (Tabelle 1). Verschiedene Verlaufsformen treten häufig auch innerhalb einer Familie auf (Berger *et al.*, 1994). Tabelle 1 zeigt eine Zusammenfassung der klinischen Verlaufsformen der X-ALD.

Klinischer Phänotyp	Relative Häufigkeit	Manifestationsalter (Jahre)*	Lokalisation innerhalb des Nervensystems	Progredienz
Kindlich zerebral	48 %	7,1 (\pm 1,7)	Großhirnhemisphären	rasch
Jugendlich zerebral	5 %	10 - 21	Großhirnhemisphären	rasch
Erwachsen zerebral	3 %	< 21	Großhirnhemisphären	rasch
Adrenomyeloneuropathie	25 %	27,6 (\pm 8,7)	Rückenmark und peripheres Nervensystem	langsam
Addison Only	10 %	-	-	-
Asymptomatisch	10 %	-	-	-

*bei Auftreten erster neurologischer Symptome

Tabelle 1: Klinische Verlaufsformen der X-ALD. (nach Moser *et al.*, 1995)

Eine häufige (48 %) und schwere klinische Verlaufsform der Erkrankung ist die kindlich-zerebrale ALD (*Childhood Cerebral ALD*, CCALD), die durch eine rasche Progredienz der neurologischen Symptomatik charakterisiert ist. Erste Symptome treten im Alter zwischen 3 und 10 Jahren auf (durchschnittliches Manifestationsalter 7,1 Jahre \pm 1,7 Jahre). Häufig werden Verhaltensauffälligkeiten, nachlassende Schulleistungen, Visusverschlechterung und ein vermindertes Hörvermögen als erste Anzeichen der Erkrankung beobachtet. Eine adrenokortikale Insuffizienz besteht zu diesem Zeitpunkt meist nicht. Die Erkrankung zeigt eine unaufhaltsame Progression. Innerhalb weniger Monate führt der Verlust sensorischer, höherer kortikaler und motorischer Funktionen zu spastischer Tetraparese, zerebralen Krampfanfällen und Demenz. Ein Großteil der Patienten verstirbt innerhalb von 3 Jahren (\pm 2 Jahre Standardabweichung) nach Diagnosestellung in einem vegetativen Stadium. Bei etwa 80 % der Patienten zeigt sich in der Magnetresonanztomographie (MRT) eine charakteristische, meist symmetrische Demyelinisierung der periventrikulären parieto-okzipitalen und temporalen weißen Hirnsubstanz und des Corpus callosum. Typischerweise wird eine okzipito-frontale Ausbreitung der Entmarkungsherde beobachtet.

Zwei weitere rasch progrediente und das ZNS betreffende phänotypische Varianten sind die zerebrale ALD des Jugendlichen (*Adolescent cerebral ALD*, AdolCALD) und die zerebrale ALD des Erwachsenen (*Adult cerebral ALD*, ACALD). Sie treten sehr selten auf (zusammen in 8 % der Fälle) und unterscheiden sich von der kindlichen Form nur durch ein späteres Manifestationsalter.

Die Adrenomyeloneuropathie (AMN) stellt mit 25 % die häufigste klinische Verlaufsform der X-ALD im Erwachsenenalter dar. Symptome treten typischerweise erst in der dritten bis vierten Lebensdekade auf (durchschnittliches Manifestationsalter 27,6 Jahre; \pm 8,7 Jahre). Im Vordergrund steht hier die Demyelinisierung des Rückenmarks und der peripheren Neurone. Die Erkrankung schreitet nur langsam fort. Innerhalb von 5 bis 10 Jahren entwickeln sich eine spastische Paraparese der Beine, Blasenentleerungsstörungen und distal-symmetrische sensible Störungen vorwiegend des Vibrationsempfindens. Im MRT wird häufig eine Atrophie des Rückenmarks beobachtet. Die kognitiven Funktionen bleiben unbeeinträchtigt. Eine unkomplizierte AMN vermindert nicht die Lebenserwartung des Patienten. Allerdings zeigen etwa 50 % der AMN-Patienten klinisch und kernspintomographisch Hinweise für eine zerebrale Beteiligung, welche eng mit einer deutlich schlechteren Prognose korreliert sind.

Etwa zwei Drittel der neurologisch betroffenen Patienten leiden an einer Nebennierenrindeninsuffizienz (M. Addison), die der neurologischen Symptomatik vorausgehen, aber auch zeitgleich oder erst im Verlauf der Erkrankung auftreten kann.

Neben den genannten klinischen Verlaufsformen werden zwei weitere phänotypische Varianten von X-ALD beobachtet. Die *Addison only* Form (ADO), die in einer isolierten Nebennierenrindeninsuffizienz besteht, sowie eine asymptomatische Form. In industrialisierten Ländern, in denen die durch Tuberkulose verursachte Nebenniereninsuffizienz nur noch sehr selten beobachtet wird, zeigen sich bei ca. 40 % der männlichen M. Addison-Patienten die biochemischen Charakteristika einer X-ALD (Sadeghi-Nejad & Senior, 1990). Patienten mit ADO sind jedoch wie asymptomatische Träger der X-ALD mit einem hohen Risiko behaftet, im späteren Verlauf neurologische Symptome zu entwickeln und müssen daher aufmerksam klinisch nachverfolgt werden.

Pathogenese. Die genauen pathogenetischen Mechanismen der X-ALD blieben bisher weitgehend ungeklärt. Es konnte gezeigt werden, daß die verminderte peroxisomale β -Oxidation, die zu einer Akkumulation von gesättigten überlangkettigen Fettsäuren führt, durch eine reduzierte Aktivität der *Very long-chain acyl-CoA-Synthetase* (VLCS) bedingt ist. Das zugrundeliegende krankheitsverursachende Gen kodiert überraschenderweise jedoch

nicht das Enzym VLCS, sondern vielmehr einen peroxisomalen Membrantransporter (ALD-Protein), dessen Funktion und Zusammenhang zur VLCS bislang nicht geklärt werden konnte. Auch die Bedeutung der erhöhten Konzentrationen von VLCFA für die Entstehung der verschiedenen Verlaufsformen der Erkrankung ist nicht vollständig geklärt. Die Nebennierenrindeninsuffizienz scheint durch eine membrandestabilisierende und damit zelltoxische Wirkung der VLCFA verursacht zu sein. Der Schädigung des Myelins liegen allerdings weitaus komplexere Mechanismen zugrunde. Bei den schweren, zerebralen Verlaufsformen der X-ALD werden akut entzündliche, durch Zytokine vermittelte Reaktionen beobachtet, die zu einem Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke und letztlich zur Zerstörung des Myelins führen. Die Zusammensetzung der an diesem Geschehen beteiligten Immunzellen entspricht der einer autoimmunologischen Reaktion. Diese inflammatorische Komponente, die durch den pathologischen Anstau von VLCFA ausgelöst zu sein scheint, fehlt jedoch bei den langsam-progredienten Formen der Erkrankung nahezu vollständig. Es besteht überdies keine Korrelation zwischen der phänotypischen Verlaufsform und dem Ausmaß der Akkumulation überlangkettiger Fettsäuren. Auch konnte keine Genotyp/Phänotyp-Korrelation aufgezeigt werden. Nach den derzeitigen Forschungsergebnissen bestimmen zusätzliche, bislang nicht identifizierte modifizierende Gene und/oder Umweltfaktoren den Schweregrad des klinischen Phänotyps.

Diagnose. Die Diagnose der X-ALD beruht primär auf der Bestimmung der Konzentration ungesättigter überlangkettiger Fettsäuren (VLCFA; > C22:0) in Plasma, kultivierten Fibroblasten oder Amnionzellen. Die erhöhte Konzentration von C26:0 im Plasma, in Kombination mit erhöhten Quotienten aus C24:0/C22:0 und C26:0/C22:0 gilt als diagnostisch beweisend (Moser *et al.*, 1999). Die Mutationsanalyse des *ALD*-Gens, die Nachweisbarkeit von ALD-Protein mittels Immunfluoreszenz sowie Kopplungsanalysen mit X-chromosomalen Markern verbessern die diagnostische Sicherheit pränataler Diagnosen (Maier *et al.*, 1999; Wanders *et al.*, 1998) und erleichtern die Identifizierung weiterer Patienten und Überträgerinnen in betroffenen Familien (Feigenbaum *et al.*, 1996; Kemp *et al.*, 1996; Watkins *et al.*, 1995). Bildgebende Verfahren wie die Magnetresonanztomographie geben Aufschluß über das Stadium der Erkrankung.

Therapie. Die X-ALD ist, abgesehen von einer Steroidsubstitution zur Behandlung der Nebenniereninsuffizienz, derzeit nicht wirksam therapierbar. Symptomatische Therapieansätze versuchen, den Allgemeinzustand der Patienten zu verbessern und den täglichen Umgang mit ihnen zu erleichtern. So lassen sich der erhöhte Muskeltonus, die fortschreitende bulbäre Dysfunktion und der häufig gestörte Tag-Nacht-Rhythmus oft erfolgreich medikamentös beeinflussen. Eine ausreichende Kalorienzufuhr kann durch Sondenernährung gewährleistet werden.

Darüberhinaus werden mehrere spezifische Therapien erprobt, darunter diätetische Konzepte, pharmakologische Immunsuppression, Knochenmarkstransplantation und nicht zuletzt genterapeutische Ansätze. Große Aufmerksamkeit erlangte eine diätetische Therapie, die es ermöglichte, die Konzentrationen der VLCFA im Plasma von X-ALD Patienten weitgehend zu normalisieren. Sie besteht zum einen aus der Restriktion der mit der Nahrung aufgenommenen, gesättigten überlangkettigen Fettsäuren, zum anderen aus einer hochdosierten oralen Supplementation einfach ungesättigter Fettsäuren in Form von "Lorenzos Öl". Ein Übermaß an einfach ungesättigten Fettsäuren inhibiert die endogene Synthese gesättigter überlangkettiger Fettsäuren, da die Elongation gesättigter und ungesättigter Fettsäuren durch das gleiche Enzymsystem erfolgt. "Lorenzos Öl" besteht aus einer 4:1 Mischung von Ölsäure (GTO, Glycerintriolat) und Eruksäure (GTE, Glycerintrierukat) in Triglyceridform und wurde benannt nach dem Patienten Lorenzo Odone, dessen Eltern die Entwicklung dieses Therapieansatzes maßgeblich beeinflussten. Weltweite Studien zeigten jedoch, daß eine Therapie mit "Lorenzos Öl" - trotz verbesserter biochemischer Parameter - ein Fortschreiten der Erkrankung nach dem Auftreten neurologischer Symptome nicht verhindern kann. Derzeit wird diese Form der Therapie bei asymptomatischen Patienten und Patienten mit isolierter Nebenniereninsuffizienz angewandt, um das Auftreten neurologischer Symptome möglichst hinauszuzögern bzw. zu verhindern (Moser *et al.*, 2001).

Einen vielversprechenden Therapieansatz bei einzelnen Patienten mit CCALD stellt die Knochenmarkstransplantation dar. Er basiert auf der Beobachtung, daß hämatopoetische Stammzellen des Monozyten-Makrophagen-Systems sich im ZNS ansiedeln und zu Mikrogliazellen ausdifferenzieren. Auf diese Weise können Donorzellen, die eine uneingeschränkte Fähigkeit zur β -Oxidation von VLCFA oder aber die postulierten modifizierenden Eigenschaften besitzen, ins ZNS transportiert werden und dort einer Demyelinisierung entgegenwirken. Bei geeignetem Spender und in einem sehr frühen neurologischen Stadium durchgeführt, ist die Knochenmarkstransplantation derzeit die

einzigste Therapieform, die eine permanente Heilung verspricht (Aubourg, 1996; Aubourg *et al.*, 1990; Shapiro *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2000). Angesichts der relativ hohen Letalität nach allogener Knochenmarkstransplantation (< 10 % bei verwandten Spendern, 20 – 30 % bei unverwandten Spendern), werden sehr große Hoffnungen in die Entwicklung einer somatischen Gentherapie gesetzt. Sie könnte beispielsweise eine autologe Knochenmarkstransplantation mit gentherapeutisch korrigierten Stammzellen des Patienten ermöglichen. Ein anderes gentherapeutisches Konzept stellt die *in-situ* Implantation korrigierter Nerven- oder Gliazellen bzw. Fibroblasten in Entmarkungsherde der weißen Substanz dar.

Zahlreiche experimentelle pharmakologische Therapieansätze der Immunsuppression und -modulation mit β -Interferon, Cyclophosphamid, Cyclosporin, Pentoxifyllin, Thalidomide oder die Gabe von Immunglobulinen brachten keine relevante klinische Besserung (Gärtner *et al.*, 1998; Moser *et al.*, 2001).

Mit großer Spannung werden derzeit die Ergebnisse der klinischen Studien mit Lovastatin und 4-Phenylbutyrat (4-PBA) erwartet. Durch die Verabreichung von Lovastatin konnten die Konzentrationen der VLCFA sowohl in kultivierten Fibroblastenzellen (*in vitro*) als auch im Plasma von ALD-Patienten (*in vivo*) gesenkt werden (Pai *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 1998a; Singh *et al.*, 1998b). Erste Daten aus Tierversuchen lassen sogar einen günstigen Einfluß auf die inflammatorische Komponente der Erkrankung vermuten. Lovastatin entfaltet seine anti-inflammatorische Wirkung wohl über eine Hemmung der zytokin-vermittelten Aktivierung der Stickoxid-Synthetase und verhindert damit die Bildung von vasodilatatorisch wirksamem Stickoxid (NO) (Stanislaus *et al.*, 1999). Auch 4-Phenylbutyrat (4-PBA) verbessert die Oxidation überlangkettiger Fettsäuren in kultivierten Fibroblasten von ALD-Patienten sowie im Tiermodell (Kemp *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 1997). Interessanterweise senkt 4-PB die Konzentrationen der VLCFA im Tiermodell vor allem in Nebennierenrinde und Gehirn. Dies wird einerseits auf eine Induktion der Proliferation von Peroxisomen zurückgeführt. Andererseits wurde die vermehrte Expression eines Gens beobachtet, das in der Lage ist, den durch X-ALD verursachten metabolischen Defekt *in vitro* zu korrigieren (*ALDR-Gen*, siehe 1.1.3.) (Netik *et al.*, 1999). Dieser sehr interessante Ansatz würde einer pharmakologischen Gentherapie entsprechen. Der Effekt beider Substanzen wird derzeit im Rahmen klinischer Studien überprüft.

1.1.3. *ALD*-Gen und *ALD*-Protein

Das *ALD*-Gen konnte durch Linkage-Untersuchungen bereits 1981 auf dem langen Arm des X-Chromosoms am Genlocus Xq28 kartiert werden (Migeon *et al.*, 1981). Durch positionelle Klonierung wurde das Gen innerhalb Xq28 identifiziert (Mosser *et al.*, 1993) und seine genomische Struktur beschrieben (Sarde *et al.*, 1994). Es umspannt 21 Kilobasen und besteht aus 10 Exons, deren Länge zwischen 85 bp (Exon 8) und 1286 bp (Exon 1) beträgt (siehe auch Abb. 3 in 2.1.2). Für den Bereich der Exons 8 - 10 des *ALD*-Gens konnte ein partielles Pseudogen identifiziert werden, dessen Amplifikation bei der Durchführung von Mutationsanalysen durch sorgfältige Auswahl der Primer vermieden werden muß (Braun *et al.*, 1996).

Das *ALD*-Gen kodiert das aus 745 Aminosäuren bestehende *ALD*-Protein (*ALDP*), welches in der peroxisomalen Membran lokalisiert ist. *ALDP* zeigt eine starke Homologie mit den Proteinen der *ATP-binding cassette-transporters* (*ABC*-Transporter), einer Gruppe von Proteinen, die am Transport unterschiedlichster Substrate von Ionen bis hin zu Proteinen über zelluläre und subzelluläre Membranen beteiligt sind. Eukaryotische *ABC*-Transporter bestehen üblicherweise aus zwei hydrophoben, membranspannenden Domänen und zwei hydrophilen Domänen, die jeweils eine *ATP*-Bindungsfalte enthalten. Da *ALDP* jedoch nur eine hydrophobe und eine hydrophile Komponente aufweist, wird davon ausgegangen, daß es sich um einen *ABC*-Halbtransporter handelt, der mit sich selbst (*Homo*-) oder eng verwandten Halbtransportern (*Hetero*-) Dimere bildet (Liu *et al.*, 1999). Abbildung 1 zeigt das hypothetische Modell eines solchen Halbtransporters. Neben *ALDP* konnten bislang drei weitere peroxisomale *ABC*-Halbtransporter identifiziert werden: *PMP70* (Gärtner & Valle, 1993; Kamijo *et al.*, 1992), *ALDR* (Broccardo *et al.*, 1998; Holzinger *et al.*, 1997a; Lombard-Platet *et al.*, 1996) und *P70R* (*PMP69*) (Holzinger, Kammerer & Roscher, 1997b; Shani *et al.*, 1997). Die genaue Funktion des *ALDP* sowie seine Interaktionspartner blieben bislang jedoch ungeklärt. Eine Homologie zwischen *ALDP* und bekannten peroxisomalen Enzymen oder der *VLCS* besteht nicht.

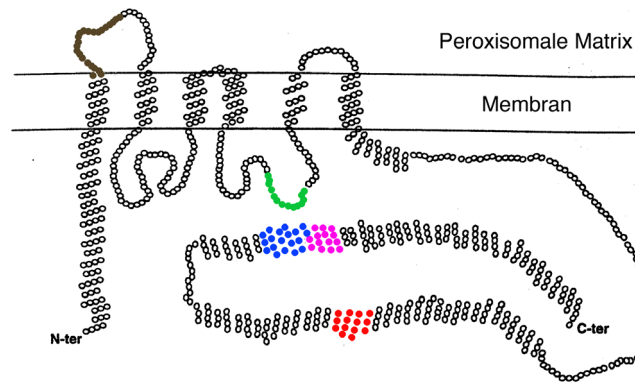


Abb. 1: Hypothetisches Modell eines peroxisomalen ABC-Halbtransporters. Dargestellt ist ein Halbtransporter mit 6 transmembranspannenden Segmenten und der ATP-Bindungsfolde. Ebenfalls abgebildet sind die hochkonservierten Motive des Proteins. Sie finden sich bei allen bislang bekannten ABC-Halbtransportern: *Loop 1* (braun), eine Aminosäure-Schleife (*loop* = Schleife) nahe des N-Terminus (N-ter) und unmittelbar nach dem ersten Transmembransegment, das eine Rolle zu spielen scheint bezüglich Proteininstabilität und Targeting; *EAA-like* Motiv (grün), welches große Ähnlichkeit mit dem EAA-Motiv prokaryotischer ABC-Transporter aufweist; Walker A (rot) und Walker B (pink) Konsensus-Sequenz markieren die ATP-bindenden Domäne; C-Sequenz (blau), die sich unmittelbar vor dem Walker B-Motiv findet und als sehr charakteristisches Merkmal aller ABC-Transporter gilt. Sie scheint für die Substratspezifität des Transporters von Bedeutung zu sein (C-ter = C-Terminus).

(nach Shani, 1996)

Bislang konnten Mutationen im *ALD*-Gen bei allen X-ALD Patienten nachgewiesen werden, deren vollständige kodierende Sequenz untersucht wurde. Weit mehr als 300 Mutationen im *ALD*-Gen wurden beschrieben. Alle identifizierten Mutationen werden in einer Datenbank erfaßt (www.x-ald.nl). Kumulativ fanden sich 53,5 % Missense-Mutationen, 24 % Deletionen und Insertionen mit Verschiebung des Leserasters (*“frameshift”*), 8,5 % Nonsense-Mutationen, 6,5 % Deletionen von mehr als einem Exon, 5 % Deletionen und Insertionen ohne Verschiebung des Leserasters (*“in-frame”*) und 2,5 % Splice-Site-Mutationen (Smith *et al.*, 1999). Sehr charakteristisch für X-chromosomal vererbte Erkrankungen ist die Beobachtung, daß ein Großteil (68,5 %) der untersuchten Familien *“eigene”* (private) Mutationen aufweist. Die Mutationen finden sich über das ganze Gen hinweg verteilt, eine relative Häufung ist jedoch um und in der ATP-bindenden Region zu beobachten. Einen *“Hotspot”* (12 %) stellt eine 2 bp-Deletion in Exon 5 dar (Kemp *et al.*, 1994). Etwa 70 % der Mutation führen infolge von Proteininstabilität zu einem kompletten Verlust von ALDP (Feigenbaum *et al.*, 1996; Kemp *et al.*, 1996; Watkins *et al.*, 1995). Unabhängig von Art und Lokalisation der Mutation war ALD-spezifische mRNA bislang bei allen untersuchten Patienten nachweisbar (Ligtenberg *et al.*, 1995).

1.1.4. Identifizierung heterozygoter ALD-Mutationsträgerinnen

Mehr als die Hälfte aller heterozygoten ALD-Mutationsträgerinnen entwickelt im Laufe ihres Lebens neurologische Symptome. Erste Symptome treten meist in der vierten bis fünften Lebensdekade auf und variieren von einer milden Hyperreflexie oder Störung des Vibrationsempfindens bis hin zu einer milden Ausprägung von AMN (Moser *et al.*, 2001). Eine Nebenniereninsuffizienz ist bei ALD-Überträgerinnen jedoch nur sehr selten zu beobachten (Powers *et al.*, 1987; Schmidt *et al.*, 2001). Initial erinnert die heterozygote AMN häufig an eine Multiple Sklerose (Dooley & Wright, 1985; Restuccia *et al.*, 1997; Stöckler *et al.*, 1993) und sollte daher als mögliche Differentialdiagnose vor allem bei familiär gehäuft auftretender Multipler Sklerose bedacht werden. Die Diagnose wird bei ALD-Überträgerinnen oft erst spät gestellt, nämlich dann, wenn ein Sohn an X-ALD erkrankt (Moser *et al.*, 2001). Darüberhinaus ist die Identifizierung heterozygoter ALD-Mutationsträgerinnen in Anbetracht der Schwere der Erkrankung und der infausten Prognose hemizygoter Patienten bei der genetischen Beratung von Frauen aus X-ALD Familien von zentraler Bedeutung.

Die Bestimmung der VLCFA im Plasma stellt bei der Identifizierung hemizygoter ALD-Patienten einen sehr sicheren diagnostischen Test dar. Auch bei etwa 85 % der ALD-Überträgerinnen finden sich mäßiggradig erhöhte Konzentrationen von VLCFA. Zur Verbesserung der diagnostischen Sicherheit wird bei potenziellen Überträgerinnen neben der Bestimmung der VLCFA eine Diskriminationsanalyse durchgeführt. In den Diskriminationswert y gehen neben der Konzentration von C26:0 die Quotienten aus C24:0/C22:0 und C26:0/C22:0 ein. Bei einem Diskriminationswert y von $> 0,72$ ist eine Heterozygotie aus biochemischer Sicht hochwahrscheinlich (Moser *et al.*, 1983). Jedoch weisen etwa 15 % der obligat heterozygoten ALD-Mutationsträgerinnen normale Konzentrationen überlangkettiger Fettsäuren im Plasma auf (Moser *et al.*, 1999; Moser *et al.*, 1983). Als obligat heterozygote Überträgerinnen werden nach genetischen Kriterien Frauen mit a) mindestens 2 betroffenen Söhnen oder b) einem betroffenen Sohn und mindestens einem weiteren betroffenen Familienmitglied angesehen. Grundsätzlich schließen demnach normale Konzentrationen von VLCFA eine Heterozygotie bezüglich X-ALD nicht sicher aus. In diesen Fällen müssen alternative Untersuchungsmethoden angewandt werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Identifizierung heterozygoter Mutationsträgerinnen besteht im Nachweis von ALDP in Leukozyten und Fibroblasten mittels Immunfluoreszenz (Feigenbaum *et al.*, 1996; Kemp *et al.*, 1996; Watkins *et al.*, 1995). Hierbei findet sich bei

heterozygoten Überträgerinnen ein Mosaik aus ALDP-positiven und ALDP-negativen Zellen, da aufgrund der X-Inaktivierung in einer Zellpopulation das Wildtyp-Allel, in der anderen Zellpopulation jedoch das mutierte Allel exprimiert wird. Die Anwendung dieser Methode setzt allerdings voraus, daß beim Index-Patienten der Verlust von ALDP gezeigt werden konnte, oder bekannt ist, daß die in der Familie zugrundeliegende Mutation zu einem Verlust von ALDP führt. Bei etwa 30 % der Mutationen im *ALD*-Gen beobachtet man jedoch eine durch Immunfluoreszenz vom Wildtyp nicht unterscheidbare Expression des mutierten ALDP.

Die sicherste Methode zur Identifizierung von ALD-Überträgerinnen ist der direkte Nachweis der Mutation im heterozygoten Zustand (Boehm *et al.*, 1999; Maier *et al.*, 1999). Mutationen im heterozygoten Zustand sind technisch oft schwierig darzustellen. Daher sollte die Analyse möglichst im Vergleich mit dem hemizygoten Index-Patienten erfolgen.

1.2. X-Inaktivierung

1.2.1. Charakteristika der X-Inaktivierung

Die Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen in weiblichen Zellen dient dem Ausgleich der Gen-Dosis im Vergleich zur männlichen Zelle, die über nur ein X-Chromosom verfügt. Das Phänomen wurde 1961 erstmals von Mary Lyon beschrieben und wird seither als „Lyon-Hypothese“ bezeichnet. Im Embryonalstadium der Blastozyste wird nach dem Zufallsprinzip eines der beiden X-Chromosomen in jeder somatischen Zelle (mit Ausnahme weniger Abschnitte) inaktiviert. Das betreffende X-Chromosom bleibt in der jeweiligen Zelllinie über alle Teilungen hinweg inaktiviert. Es kann in den meisten Zellkernen als Barr-Körperchen cytologisch nachgewiesen werden (Barr & Carr, 1961). Enthält eine Zelle mehr als zwei X-Chromosomen, so werden alle bis auf eines inaktiviert. Der Ablauf der X-Inaktivierung wird durch das X-Inaktivierungszentrum (*Xic*) kontrolliert. Ein Kandidatengen für *Xic*, das *Xist*-Gen (*X-inactivation-specific-transcript*), wurde 1991 identifiziert (Brown *et al.*, 1991a; Brown *et al.*, 1991b). Da das Gen keinen offenen Leserahmen von signifikanter Länge enthält, wird davon ausgegangen, daß es seine Wirkung über ein RNA-Transkript entfaltet. Die *Xist*-RNA wird ausschließlich vom inaktivierten X-Chromosom transkribiert, verbleibt im Zellkern und wird oftmals assoziiert mit dem Heterochromatin des Barr-Körperchens vorgefunden (Brown *et al.*, 1992).

Merkmale des inaktivierten X-Chromosoms. Charakteristische Merkmale des inaktivierten X-Chromosoms, wie seine späte Replikation und die stark kondensierte Heterochromatin-Struktur, führten zu seiner Entdeckung. Die DNA-bindenden Histon-Proteine des inaktivierten X-Chromosoms zeigen in der Immunfluoreszenz eine stark verminderte Acetylierung N-terminaler Lysinreste, deren Bedeutung bislang ungeklärt blieb. Die Acetylierung erfolgt erst relativ spät im Verlauf des Inaktivierungsprozesses (Heard *et al.*, 1997). Ein Mechanismus, der der Aufrechterhaltung der Inaktivierung dient, ist die Methylierung von CpG-Inseln. CpG-Inseln bestehen aus etwa 1 - 2 Kb langen Abschnitten von CG-Dinukleotiden und finden sich am 5'-Ende exprimierter Gene. Diese Abschnitte werden auf dem inaktivierten X-Chromosom meist sehr stark, und auf dem aktiven Chromosom nicht methyliert (Tribioli *et al.*, 1992). Unklar ist jedoch, auf welche Weise das Vorhandensein von methylierten CpG-Inseln eine Gen-Expression unterdrückt. Es wird diskutiert, daß die Methylierung die Bindung von Transkriptionsfaktoren inhibiert, oder andere Proteine durch ihre Bindung an methylierte DNA die Transkription verhindern.

Gene, die der Inaktivierung entgehen. Nicht alle Gene des X-Chromosoms unterliegen der X-Inaktivierung. Bisher wurden 19 X-chromosomale Gene beschrieben, die einer Inaktivierung entgehen und von beiden Chromosomen exprimiert werden (Brown *et al.*, 1997). Sie werden zeitgleich mit den Genen des aktiven X-Chromosoms repliziert und zeigen keine Methylierung von CpG-Inseln. Eine relative Häufung dieser Gene ist in der pseudoautosomalen Region des X-Chromosoms zu finden. Diese Region weist funktionell homologe Gene auf dem Y-Chromosom auf. Die Nicht-Inaktivierung dieser Gene dient somit auch der ausgeglichenen Genexpression der Geschlechts-Chromosomen in männlichen und weiblichen Zellen. Andere, von der Inaktivierung ausgenommene Gene, finden sich über das ganze X-Chromosom hinweg verteilt und zeigen keinerlei Homologien zu Y-chromosomalen Genen. Eine biologische Relevanz der ungleichen Expression dieser Gene in männlichen und weiblichen Zellen konnte bislang nicht gezeigt werden (Heard *et al.*, 1997).

Random und non-random X-Inaktivierung. Die Auswahl des zu inaktivierenden X-Chromosoms erfolgt nach dem Zufallsprinzip (*random* = zufällig). Die Gewebe weiblicher Individuen bestehen somit aus einem Mosaik von Zellen, in denen zu annähernd gleichen Teilen einmal das paternale und einmal das maternale X-Chromosom inaktiviert wurde (Abb. 2A). Es gibt jedoch Fälle, in denen sich die X-Inaktivierung zugunsten eines der beiden

Chromosomen verschiebt (*skewed* = verschoben, verzerrt). Man spricht dann von *non-random* X-Inaktivierungsmustern.

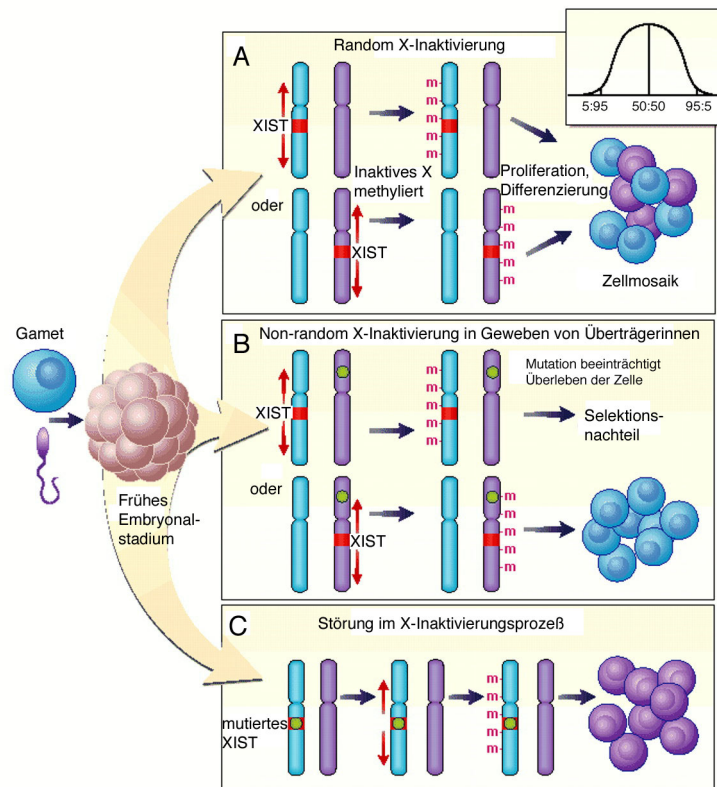


Abb. 2: Random X-Inaktivierung und zwei mögliche Mechanismen, die zu einer Verschiebung der X-Inaktivierung zugunsten eines X-Chromosoms führen können. Teil A der Abbildung zeigt den Ablauf einer *random* X-Inaktivierung. Ausgehend vom X-Inaktivierungszentrum XIST werden einmal das maternale (blau) und einmal das paternale (lila) X-Chromosom inaktiviert. Die Auswahl erfolgt zufällig (= *random*). Die X-Inaktivierung wird mittels Methylierung (m) aufrechterhalten. Differenzierte Gewebe weiblicher Individuen bestehen daher aus einem Mosaik zweier Zellpopulationen. Im Falle einer *random* X-Inaktivierung liegen beide Populationen zu annähernd gleichen Teilen vor. Aus verschiedenen Gründen kann es zu einer Verschiebung der X-Inaktivierung zugunsten eines X-Chromosoms kommen. In Teil B der Abbildung hat eine Mutation auf dem paternalen X-Chromosom (grüner Kreis) einen Selektionsnachteil für diejenigen Zellen zur Folge, in denen dieses X-Chromosom im aktiven Zustand vorliegt. Sie sterben früher ab, das differenzierte Gewebe besteht hauptsächlich aus Zellen, in denen das maternale X-Chromosom aktiv vorliegt (*nonrandom* X-Inaktivierung aufgrund von Selektionsmechanismen). Teil C der Abbildung zeigt eine *nonrandom* X-Inaktivierung aufgrund einer Mutation im XIST-Gen des maternalen X-Chromosoms (grüner Kreis), die dazu führt, daß ausschließlich dieses X-Chromosom inaktiviert wird. Das differenzierte Gewebe besteht hier nur aus Zellen, in denen das paternale X-Chromosom aktiv vorliegt.
(aus Puck, 1998)

Für das Auftreten dieser Muster gibt es verschiedene Ursachen:

Eine Störung des primären X-Inaktivierungsprozesses – beispielsweise verursacht durch eine Mutation im *XIST*-Gen – kann zu *non-random* X-Inaktivierung führen (Abb. 2C).

Mutationen in X-chromosomalen Genen, die die Zellproliferation oder -differenzierung beeinträchtigen, stellen einen Selektionsnachteil für diejenigen Zellen dar, in denen das mutationstragende X-Chromosom im aktiven Zustand vorliegt. Es kommt zu einer

Verschiebung der X-Inaktivierung zugunsten des Wildtyp-Chromosoms (Abb. 2B). Diese Form der *non-random* X-Inaktivierung wird häufig bei Überträgerinnen X-chromosomal vererbter Erkrankungen beobachtet und ist wohl der Grund dafür, daß Überträgerinnen X-chromosomaler Erkrankungen nur sehr selten Symptome zeigen.

Neben den genannten Gründen führen auch Chromosomenaberrationen wie Translokationen, Deletionen, Iso- und Ringchromosomen zu einer *non-random* X-Inaktivierung (in Abb. 2 nicht dargestellt). Sie hat u. a. zum Ziel, die durch die chromosomale Aberration entstandene genetische Dysbalance zu minimieren (Heard *et al.*, 1997).

Bei etwa 5 - 20 % der „gesunden“ weiblichen Bevölkerung findet sich eine zugunsten eines Allels deutlich verschobene X-Inaktivierung als zufällige Normvariante (Belmont, 1996) (Abb. 2A).

Non-random X-Inaktivierung wird von der Mehrzahl der Autoren als Allelverhältnis $\geq 75:25$ (bzw. $\geq 3:1$) definiert (El Kassar *et al.*, 1998; Gale & Linch, 1994; Kopp *et al.*, 1997), wobei die Begriffe *non-random* und *skewed* oft synonym verwendet werden. Andere Autoren unterscheiden zudem noch mildes *Skewing* (65:35 - 80:20) und ausgeprägtes *Skewing* ($\geq 80:20$) (Harris *et al.*, 1992).

1.2.2. Methoden zur Darstellung von X-Inaktivierungsmustern

Eine Methode zur Untersuchung von X-Inaktivierungsmustern muß zwei Voraussetzungen erfüllen: Zunächst müssen das maternale und das paternale X-Chromosom unterscheidbar sein. Hierzu bedient man sich verschiedener X-chromosomaler Polymorphismen wie Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP) oder *Variable Number Tandem Repeats* (VNTR). Es sollten nach Möglichkeit Polymorphismen mit einem hohen Heterozygoten-Index (= relative Häufigkeit heterozygoter Individuen) gewählt werden. So wird gewährleistet, daß ein hoher Prozentsatz der weiblicher Individuen untersucht werden kann.

Darüberhinaus muß eine Unterscheidung zwischen aktivem und inaktivem X-Chromosom erfolgen. Hierfür macht man sich die unterschiedlichen Merkmale des inaktiven bzw. aktiven X-Chromosoms zunutze. So ist zum Beispiel ein inaktiviertes Allel sehr stark methyliert, nicht aber das aktive. Die Methylierungsunterschiede lassen sich mit Hilfe sogenannter methylierungssensitiver Restriktionsenzyme darstellen. Diese Restriktionsenzyme können nur nicht-methylierte DNA schneiden. Nach Inkubation von genomischer DNA mit diesen

Enzymen werden im Southern Blot oder durch PCR somit nur noch die inaktivierten Allele nachgewiesen. Im Falle einer *random* X-Inaktivierung finden sich beide Allele eines Polymorphismus zu gleichen Teilen wieder. Polymorphismen, die mit dieser Methode häufig untersucht werden, finden sich in dem anonymen Marker DXS255 (M27ß) (Boyd & Fraser, 1990), dem Phosphoglycerat-Kinase-Gen (PGK) (Vogelstein *et al.*, 1987) und im Androgenrezeptor-Gen (HUMARA) (Allen *et al.*, 1994; Allen *et al.*, 1992).

Eine andere Methode untersucht Polymorphismen in mRNA-Transkripten. Hierbei werden nur die Allele des jeweils aktiven X-Chromosoms nachgewiesen, da die Expression von Genen eine Eigenschaft des aktiven X-Chromosoms ist. Für die Transkriptanalyse eignen sich jedoch nur Gene, die in dem zu untersuchenden Gewebe exprimiert werden und dabei geeignete Polymorphismen aufweisen. In Leukozyten finden sich solche Polymorphismen im Iduronat-2-Sulfatase-Gen (IDS) und im Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Gen (G6PH) (El-Kassar *et al.*, 1995; El-Kassar *et al.*, 1997). Nach reverser Transkription wird ausgehend von cDNA der zu untersuchende Polymorphismus amplifiziert und das Verhältnis der beiden Allele zueinander festgestellt. Für die Darstellung von Methylierungsunterschieden, sowie bei Transkriptanalysen werden meist fluoreszenzmarkierte Primer für die Amplifikation verwendet, um die Quantifikation der Allel-Produkte zu erleichtern.

Die bei weitem aufwendigste Methode zum Nachweis von Genexpression stellt die Untersuchung somatischer Zell-Hybride dar (Puck *et al.*, 1987). Patientenzellen werden mit einer Zell-Linie von Hamsterfibroblasten fusioniert, die nicht über das X-chromosomal kodierte Enzym Hypoxantin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT) verfügen (HGPRT-defiziente Zellen). Diejenigen Hybrid-Zellen, die nach der Fusion HGPRT exprimieren, enthalten das aktive X-Chromosom. An diesen Zell-Linien können dann unterschiedliche Marker bzw. X-chromosomale Krankheitsgene untersucht werden.

Von diagnostischer Bedeutung ist die Untersuchung von X-Inaktivierungsmustern bei der Identifizierung von Überträgerinnen einiger X-chromosomal vererbter Erkrankungen. Beispiele hierfür sind die Immundefektsyndrome M. Bruton (infantile geschlechtsgebundene Agammaglobulinämie), der schwere kombinierte Immundefekt (SCID - *severe combined immunodeficiency*) und das Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS). Die Überträgerinnen dieser Erkrankungen sind in aller Regel symptomfrei und zeigen keine immunologischen Auffälligkeiten. Ihre B- bzw. T-Zellen weisen dabei eine ausgeprägte *non-random* X-Inaktivierung zu Ungunsten des mutationstragenden X-Chromosoms auf. Durch den Nachweis eines *non-random* Inaktivierungsmusters können bei den genannten Immundefektsyndromen Überträgerinnen identifiziert werden. Die Nicht-Überträgerinnen der betroffenen Familien

zeigen dahingegen *random* X-Inaktivierung (Allen *et al.*, 1994; Goodship *et al.*, 1991; Puck *et al.*, 1987; Wengler *et al.*, 1997). Einen weiteren Schwerpunkt in der X-Inaktivierungsdiagnostik stellt der Nachweis des klonalen Ursprungs von Tumoren dar. Diese Untersuchungen dienen der Grundlagenforschung hinsichtlich der Entstehung von Karzinomen. Sie leisten aber auch einen Beitrag zur Diagnosestellung und in der Überwachung der Nachsorge von Tumoren (Wainscoat & Fey, 1990).

1.2.3. X-Inaktivierung bei heterozygoten ALD-Überträgerinnen

Die heterozygoten Überträgerinnen von X-ALD entwickeln im Gegensatz zu den Überträgerinnen anderer X-chromosomal vererbter Erkrankungen in mehr als 50 % der Fälle neurologische Symptome (Moser *et al.*, 2001). Als Ursache hierfür wurde eine *non-random* X-Inaktivierung zugunsten des mutierten Allels postuliert. Diese Hypothese basiert auf den Ergebnissen einer Arbeit von Migeon *et al.* aus dem Jahr 1981, in der kultivierte Fibroblasten heterozygoter ALD-Überträgerinnen untersucht wurden. Es konnten zwei Arten von Zellklonen unterschieden werden: Klone mit normalen Konzentrationen von VLCFA und Klone mit eindeutig pathologisch erhöhten VLCFA. Diese Beobachtung zeigte, daß das *ALD*-Gen der X-Inaktivierung unterliegt. Außerdem wurde gezeigt, daß die Zahl der Fibroblasten-Klone mit pathologisch erhöhten VLCFA und somit eine Expression des mutierten *ALD*-Allels überwiegen. Aus dieser Beobachtung wurde eine Selektion zugunsten des mutierten Allels postuliert. Mutationen in allen anderen bislang untersuchten X-chromosomalen Genen haben jedoch eine Selektion gegen das mutierte Allel zur Folge (Heard *et al.*, 1997). Andererseits haben etwa 15 % der obligat heterozygoten ALD-Überträgerinnen normale Konzentrationen überlangkettiger Fettsäuren in Plasma und/oder Fibroblasten (Moser *et al.*, 1999; Moser *et al.*, 1983). Diese Befunde sind nicht vereinbar mit einer *non-random* X-Inaktivierung zugunsten des mutierten Allels. Eine zweite, statistisch nicht auswertbare Studie (Watkiss *et al.*, 1993) untersuchte die X-Inaktivierung obligat heterozygoter Überträgerinnen in Leukozyten. Dabei zeigten sich überwiegend *random* X-Inaktivierungsmuster. Auch ein Zusammenhang zwischen der Manifestation klinischer Symptome und dem X-Inaktivierungsmuster in Leukozyten ließ sich nicht darstellen.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Es sollte die Hypothese geprüft werden, ob bei heterozygoten Überträgerinnen von X-ALD eine Verschiebung der X-Inaktivierung zugunsten eines Allels erfolgt. Ein solches *Skewing* der X-Inaktivierung könnte helfen, das Auftreten klinischer Symptome bei Überträgerinnen von X-ALD zu erklären.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden folgende Teilziele verfolgt:

- Etablierung der Mutationsanalyse des *ALD*-Gens durch nicht-radioaktives Sequenzieren (*Cycle-Sequencing*) des gesamten kodierenden Bereichs.
- Sicherer Nachweis der Heterozygotie bezüglich X-ALD bei Überträgerinnen durch Mutationsanalyse des *ALD*-Gens. Untersuchung eines Kollektivs von ALD-Familien ausgehend vom Index-Patienten.
- Etablierung einer Methode zur Untersuchung der X-Inaktivierung mittels methylierungs-sensitivem Restriktionsverdau und anschließender Amplifikation eines polymorphen Markers im Androgen-Rezeptor-Gen (Androgenrezeptor-Test = *HUMARA-Assay*).
- Untersuchung der Fragestellung, ob die Analyse der X-Inaktivierungsmuster einen zusätzlichen Beitrag zur Identifizierung von ALD-Überträgerinnen leisten kann.
- Vergleich der X-Inaktivierungsmuster heterozygoter ALD-Überträgerinnen mit einem gesunden Kontroll-Kollektiv und Reevaluierung der vorbeschriebenen Daten mit verbesserter Methodik und größeren Fallzahlen.
- Korrelation der X-Inaktivierungsmuster heterozygoter ALD-Mutationsträgerinnen mit deren biochemischen Parametern (VLCFA).

Damit sollten Grundlagen für das Verständnis des Auftretens klinischer Symptome bei X-ALD erarbeitet werden.

2. Material und Methoden

2.1. Mutationsanalyse des *ALD*-Gens

2.1.1. Extraktion genomischer DNA aus Vollblut und kultivierten Fibroblasten

2.1.1.1. Durchführung

Die Extraktion genomischer DNA aus Leukozyten erfolgte nach einer Aussalz-Methode (Miller *et al.*, 1988). Diese Methode wurde in modifizierter Form auch für die Extraktion von DNA aus kultivierten Fibroblasten angewandt.

Lyse der Erythrozyten

Für die DNA-Präparation standen 1,5 - 5 ml Vollblut (EDTA-Blut) zur Verfügung. Das Blut wurde in 15 ml-Zentrifugenröhrchen (Fa. Sarstedt, Nümbrecht) überführt, mit Erythrozyten-Lysepuffer auf 15 ml aufgefüllt und durch Schwenken gemischt. Wenn eine Lyse der Erythrozyten erkennbar war (Lackfarbe des Blutes), wurden die Leukozyten bei 1500 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgossen, das Zell-Pellet im Restvolumen resuspendiert und ein weiteres Mal mit Erythrozyten-Lysepuffer gewaschen.

Inkubation der Zell-Lysate mit Proteinase K

Die resuspendierten Leukozyten wurden mit 1 ml Proteinase K-Puffer, 5 μ l Proteinase K und 50 μ l 20 % SDS über Nacht bei 37 °C (alternativ: 2 Stunden bei 65 °C) im Wasserbad inkubiert. Hierbei soll noch vorhandenes Protein gespalten werden. SDS als Detergenz lysiert die Zellmembranen der Leukozyten.

Aussalzen der Proteine

Nach der Inkubation mit Proteinase K wurden die Proteinfragmente durch die Zugabe von 300 μ l 5 M NaCl gefällt und bei 4500 U/min abzentrifugiert.

Fällen, Waschen und Lösen der DNA

Nach dem Abzentrifugieren der Proteine wurde der Überstand in ein neues 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Es wurden 4 ml 100 % unvergällter Ethanol (Fa. J.T. Baker, Griesheim) zugegeben und die genomische DNA durch Schwenken gefällt. Anschließend

wurde die DNA mit Hilfe einer Pipette in ein Schraubverschlußröhrchen (Fa. Sarstedt, Nümbrecht) überführt und mit 350 μ l 70 % Ethanol gewaschen. Nach dem Waschschrift wurde die DNA etwa 1 Stunde bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde sie in TE-Puffer (Volumen abhängig von der DNA-Menge) gelöst und bei 4 °C gelagert.

Für die Extraktion von DNA aus Fibroblasten wurden die Zellen trypsiniert und einmal in PBS-Puffer gewaschen. Das Zell-Pellet wurde dann in 1 ml PK-Puffer aufgenommen und mit Proteinase K und SDS wie oben beschrieben inkubiert. Die übrigen Schritte der Extraktion unterschieden sich nicht von denen der DNA-Extraktion aus Leukozyten.

2.1.1.2. Puffer-Lösungen

Erythrozyten-Lysepuffer:

NH ₄ Cl	155 mM	41,45 g	Sigma A-4514
KHCO ₃	10 mM	5 g	Merck 4854
Na-EDTA	0,1 mM	0,17 g	Sigma E-5134

ad 5000 ml bidestilliertes Wasser

pH 7,4 einstellen mit 1 M HCl bzw. 2 M NaOH

Proteinase K-Puffer:

1 M Tris/Cl pH 7,5	5 ml	Sigma T-6666
0,5 M Na-EDTA pH 8,0	2 ml	Sigma E-7889
5 M NaCl	3 ml	Sigma S-5150

ad 1000 ml bidestilliertes Wasser

TE-Puffer

Tris	10 mM	1,21 g	Sigma T-6666
Na-EDTA	1 mM	0,37 g	Sigma E-5134

ad 1000 ml bidestilliertes Wasser

pH 8,0 einstellen mit 1 M HCl bzw. 2 M NaOH

20 % SDS-Lösung: 20 g SDS (Serva 20763) ad 100 ml bidestilliertes Wasser.

70 % Ethanol: 70 ml 100 % Ethanol, unvergällt (Fa. T.J. Baker, Griesheim) ad 100 ml bidestilliertes Wasser.

Erythrozyten-Lysepuffer, Proteinase K-Puffer und TE-Puffer wurden nach Möglichkeit nur autoklaviert verwendet.

2.1.2. Amplifikation der kodierenden Abschnitte des *ALD*-Gens mittels PCR

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden genau definierte Bereiche des *ALD*-Gens exponentiell vervielfältigt (amplifiziert).

Alle Fragmente des *ALD*-Gens wurden mit *Taq*-DNA Polymerase der Firma Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) und dem dazugehörigen 10 x-Standardpuffer in 50 μ l-Ansätzen amplifiziert. In Tabelle 2 werden die verwendeten Primer mit ihrer jeweiligen Sequenz, den PCR-Bedingungen und der Länge der amplifizierten Fragmente aufgelistet. Da weite Bereiche des Gens nur schwer amplifizierbar sind, wurden mit Ausnahme von Exon 1 und Exon 2 jeweils mehrere Exons gemeinsam voramplifiziert. Aufgrund seiner Größe wurde Exon 1 gesondert voramplifiziert und anschließend in Form von 4 kleineren Einzelfragmenten analysiert (1A - 1D). Voramplifikation und Amplifikation der Einzelfragmente dieses Exons erforderte die Anwesenheit von 5 % DMSO. Exon 2 wurde nicht voramplifiziert.

Die Produkte der Voramplifikationen waren im Agarosegel nicht nachweisbar. Für die Amplifikation der einzelnen Exons wurde 1 μ l der jeweiligen Voramplifikation 1:10 verdünnt

eingesetzt. 10 μ l der PCR-Produkte wurden auf ein 1 %-iges Agarosegel (DNA Agarose, Fa. Biozym Diagnostics, Hessisch Oldendorf) aufgetragen.

Abbildung 3 zeigt schematisch die Genstruktur des *ALD*-Gens, die Strategie der Mutationsanalyse mit Voramplifikation und Amplifikation sowie die Lokalisation der verwendeten Primer.

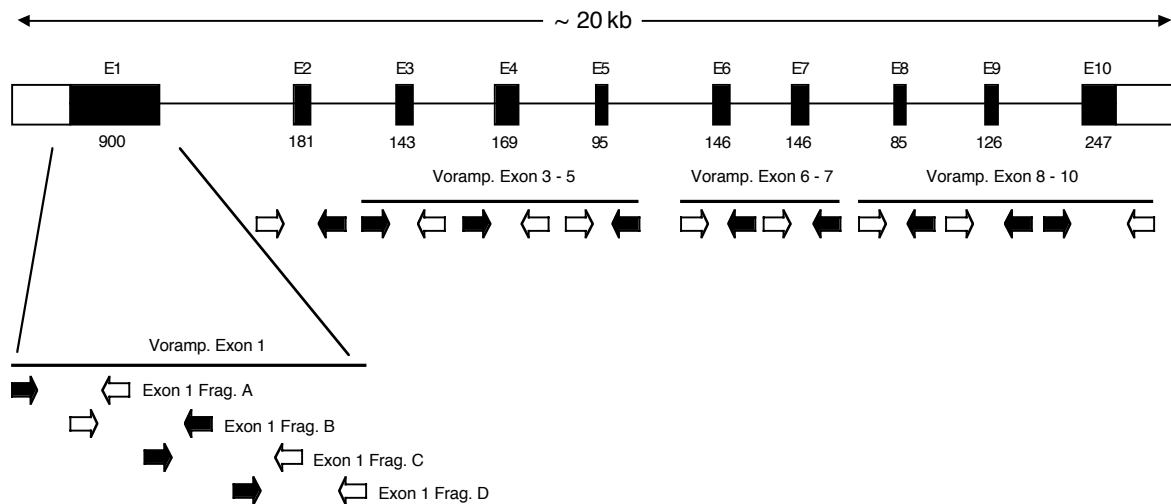


Abb. 3: Schematische Darstellung der Genstruktur des *ALD*-Gens und der Strategie der Mutationsanalyse. Das *ALD*-Gen erstreckt sich über 20 kb und besteht aus 10 Exons (schwarze Kästen) und 9 Introns (Linien). Die 3'- und 5'-untranslatierten Bereiche des Gens sind als weiße Kästen dargestellt. Die Längen der einzelnen Exons sind unter dem betreffenden Exon in bp angegeben. Mit Ausnahme von Exon 2 wurden zunächst Voramplifikationen durchgeführt. Hierbei konnten meist mehrere Exons gemeinsam amplifiziert werden. Nur Exon 1 wurde aufgrund seiner Größe allein voramplifiziert und in mehrere Einzelfragmente (1A – 1D) unterteilt. Anschließend wurde jedes Exon für sich mittels exonflankierender Intronprimer (Pfeile) amplifiziert und mittels Cycle-Sequencing analysiert. Die in die Sequenzier-Reaktion eingesetzten Primer wurden schwarz gefüllt dargestellt.

Fragment	<i>Forward-Primer</i>	<i>Reverse-Primer</i>	Ann. Temp.	Zyklen	Fragment-Länge (bp)
Voramp. Exon 1	5'-TCTCAGGGGCCATCGCAAG-3'	5'-CTGAGTCCACGGCTGCCCAAA-3'	60 °C	25	1215
Voramp. Exon 3-5	5'-CTTTCTCTCCAGCGGCTC-3'	5'-GTTGCCAGCACAGACAGG-3'	54 °C	25	1308
Voramp. Exon 6-7	5'-CGCTCTCTGGCGTCAGCG-3'	5'-TGGTGTGGTCCTCCCTG-3'	54 °C	25	812
Voramp. Exon 8-10	5'-GTCACAGCTAGCTCATCCCG-3'	5'-CAGGGGCCGGGACGGTGT-3'	60 °C	25	868
Exon 1 Frag. A	*5'-GTCAGAGCAACAATCCTTC-3'	5'-GTCTCCCGGCACAGGACC-3'	54 °C	35	360
Exon 1 Frag. B	5'-CTCCTGCGGGCTGCTGTTC-3'	*5'-CCCGTCCATGTTGCTGAC-3'	54 °C	35	333
Exon 1 Frag. C	*5'-ACTGGCCCTGTCGTTCGG-3'	5'-CTCCTCTGCCACCAGCTC-3'	54 °C	35	346
Exon 1 Frag. D	*5'-GCCTTCTCGCCCAAGTTC-3'	5'-CCCACCTCTCACGGCTGC-3'	60 °C	35	202
Exon 2	5'-TGGGAGACCTGACCATCG-3'	*5'-CTCAGCACCCAGCGGTATG-3'	60 °C	35	328
Exon 3	*5'-GACTTTCCGCTGTCCTG-3'	5'-CAGGGAGAGAAGCATGGC-3'	54 °C	35	259
Exon 4	*5'-CAACTGGCAGGGGCTGAG-3'	5'-GGGCGGGGTCACCTCATAG-3'	54 °C	30	242
Exon 5	5'-CAGAATGCAGAGGGTTCG-3'	*5'-CCAAGGGCTGAGGCTTGC-3'	54 °C	35	213
Exon 6	identisch mit dem Forward-Primer der Voramplifikation Exon 6-7	*5'-AGCCATGTGTGAGCGCAC-3'	54 °C	35	239
Exon 7	5'-CCTCCGTGGACACCCAGC-3'	*identisch mit dem Reverse-Primer der Voramplifikation Exon 6-7	54 °C	35	324
Exon 8	identisch mit dem Forward-Primer der Voramplifikation Exon 8-10	*5'-GGCTCAGGCTCCACTGAG-3'	54 °C	35	273
Exon 9	5'-TTGGGCCCTGGAGGGTGC-3'	*5'-CCCCTCAGGCAGGCACTC-3'	54 °C	35	227
Exon 10	*5'-CAGCGGCTGTCATCAGC-3'	identisch mit dem Reverse-Primer der Voramplifikation Exon 8-10	60 °C	35	329

Voramp., Voramplifikation; Frag., Fragment; Ann. Temp., Annealing-Temperatur; * Sequenzier-Primer

Tab. 2: Sequenzen und Eigenschaften der für die Mutationsanalyse des *ALD*-Gens verwendeten Primer, PCR-Bedingungen sowie Fragmentlängen der amplifizierten Produkte. Die in der Sequenzier-Reaktion verwendeten Primer sind mit einem Stern (*) markiert.

2.1.3. Nicht-radioaktive Sequenzierung der *ALD*-Fragmente mittels *Cycle Sequencing*

Die nicht-radioaktive Sequenzierung von PCR-Produkten mittels *Cycle Sequencing* beruht wie die radioaktive Sequenzierung auf der Kettenabbruch-Methode (Sanger *et al.*, 1977). Bei der nicht-radioaktiven Methode werden statt eines radioaktiv markierten Nukleotids vier mit Fluorescein-Farbstoffen markierte Didesoxynukleotide (Terminatoren) verwendet. Der

Einbau der markierten Nukleotide erfolgt in einer PCR-Reaktion mit nur einem Primer. Da jedes Nukleotid mit einem anderen Farbstoff markiert ist, wird nur ein Sequenzier-Ansatz benötigt.

Die PCR-Produkte der 13 Fragmente des *ALD*-Gens wurden zunächst mit Hilfe des PCR Purification Kits (Fa. Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers gereinigt und mit Wasser eluiert. Hierbei wurden überschüssige Nukleotide und Primer der PCR-Reaktion entfernt. Zur Überprüfung der Reinigung sowie zur Quantifizierung des gereinigten PCR-Produkts wurden noch einmal 10 μl auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen. Je nach Konzentration des PCR-Produkts wurden anschließend 0,5 - 2 μl des Produkts mit einem der beiden für die PCR-Reaktion verwendeten Primer in einem 5 μl -Ansatz sequenziert. Hierfür wurde der Ready Reaction dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Kit mit *AmpliTaq* Polymerase FS (Fa. Applied Biosystems/Perkin Elmer, Weiterstadt) verwendet. Die für die Sequenzierreaktion verwendeten Primer sind in Tabelle 2 mit einem * gekennzeichnet.

Sequenzieransatz:

Gereinigtes PCR-Produkt	0,5 - 2 μl
Sequenzier-Primer (10 pmol/ μl)	1 μl
Ready Reaction Mix	2 μl
Bidestilliertes Wasser	ad 5 μl

PCR-Programm:

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	96 °C	15 sec	
Annealing	55 °C	15 sec	25 x
Elongation	60 °C	4 min	

Nach der Sequenzierreaktion wurden die Proben gereinigt, um nicht eingebaute, fluoreszenzmarkierte Nukleotide zu entfernen. Hierfür wurden die Produkte durch die Zugabe von 12,5 μl unvergälltem Alkohol (100 %) und 0,5 μl Na-Acetat (2 M) präzipitiert. Anschließend wurde 20 min bei 14.000 U/min und 4 °C zentrifugiert, die Pellets in 100 μl 70 %-igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und der flüssige Überstand möglichst vollständig abpipettiert. Anschließend wurden die Sequenzierproben ca. 1 Stunde lang bei

60 °C im Wärmeschrank getrocknet.

Die Proben wurden im gemeinsamen Sequenzierlabor der Innenstadtkliniken München auf einem 377 DNA Sequencer (Fa. Applied Biosystems/Perkin Elmer, Weiterstadt) analysiert. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe des Computerprogrammes Sequence Navigator™ der Fa. Applied Biosystems/Perkin Elmer (Weiterstadt).

2.2. Untersuchung der X-Inaktivierung

2.2.1. Prinzip des Androgenrezeptor-Testes

Die X-Inaktivierung der ALD-Überträgerinnen wurde mit Hilfe eines hochpolymorphen Trinukleotid-Repeats im Androgen-Rezeptor-Gen (HUMARA; Gen Bank accession number M21748) bestimmt. Dieser Marker ermöglicht bei Frauen, die bezüglich dieses Markers heterozygot sind, die Unterscheidung der beiden X-Chromosomen und damit die Anwendung des Testes. Dies ist bei ca. 90 % aller Frauen der Fall (Heterozygotenindex 0,9). Es handelt sich um einen CAG-Repeat, der für 11 - 31 Glutamin-Reste im Exon 1 des Gens codiert (Edwards *et al.*, 1992). In einem Bereich von 80 Basenpaaren 5'-stromaufwärts des Repeats befinden sich CpG-Inseln, die mehrere Schnittstellen der methylierungssensitiven Restriktionsenzyme *HpaII* und *CfoI* enthalten. Ihr Methylierungsstatus korreliert mit der X-Inaktivierung, wobei das methylierte Allel inaktiv ist. Die kurze Entfernung zwischen den Schnittstellen und dem Polymorphismus ermöglicht die Anwendung einer PCR-Analyse anstelle eines methodisch aufwendigen Southern Blots. Die Primer für die PCR wurden so gewählt, daß sie die Schnittstellen sowie den CAG-Repeat flankieren. Die erwarteten Fragmente sind zwischen 180 und 250 bp lang. Um eine automatisierte Auswertung der Ergebnisse mittels Fragmentanalyse zu ermöglichen, wurde der forward-Primer mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markiert. Nach Inkubation der genomischen DNA mit den methylierungssensitiven Restriktionsenzymen *HpaII* und *CfoI* können nur noch die inaktivierten Allele des Androgenrezeptors (AR) amplifiziert werden, da sie durch die Methylierung der Enzymschnittstellen vor einem Restriktionsverdau geschützt sind. Im Falle einer *random* X-Inaktivierung liegen nach dem Restriktionsverdau beide Allele in annähernd gleichen Mengen vor. Ist bevorzugt ein X-Chromosom inaktiviert, so wird das AR-Allel dieses Chromosoms nach dem Verdau vermehrt amplifiziert. Im Extremfall einer *non-random*

X-Inaktivierung ist nach dem Restriktionsverdau nur noch eines der beiden Allele nachweisbar.

Die Methode wurde erstmals 1992 von Allen *et al.* beschrieben und wurde für die vorliegende Arbeit durch die Verwendung eines fluoreszenzmarkierten Primers modifiziert. Darüberhinaus wurden methodische Verbesserungen, wie eine Reduzierung der bevorzugten Amplifikation des kürzeren Allels in der PCR, erarbeitet sowie Kontroll-Restriktionsverdaus eingeführt (siehe hierzu 3.2.1).

2.2.2. Durchführung des Testes

2.2.2.1. Restriktionsverdau genomischer DNA

Die Konzentration der DNA wurde mittels Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch bestimmt und 10 μl einer 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ -Verdünnung hergestellt. In 4 Ansätzen wurden jeweils 0,5 μg DNA mit den Restriktionsenzymen *RsaI* und *MspI*, sowie mit *HpaII/RsaI* und *CfoI/RsaI* im Doppelverdau quantitativ verdaut (Restriktionsenzyme: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim).

Einzelrestriktionsverdau mit <i>RsaI</i> bzw. <i>MspI</i>		Doppelrestriktionsverdau mit <i>HpaII/RsaI</i> bzw. <i>CfoI/RsaI</i>	
genomische DNA (0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	2,5 μl	genomische DNA (0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	2,5 μl
10 x-Puffer L	1,5 μl	10 x-Puffer L	1,5 μl
<i>RsaI</i> oder <i>MspI</i> (10 U/ μl)	2,0 μl	<i>HpaII</i> oder <i>CfoI</i> (10 U/ μl)	2,0 μl
		<i>RsaI</i> (10 U/ μl)	2,0 μl
Bidestilliertes Wasser	9,0 μl	Bidestilliertes Wasser	7,0 μl

Die Reaktionsansätze wurden über Nacht im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde nochmals Restriktionsenzym (je 2 μl in einem Gesamtvolumen von 5 μl) zugegeben und für weitere 7 Stunden inkubiert, um die Vollständigkeit des Restriktionsverdaus sicherzustellen.

2.2.2.2. Amplifikation des polymorphen CAG-Repeats im Androgenrezeptor

Die PCR-Amplifikation des CAG-Repeats erfolgte mit Goldstar DNA Polymerase (Fa. Eurogentec, Seraing, Belgien) in 50 μ l-Ansätzen. Bei diesem PCR-System ist kein $MgCl_2$ im 10 x-Standardpuffer enthalten und muß daher gesondert zugegeben werden. Dadurch war es möglich, die $MgCl_2$ -Menge zu berücksichtigen, die mit der Zugabe der DNA aus dem Restriktionsverdau in den PCR-Ansatz gelangte (Puffer L enthält 10 mM $MgCl_2$). Der Forward-Primer der PCR wurde mit dem Fluoreszenz-Farbstoff FAM (5-Carboxy-Fluorescein) markiert, um die Fragmentanalyse auf einem automatischen Sequencer zu ermöglichen.

Verwendete Primer:

AR-1-FAM: FAM-5'-GCG CGA AGT GAT CCA GAA G-3' (*forward*)

AR-3: 5'-GCC TCT ACG ATG GGC TTG-3' (*reverse*)

PCR-Ansatz:

DNA, quantitativ verdaut	2,5 μ l
Primer AR-1-FAM (10 pmol)	1,0 μ l
Primer AR-2 (10 pmol)	1,0 μ l
10 x-Puffer/2 mM dNTP	5,0 μ l
$MgCl_2$ (25 mM)	1,2 μ l
Goldstar <i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/ μ l)	0,2 μ l
Bidestilliertes Wasser	39,0 μ l

Die DNA wurde vor der Zugabe zum Reaktionsansatz mit Hilfe einer Pipette resuspendiert.

PCR-Programm:

Schritt		Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiation		95 °C	5 min	1 x
Amplifikation	Denaturierung	95 °C	1 min	
	Annealing	53 °C	45 sec	30 x
	Elongation	72 °C	45 sec	
Auffüllreaktion		72 °C	5 min	1 x

Um das Ergebnis der PCR-Reaktion zu überprüfen, wurden die Produkte auf ein 1 %-iges Agarosegel (DNA Agarose, Fa. Biozym Diagnostics, Hessisch Oldendorf) aufgetragen und visualisiert. Die zu erwartende Länge der amplifizierten Fragmente beträgt zwischen 180 und 250 bp.

Etablierung der PCR

Für eine Optimierung der PCR wurden u. a. verschiedene DNA Polymerasen nach den jeweiligen Angaben des Herstellers eingesetzt: *Taq* DNA Polymerase der Firma Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) und der Firma Promega (Mannheim). Darüberhinaus *AmpliTaq* Gold (Fa. Perkin Elmer, Weiterstadt) und *Pfu*-Polymerase mit und ohne Exonukleasetätigkeit (Fa. Stratagene, Heidelberg).

Um die Amplifikation des CAG-Repeats zu verbessern, wurde dGTP (Endkonzentration 0,2 mM) vollständig oder anteilig (75 % der dGTP-Konzentration) durch 7-deaza-2'-dGTP (deaza-dGTP) der Firma Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) ersetzt.

Neben dem oben beschriebenen PCR-Programm wurden *Hotstart*- und *Touchdown*-Programme getestet. Diese Techniken werden bei GC-reichen bzw. schwer zu amplifizierenden Fragmenten angewandt. Um eine bessere Trennung der Doppelstränge zu erzielen, wird bei einer *Hotstart*-PCR die initiale Denaturierung auf 10 - 15 min und die der einzelnen Zyklen auf 90 sec verlängert. Hierbei wird die DNA Polymerase zur Schonung des Enzyms erst unmittelbar nach der verlängerten initialen Denaturierung zugegeben. Das Enzym *AmpliTaq* Gold (Fa. Perkin Elmer, Weiterstadt) erfordert für seine Aktivierung eine mindestens 10-minütige initiale Denaturierung, die einer *Hotstart*-PCR entspricht.

Bei einer *Touchdown*-PCR wird die Amplifikation bei einer höheren Annealing-Temperatur begonnen. Diese wird in ca. 10 Zyklen von Zyklus zu Zyklus um 0,5 °C gesenkt bis die gewünschte Temperatur erreicht ist, bei der dann weitere 20 - 25 Zyklen amplifiziert wird.

2.2.2.3. Fragmentanalyse

Die Fragmentanalyse erfolgte auf einem automatischen 377 DNA Sequencer (Fa. ABI Perkin Elmer, Weiterstadt). Die Androgenrezeptor-Fragmente wurden durch den Primer mit dem Fluoreszenz-Farbstoff FAM markiert. Zusammen mit dem internen Längenstandard ROX-350 (Fa. ABI Perkin Elmer, Weiterstadt) wurden sie auf ein denaturierendes Acrylamidgel aufgetragen und entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte mittels der Genescan Analysis-Software™ (Fa. ABI Perkin Elmer, Weiterstadt). Anhand des internen Standards wurde die Länge der Fragmente ermittelt. Zur Quantifizierung der Produktmenge der einzelnen Banden wurden Peakhöhe und Peakfläche herangezogen.

Im Detail wurden die markierten PCR-Produkte 1:5 verdünnt und mit Längenstandard versetzt. Unmittelbar vor dem Auftragen der Proben wurde Formamid und EDTA/Dextran Blue-Auftragspuffer (Fa. ABI Perkin Elmer, Weiterstadt) zugegeben, die Fragmente 2 min bei 96 °C denaturiert und auf Eis gekühlt. 1,8 µl wurden auf das Fragmentgel aufgetragen (4,5 % Polyacrylamid/6 M Harnstoff). Die Laufzeit betrug 2,2 Stunden.

Probenvorbereitung:

Markiertes PCR-Produkt (1:5 verdünnt)	1,5 µl
ROX-350 Längenstandard	0,5 µl
Formamid	0,5 µl
EDTA/Dextran Blue-Auftragspuffer	2,5 µl

2.2.2.4. Berechnung des X-Inaktivierungsverhältnisses

Die Berechnung des X-Inaktivierungsverhältnisses erfolgte über die Peakfläche der Fragmente. Zunächst wurden PCR-bedingte Amplifikationsunterschiede zwischen den Allelen anhand der Fragmente nach *RsaI*-Verdau (entspricht einer unverdauten Kontrolle) ausgeglichen. Mit ihrer Hilfe wurden Korrekturfaktoren für beide Allele errechnet, mit denen die Peakflächen der Fragmente nach *HpaII/RsaI* - und *CfoI/RsaI* -Verdau multipliziert wurden. Die korrigierten Peakflächen wurden dann zur Berechnung der X-Inaktivierungsverhältnisse herangezogen.

Berechnung der Korrekturfaktoren:

Korrekturfaktor für das kürzere Allel:	Korrekturfaktor für das längere Allel:
Peakfläche des kürzeren Allels / Mittelwert aus den Peakflächen beider Allele	Peakfläche des längeren Allels / Mittelwert aus den Peakflächen beider Allele

Berechnung des Inaktivierungsverhältnisses:

<i>HpaII/RsaI</i> bzw. <i>CfoI/RsaI</i> Allel 1	<i>HpaII/RsaI</i> bzw. <i>CfoI/RsaI</i> Allel 2
Peakfläche des kürzeren Allels x 100 / Summe der Peakflächen beider Allele	Peakfläche des längeren Allels x 100 / Summe der Peakflächen beider Allele

Die errechneten Inaktivierungsverhältnisse wurden anschließend auf die nächsten 5 gerundet (Pegoraro *et al.*, 1994).

Proben, deren Ergebnisse sich nach *HpaII/RsaI* und *CfoI/RsaI* –Verdau (vor dem Runden auf die nächsten 5) um mehr als 15 Prozentpunkte unterschieden, wurden als nicht interpretierbar betrachtet und von der Beurteilung ausgeschlossen.

2.2.3. Sequenzierung der Restriktionsschnittstellen

Um Polymorphismen im Bereich der Schnittstellen als mögliche Ursache für die unterschiedlichen Inaktivierungsmuster nach *HpaII/RsaI*- und *CfoI/RsaI*-Verdau auszuschließen, wurde der Bereich der Schnittstellen sequenziert. Prinzip und Durchführung von PCR und nicht-radioaktiver Sequenzierung mittels *Cycle Sequencing* wurden unter 2.1.2. und 2.1.3. beschrieben. Für die Amplifikation wurden je 50 ng der Primer AR-4 und AR-3 verwendet. In die Sequenzier-Reaktion wurde der Primer AR-5 eingesetzt.

Verwendete Primer:

AR-3:	5'-GCC TCT ACG ATG GGC TTG-3'	(reverse)
AR-4:	5'-GGA TGG AAG TGC AGT TAG G-3'	(forward)
AR-5:	5'-TGG GAA GGG TCT ACC CTC G-3'	(forward)

2.2.4. Extraktion von RNA aus kultivierten Fibroblasten, Reverse Transkription und Sequenzierung von cDNA-Fragmenten

Die Extraktion von totaler RNA aus kultivierten Fibroblasten wurde mit Hilfe von RNAzol B (Fa. WAK Chemie, Bad Soden) durchgeführt. Die Zellen wurden trypsinisiert, in PBS-Puffer gewaschen und dann entsprechend dem Arbeitsprotokoll des Herstellers weiterverarbeitet. Die Konzentration der gewonnenen RNA wurde anschließend photometrisch mittels Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} (RNA/Protein) sollte dabei $> 1,9$ sein.

In die reverse Transkription wurden dann 4 μg RNA eingesetzt. Unter "reverser" Transkription versteht man die Transkription von RNA in komplementäre DNA (cDNA) im Gegensatz zur Transkription, bei der RNA ausgehend von DNA als Matrize synthetisiert wird. Für die cDNA-Synthese wurde der Erststrang-cDNA-Synthese-Kit der Firma Pharmacia Amersham Biotech (Freiburg) nach Angaben des Herstellers verwendet. Der Erststrang wurde dabei mit Hilfe der ALD-spezifischen Exon-Primer ALD-5 (Exon 1) und ALD-9 (Exon 10) synthetisiert.

Für die anschließende Reverse-Transkriptions-PCR (RT-PCR) wurden 2 μl des cDNA/RNA-Hybrids verwendet. Die PCR erfolgte mit dem *Taq*-DNA-Polymerase-System der Firma Boehringer mit 50 ng der jeweiligen Primer in 50- μl -Ansätzen. Die Fragmente des Exon 1 (Fragment 1 B und 1 C) wurden dabei amplifiziert und sequenziert wie unter 1.1.2. und 2.1.3. beschrieben. Die für Exon 10 verwendeten Primer werden im folgenden beschrieben. Die Sequenzierung des Exon 10-Fragments erfolgte wiederum mit den Amplifikationsprimern.

Verwendete Primer:

1. cDNA-Synthese:

ALD-5 (Exon 1):	5'-TTC TGT GCG CTC GCT CAC-3'	(reverse)
ALD-9 (Exon 10):	5'-TTC ATG TGA TCC GAG CTT G-3'	(reverse)

2. RT-PCR Exon 10:

ALD-20	5'-CTC CAT CAC CCA CCG GCC-3'	(forward)
ALD-9	5'-TTC ATG TGA TCC GAG CTT G-3'	(reverse)

2.2.5. Bestimmung der Konzentration überlangkettiger Fettsäuren (VLCFA) in Plasma und Fibroblasten

Die quantitative Bestimmung der Konzentration überlangkettiger Fettsäuren (> C 22:0) in Plasma und Fibroblasten erfolgte nach Lipidextraktion, Transmethylierung und präparativer Dünnschichtchromatographie mittels Gaschromatographie/Flammenionisationsdetektion (Moser *et al.*, 1981; Moser *et al.*, 1980) im Stoffwechsellabor des von Dr. von Haunerschen Kinderspitals.

2.2.6. Southern Blot Analyse

Die Untersuchung der X-Inaktivierung durch Southern Blot Analyse erfolgte am hochpolymorphen Locus DXS255 unter Verwendung einer M27 β -Sonde (Boyd & Fraser, 1990; Brown *et al.*, 1990).

Die Analysen wurden freundlicherweise von Frau Dr. hum. biol. Soheyla Chahrokh-Zadeh im Institut für Pädiatrische Genetik der Universität München durchgeführt.

2.3. Etablierte Methoden

Die hier aufgeführten Standardmethoden wurden zur Erstellung der vorliegenden Arbeit verwendet (Sambrook *et al.*, 1989). Ergänzungen und Modifikationen dieser Methoden sind bei ihrer Anwendung angegeben.

- Ethanolpräzipitation genomischer DNA und DNA-Fragmente
- Konzentrationsbestimmung von DNA
- Konzentrationsbestimmung von RNA
- Agarosegelelektrophorese von DNA-Fragmenten

2.4. Patientenkollektiv und Kontrollen

In Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 30 Familien mit mindestens einem ALD-Indexfall untersucht.

Bei 15 Familien lagen die Ergebnisse der Mutationsanalyse bereits vor. Bei den übrigen 15 Familien wurde eine Mutationsanalyse des *ALD*-Gens im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. In diesen Familien gibt es 16 hemizygoter ALD-Patienten, bei denen 4 phänotypische Ausprägungen der Erkrankung unterschieden werden können: CCALD (9), AMN (1), ADO (1) und ein Patient, der zum Zeitpunkt der Untersuchung im Alter von 9 Jahren bei deutlich erhöhten VLCFA asymptomatisch war. Bei 4 Patienten stand keine Information bezüglich des klinischen Phänotyps der Erkrankung zur Verfügung.

Für die Untersuchung der X-Inaktivierungsmuster heterozygoter ALD-Mutationsträgerinnen stand DNA (präpariert aus EDTA-Blut) von 32 molekulargenetisch gesicherten ALD-Überträgerinnen und 10 molekulargenetisch gesicherten Nicht-Überträgerinnen aus insgesamt 30 ALD-Familien zur Verfügung. Die Frauen waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme zwischen 10 und 61 Jahre alt (mittleres Alter 40,8 Jahre). Mit einer Ausnahme (W-49) konnte bei allen Überträgerinnen die Mutation des Index-Patienten molekulargenetisch nachgewiesen, bzw. bei den Nicht-Überträgerinnen ausgeschlossen werden. Bei W-49 handelt es sich aufgrund eines erkrankten Sohnes und eines weiteren betroffenen Familienmitgliedes definitionsgemäß um eine obligat heterozygote Überträgerin. Darüberhinaus konnten erhöhte VLCFA im Plasma nachgewiesen werden.

Plasma zur Bestimmung der Konzentrationen der VLCFA stand mit Ausnahme von drei Frauen von allen Überträgerinnen und Nicht-Überträgerinnen zur Verfügung.

Die X-Inaktivierungsmuster in kultivierten Hautfibroblasten konnten in drei Zell-Linien von ALD-Überträgerinnen und einer Zell-Linie einer Nicht-Überträgerin einer ALD-Familie analysiert werden. Von einer heterozygoten Mutationsträgerin (XALD-37/MT-11) standen sowohl Blut als auch kultivierte Hautfibroblasten zur Verfügung. Auch in den Hautfibroblasten wurden die Konzentrationen der VLCFA bestimmt.

Neben den Frauen des Patienten-Kollektivs wurde die X-Inaktivierung auch in einem Kontroll-Kollektiv bestehend aus 40 gesunden Frauen untersucht. In den Familien des Kontroll-Kollektivs bestand kein Hinweis auf das Vorliegen einer X-chromosomal vererbten Erkrankung. Die Frauen des Kontroll-Kollektivs waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme zwischen 21 und 61 Jahre alt (mittleres Alter 38,6 Jahre).

3. Ergebnisse

3.1. Mutationsanalyse des *ALD*-Gens

Zur Konfirmation der Ergebnisse der biochemischen Identifizierung von *ALD*-Überträgerinnen ist für wissenschaftliche Zwecke der Nachweis einer heterozygoten Mutation im *ALD*-Gen erforderlich. Bei 15 der 30 *ALD*-Familien waren diese Daten noch nicht erhoben und eine Mutationsanalyse wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt.

Hierfür wurden zunächst die 10 Exons des *ALD*-Gens der Index-Patienten, ausgehend von Leukozyten-DNA amplifiziert und sequenziert. Anhand der identifizierten Mutation der Index-Patienten erfolgte dann die Untersuchung der übrigen Familienmitglieder. Besondere Aufmerksamkeit galt dabei den potenziellen Überträgerinnen einer Familie, deren Überträgerstatus mittels biochemischer oder immunchemischer Methoden oftmals nicht mit letzter Sicherheit geklärt werden kann.

Nur bei einer Familie (M) mußte eine andere Vorgehensweise angewandt werden. Der Index-Patient der Familie war einige Jahre zuvor an einer *CCALD* verstorben. Eine Mutationsanalyse des *ALD*-Gens war zum damaligen Zeitpunkt nicht verfügbar. DNA oder andere Gewebeproben des Index-Patienten standen für eine Untersuchung nicht mehr zur Verfügung. Die Mutter war aufgrund erhöhter Konzentrationen von VLCFA im Blut als *ALD*-Überträgerin identifiziert worden (Moser *et al.*, 1999; Moser *et al.*, 1983). Bei einer erneuten Schwangerschaft ergab die Bestimmung der überlangkettigen Fettsäuren (VLCFA) in fetalen Amnionzellen im Rahmen der pränatalen Diagnostik zunächst keinen eindeutigen Befund. Daher wurde DNA aus Leukozyten der Mutter im Vergleich zu fetaler DNA aus Amnionzellen über den gesamten kodierenden Bereich des *ALD*-Gens hinweg sequenziert. Bei der Mutter konnte eine heterozygote 2 bp-Deletion im Exon 5 nachgewiesen werden, während sich in der fetalen DNA keine Mutation innerhalb des *ALD*-Gens fand (Abb. 4). Das Vorliegen einer *X-ALD* konnte so beim Fetus sicher ausgeschlossen werden. Dieser Fall macht deutlich, daß die Möglichkeit des sicheren Nachweises heterozygoter Mutationen im *ALD*-Gen nicht nur für die Identifizierung von *ALD*-Überträgerinnen, sondern unter besonderen Umständen auch für eine zuverlässige pränatale Diagnose von essentieller Bedeutung sein kann (Maier *et al.*, 1999).

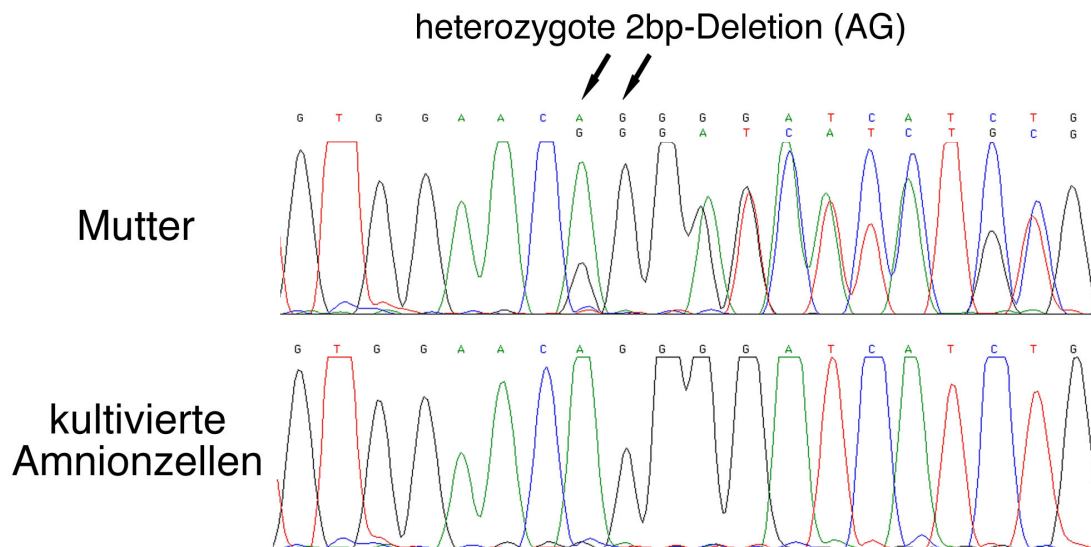


Abb. 4: Mutationsanalyse im Exon 5 des *ALD*-Gens. In Leukozyten-DNA der Mutter zeigt sich eine 2 bp-Deletion (del 1801-02 ag) in heterozygotem Zustand. Die DNA aus kultivierten fetalen Amnionzellen hingegen zeigt an dieser Stelle die Wildtyp-Sequenz.

In allen 15 Familien, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, konnte eine Mutation im *ALD*-Gen nachgewiesen werden (Tab. 3). Durch die Untersuchung von 24 weiblichen Familienmitgliedern konnten 16 heterozygote Mutationsträgerinnen identifiziert werden. Bei 8 Frauen konnte die familiäre Mutation im *ALD*-Gen sicher ausgeschlossen werden. Hierbei zeigte sich das Vorliegen einer Spontanmutation beim Index-Patienten in einer der Familien (J) (6 %) (Abb. 6, mittlere Spalte). Das Mutationsspektrum umfaßte 10 Missense- (67 %), zwei Nonsense- (13 %), zwei Splice-Site-Mutationen (13 %) und eine Frameshift-Mutation (6 %). Bei 8 der 15 identifizierten Mutationen (53 %) handelte es sich um neue, zuvor nicht in der Literatur beschriebene Mutationen (Stand: 01.07.01). Die betreffenden Familien sind in Tabelle 3 durch Fettdruck hervorgehoben. Ausschnitte aus den Elektropherogrammen der Wildtyp-Sequenz, der Mutation im hemizygoten (Patient) und im heterozygoten Zustand (Überträgerin) sind in den Abbildungen 5 – 7 dargestellt. In 5 Familien (B, C, D, F, J) wurden *Missense*-Mutationen nachgewiesen, die zu einem Aminosäure-Austausch an einer bei den humanen peroxisomalen Halbtransportern konservierten Position führen (Shani *et al.*, 1996). Familie B (Abb. 5, linke Spalte) zeigt eine Transition von T zu C an Nukleotidposition 865, die in einem Austausch der Aminosäure Leucin gegen Prolin an Position 160 resultiert (L160P). Eine Transversion von T zu A an Nukleotidposition 1009 führt bei Familie C (Abb. 5, mittlere Spalte) zu einem Austausch der Aminosäure Valin gegen Glutamin an Position 208 (V208E). In Familie D (Abb. 5, rechte Spalte) wird der Aminosäureaustausch Serin zu Cystein an Position 213 (S213C) durch eine Transversion von C nach G an Nukleotidposition

1024 verursacht. Eine weitere Transversion (g1240c) führt in Familie F (Abb. 6, linke Spalte) zu einem Austausch der Aminosäure Arginin zu Prolin an Position 285 (R285P). Die vier genannten Punktmutationen fanden sich in Exon 1 und haben den Austausch einer konservierten Aminosäure innerhalb der Membrandomäne des ALDP zur Folge. In Exon 8 (Abb. 6, mittlere Spalte) konnte eine weitere Missense-Mutation nachgewiesen werden, die aufgrund einer Transition von G nach A an Nukleotidposition 2209 zu einem Austausch der Aminosäure Glycin nach Asparagin führt (Familie J). Diese Mutation liegt in der C-Sequenz des ALDP, einer hochkonservierten Proteindomäne, die sich bei allen bislang identifizierten ABC-Transportern findet (Shani *et al.*, 1996). Keine der 5 genannten *Missense*-Mutationen konnte mittels Sequenzierung bzw. Restriktionsverdau bei 50 nicht-verwandten Blutspendern nachgewiesen werden (Daten werden nicht abgebildet). Damit wurde ausgeschlossen, daß es sich bei den identifizierten Mutationen um Polymorphismen innerhalb des *ALD*-Gens handelt. In Exon 10 konnte eine *Nonsense*-Mutation (Abb. 6, rechte Spalte) identifiziert werden, die durch eine Transition von C zu T zu einem Stop-Codon an Position 672 führt und damit einen vorzeitigen Kettenabbruch nach Aminosäure 671 (Q672X) und den Verlust der C-terminalen 74 Aminosäuren des ALDP zur Folge hat (Familie L). Diese Mutation wurde in einer Originalarbeit vorveröffentlicht (Holzinger *et al.*, 1998).

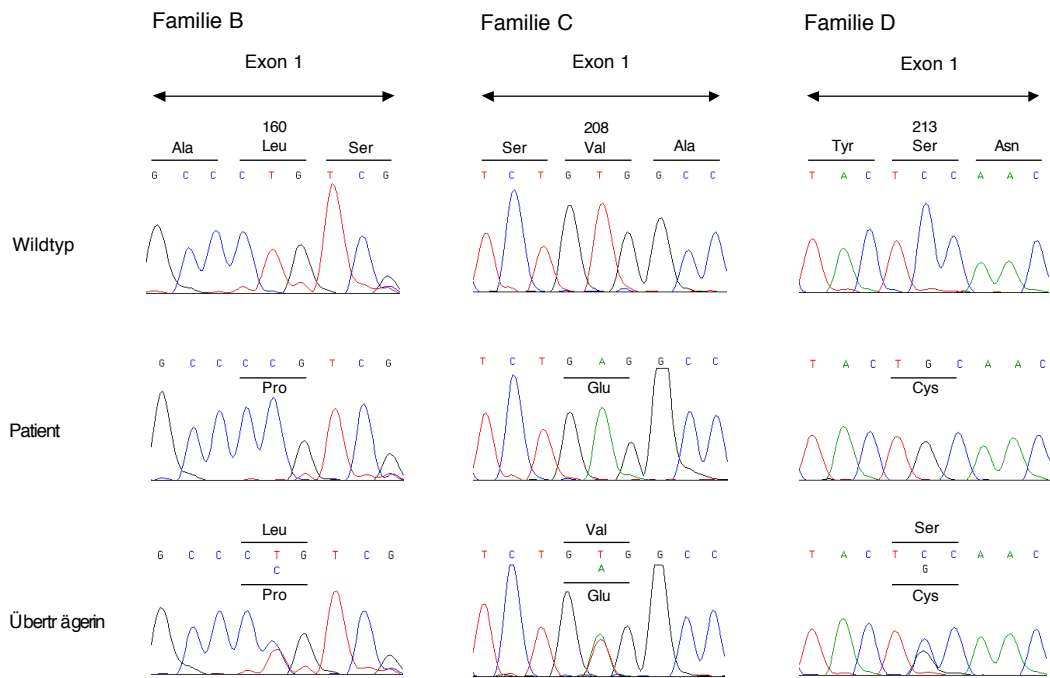


Abb. 5: Missense-Mutationen im Exon 1 des ALD-Gens. Abgebildet ist jeweils die Wildtyp-Sequenz, die hemizygot Mutation der betreffenden Familie beim Index-Patienten sowie die heterozygote Mutation der Mutter als Überträgerin. **Familie B:** eine Transition von T zu C führt zu einem Austausch von Leucin zu Prolin an Position 160 der Aminosäuresequenz (L160P). **Familie C:** die Transversion von T zu A resultiert in einem Austausch der Aminosäure Valin gegen Glutamin an Position 208 (V208E) der Aminosäuresequenz. **Familie D:** der Aminosäureaustausch von Serin zu Cystein an Position 213 (S213C) wird durch eine Transversion von C nach G verursacht. Die Ergebnisse der Mutationsanalyse der übrigen untersuchten Familienmitglieder sind in Tabelle 3 aufgelistet.

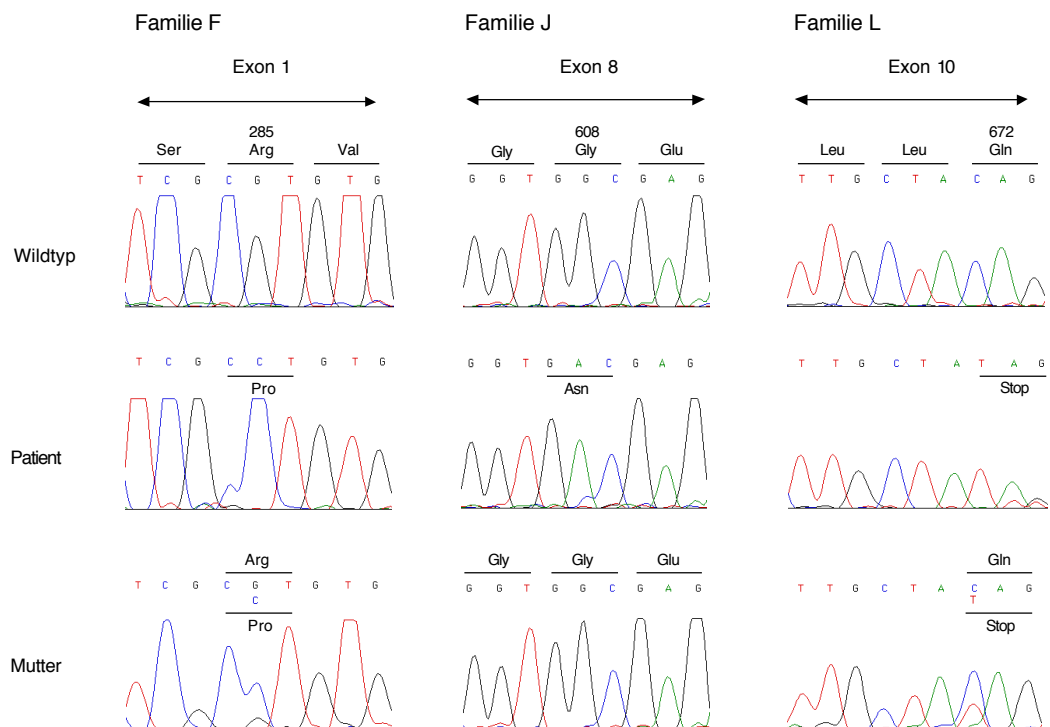


Abb. 6: Zwei Missense- und eine Nonsense-Mutation im ALD-Gen. Abgebildet ist jeweils die Wildtyp-Sequenz, die hemizygot Mutation des Index-Patienten der betreffenden Familie sowie die Sequenz der Mutter als potenzielle Überträgerin. Bei Familie F und L konnte die Heterozygotie bezüglich X-ALD durch die Mutationsanalyse eindeutig bewiesen werden. Bei Familie J fand sich eine Spontanmutation des Index-Patienten. Die Mutter des Index-Patienten zeigt Wildtyp-Sequenz. **Familie F:** eine Transversion von G zu C in Exon 1 führt zu einem Austausch von Arginin zu Prolin an Position 285 der Aminosäuresequenz (R285P). **Familie J:** die Transition von G zu A in Exon 8 resultiert in einem Austausch der Aminosäure Glycin gegen Asparagin an Position 608 (V208E) der Aminosäuresequenz. **Familie L:** die Transition von C zu T in Exon 10 führt zu einem Stop-Codon an Position 672 der Aminosäuresequenz und damit zu einem Abbruch der Translation. Die Ergebnisse der Mutationsanalyse der übrigen untersuchten Familienmitglieder sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Darüberhinaus wurden zwei neue Splice-Site-Mutationen (Familie N und O) nachgewiesen (Abb. 7). Eine dieser Mutationen findet sich an der Donorstelle (GT) zu Beginn des Intron 1 und wird durch eine Transition von G zu A an Nukleotidposition 1268, +1 verursacht. Bei der anderen handelt es sich um eine Mutation der Akzeptorstelle (AG) am Ende von Intron 3. Hier zeigte sich eine Transition von A zu G an Nukleotidposition 1611, -2. Die Auswirkungen der beiden Splice-Site-Mutationen auf Transkript-Ebene konnten nicht gezeigt werden, da keine mRNA von Mitgliedern der betroffenen Familien für eine Untersuchung zur Verfügung stand.

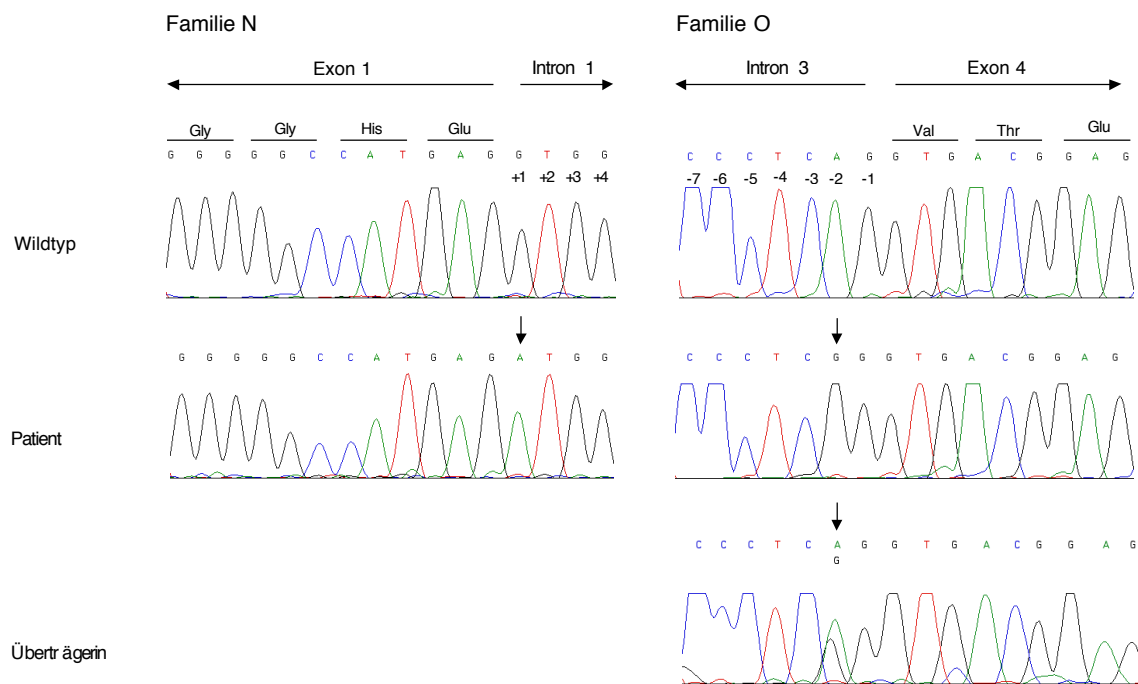


Abb. 7: Zwei Splice-Site-Mutationen im ALD-Gen. Abgebildet ist jeweils die Wildtyp-Sequenz, die hemizygoten Mutation des Index-Patienten der betreffenden Familie sowie die heterozygote Mutation der Mutter als Überträgerin bei Familie O. **Familie N:** Transition von G zu A an Nukleotidposition 1268, +1 zu Beginn von Intron 1 (Donorstelle). **Familie O:** Transition von A zu G an Nukleotidposition 1611, -2 am Ende von Intron 3 (Akzeptorstelle). Beide Mutationen liegen innerhalb der hochkonservierten GT-AG-Konsensus-Sequenz.

In den übrigen 7 Familien (A, E, G, H, I, K und M) wurden Mutationen (S108W, G277W, G512S, P543L, P560L, Q466X und del 1801-02 ag) identifiziert, die bereits früher mit X-ALD assoziiert gefunden worden waren und als X-ALD verursachende Mutationen gelten (Braun *et al.*, 1995; Feigenbaum *et al.*, 1996; Kemp *et al.*, 1994; Kok *et al.*, 1995).

Die einzelnen familiären Mutationen, gegliedert nach Mutationsart und Exon-Lokalisation, sind in Tabelle 3 aufgelistet. Die Daten bezüglich der immunologischen Nachweisbarkeit von ALD-Protein wurden zur Vervollständigung der Tabelle einem Übersichtsartikel von Smith *et al.* aus dem Jahr 1999 entnommen.

Tab. 3: Mutationen im *ALD*-Gen.

Missense-Mutationen						
Familie	untersuchte Familienmitglieder	Aminosäure-Austausch	Nukleotid-Austausch ⁺	Exon	Protein	Phänotyp
A	XALD-57 Patient	S108W	c709g	1	verm. ¹	nicht bekannt
	XALD-58 Patient	S108W	c709g	1	verm. ¹	nicht bekannt
	XALD-61/MT-24 Mutter	S108W	c709g	1	verm. ¹	heterozygote Mutationsträgerin
B	XALD-63 Patient	L160P	t865c	1	n. u. ¹	nicht bekannt
	XALD-92 Bruder	-	-	-	-	nicht betroffen
	XALD-90/MT-18 Mutter	L160P	t865c	1	n. u. ¹	heterozygote Mutationsträgerin
	XALD-119 Patient	V208E	t1009a	1	n. u. ¹	CCALD
	XALD-120/MT14 - Mutter	V208E	t1009a	1	n. u. ¹	heterozygote Mutationsträgerin
	XALD-123/MT-21 Schwester	V208E	t1009a	1	n. u. ¹	heterozygote Mutationsträgerin
	XALD-122 Bruder	-	-	-	-	nicht betroffen
	XALD-124 Bruder	-	-	-	-	nicht betroffen
D	XALD-35 Patient	S213C	c1024g	1	n. u. ¹	CCALD
	XALD-36 Patient	S213C	c1024g	1	n. u. ¹	CCALD
	XALD-37/MT-11 Mutter	S213C	c1024g	1	n. u. ¹	heterozygote Mutationsträgerin
	XALD-47 Großmutter	-	-	-	-	keine Mutationsträgerin
E	XALD-62 Patient	G277W	g1215t	1	n. u. ¹	CCALD
	XALD-88 Mutter	G277W	g1215t	1	n. u. ¹	heterozygote Mutationsträgerin
	XALD-89/NMT-7 Tante	-	-	-	-	keine Mutationsträgerin
F	XALD-71 Patient	R285P	g1240c	1	n. u. ¹	CCALD
	XALD-72 Mutter	R285P	g1240c	1	n. u. ¹	heterozygote Mutationsträgerin
G	XALD-73 Patient	G512S	g1920a	6	verm. ¹	AMN
	XALD-75/MT-3 Mutter	G512S	g1920a	6	verm. ¹	heterozygote Mutationsträgerin
	XALD-76/NMT-6 Schwester	-	-	-	-	keine Mutationsträgerin
	XALD-77/NMT-1 Schwester	-	-	-	-	keine Mutationsträgerin
H	XALD-79 Patient	P543L	c2014t	6	negativ	asymptomatisch bei erhöhten VLCFA
	XALD-78/MT-9 Mutter	P543L	c2014t	6	negativ	AMN, symptomatische Mutationsträgerin
	XALD-80/NMT-4 Schwester	-	-	-	-	keine Mutationsträgerin
	XALD-81 Schwester	-	-	-	-	keine Mutationsträgerin
I	XALD-96 Patient	P560L	c2065t	7	verm. ¹	CCALD
	XALD-97/MT-19 Mutter	P560L	c2065t	7	verm. ¹	heterozygote Mutationsträgerin
	XALD-98/MT-16 Schwester	P560L	c2065t	7	verm. ¹	heterozygote Mutationsträgerin
	XALD-99/MT-20 Schwester	P560L	c2065t	7	verm. ¹	heterozygote Mutationsträgerin
J	XALD-106 Patient	G608N	g2209a	8	n. u. ¹	CCALD - Spontanmutation
	XALD-107 Bruder	-	-	-	-	nicht betroffen
	XALD-108 Mutter	-	-	-	-	keine Mutationsträgerin

Nonsense-Mutationen						
Familie	untersuchte Familienmitglieder	Position	Nukleotid-Austausch ⁺	Exon	Protein	Phänotyp
K	XALD-101 Patient	Q466X	c1782t	5	n. u. ¹	nicht bekannt
	XALD-102/MT-10 Mutter	Q466X	c1782t	5	n. u. ¹	heterozygote Mutationsträgerin
L	XALD-11 Patient	Q672X	c2400t	10	negativ	ADO (<i>Addison only</i>)
	XALD-12/MT-23 Mutter	Q672X	c2400t	10	negativ	heterozygote Mutationsträgerin
	XALD-10/NMT-8 Tante	-	-	-	-	keine Mutationsträgerin

Frameshift-Mutationen						
Familie	untersuchte Familienmitglieder	Position ⁺	Effekt	Exon	Protein	Phänotyp
M	XALD-95/MT-17 Mutter	del 1801-1802 ag	Abbruch bei Codon 554	5	negativ ¹	heterozygote Mutationsträgerin
	XALD-94 Fötus	-	-	-	-	nicht betroffen

Splice Site Mutationen						
Familie	untersuchte Familienmitglieder	Position ⁺	Nukleotid-Austausch	Intron	Protein	Phänotyp
N	XALD-100 Patient	1286, +1 (codon 300)	g zu a an +1	1	n. u. ¹	CCALD
O	XALD-104 Patient	1611, -2 (codon 409)	a zu g an -2	3	n. u. ¹	CCALD
	XALD-105 Mutter	1611, -2 (codon 409)	a zu g an -2	3	n. u. ¹	heterozygote Mutationsträgerin

CCALD, Childhood Cerebral ALD; AMN, Adrenomyeloneuropathie; n. u., nicht untersucht; verm., vermindert; ¹ Daten bezüglich immunologischer Nachweisbarkeit von ALD-Protein aus Smith et al., 1999; + ATG (387); Fettdruck = neue, zuvor unveröffentlichte Mutation

3.2. Untersuchung der X-Inaktivierung

3.2.1. Etablierung und Optimierung der Methode

Das Prinzip der von uns verwendeten Methode wurde erstmals 1992 von Allen *et al.* beschrieben. Es beruht auf der PCR-Amplifikation eines hochpolymorphen CAG-Repeats im Exon 1 des Androgenrezeptor-Gens, die nach einer Inkubation von genomischer DNA mit methylierungssensitiven Restriktionsenzymen erfolgt. Die Schnittstellen zweier methylierungssensitiver Restriktionsenzyme finden sich in unmittelbarer Nähe des Repeats. Ihr Methylierungsstatus korreliert dabei mit der X-Inaktivierung des Allels. Die Methode wurde für die Zwecke dieser Arbeit modifiziert und verbessert. Die Modifikationen zielten vor allem darauf ab, PCR-bedingte Amplifikationsunterschiede zwischen verschiedenen langen Fragmenten gering zu halten und die Vollständigkeit des genomischen Restriktionsverdaus zu überprüfen. In den Abbildungen 8 und 9 wird die von uns verwendete Methode exemplarisch anhand einer *random* und einer *non-random* X-inaktivierten Probe dargestellt. Die Primer der PCR wurden so gewählt, daß sie die Schnittstellen der methylierungssensitiven Restriktionsenzyme *HpaII* und *CfoI* sowie den CAG-Repeat flankieren. Um eine automatisierte Auswertung der Ergebnisse durch eine Fragmentanalyse zu ermöglichen, wurde der *forward*-Primer mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markiert (Abb. 8 u. Abb. 9: A). Für jede Probe wurden vier verschiedene Restriktionsverdaus angesetzt (Abb. 8 u. Abb. 9: 1 - 4). Der *RsaI*-Restriktionsverdau (Abb. 8 u. Abb. 9: 1) dient der Amplifikation beider AR-Allele (paternales und maternales Allel) zur Ermittlung der Korrekturfaktoren, die in der Berechnung der X-Inaktivierungsverhältnisse eingesetzt werden (siehe 2.2.2.4.). Das Restriktionsenzym *RsaI* schneidet nicht in dem zu amplifizierenden Bereich, es entsteht ein 1800 bp langes Fragment im Bereich des Promotors und des Exon 1 des Androgenrezeptors. Diese Fragmentierung der DNA verringert eine häufig beobachtete bevorzugte Amplifikation des kürzeren Allels. Aus diesem Grund wird *RsaI* auch jedem der beiden methylierungssensitiven Restriktionsenzyme *HpaII* (Abb. 8 u. Abb. 9: 2) und *CfoI* (Abb. 8 u. Abb. 9: 3) zugegeben. Diese beiden Restriktionsenzyme schneiden nur nicht-methylierte DNA. Nach einer Inkubation der genomischen DNA mit *HpaII* und *CfoI* können also nur noch die inaktivierten Allele des Androgenrezeptors amplifiziert werden, da sie durch die Methylierung der Enzymschnittstellen vor einem Verdau geschützt sind. Bei einer *random* X-Inaktivierung (Abb. 8) liegen nach dem Restriktionsverdau beide Allele zu annähernd gleichen Teilen vor (2C u. 3C). Wird bevorzugt eines der beiden X-Chromosomen inaktiviert,

so wird das AR-Allel dieses Chromosoms nach dem Verdau stärker amplifiziert. Im extremsten Fall einer *non-random* X-Inaktivierung (Abb. 9) ist nach den methylierungssensitiven Restriktionsverdau nur noch eines der beiden Allele nachweisbar (2C u. 3C). Die Inkubation der Proben mit *HpaII* und *CfoI* in getrennten Ansätzen dient der internen Überprüfung der Ergebnisse. Die Inaktivierungsmuster müssen nach den beiden Restriktionsverdau in engen Grenzen übereinstimmen. Der Restriktionsverdau mit *MspI* (Abb. 8 u. Abb. 9: 4) überprüft die Vollständigkeit des genomischen Verdau. Dieses Restriktionsenzym erkennt die gleichen Schnittstellen und schneidet wie *HpaII*, schneidet jedoch nicht nur nicht-methylierte DNA, sondern auch methylierte. Nach *MspI*-Verdau darf keines der beiden Allele mehr amplifizierbar sein.

Zum besseren Verständnis faßt Tabelle 4 die Lokalisation der Schnittstellen in bezug auf den zu amplifizierenden Bereich, die Methylierungssensitivität und Aktivitätszustand des nach dem Restriktionsverdau amplifizierten Allels für die einzelnen verwendeten Restriktionsenzyme zusammen.

Restriktions-Enzym	Schnittstelle innerhalb des zu amplifizierenden Bereichs	Methylierungs-Sensitivität	Amplifikation nach Restriktionsverdau: AR-Allel	
			Aktiv	Inaktiviert
<i>RsaI</i>	-	-	+	+
<i>HpaII</i>	+	+	-	+
<i>CfoI</i>	+	+	-	+
<i>MspI</i>	+	-	-	-

Tab. 4: Verwendete Restriktionsenzyme des Androgenrezeptor-Testes. Lokalisation der Schnittstellen, Methylierungssensitivität und Aktivitätszustand des nach dem Restriktionsverdau amplifizierten Allels.

Random X-Inaktivierung

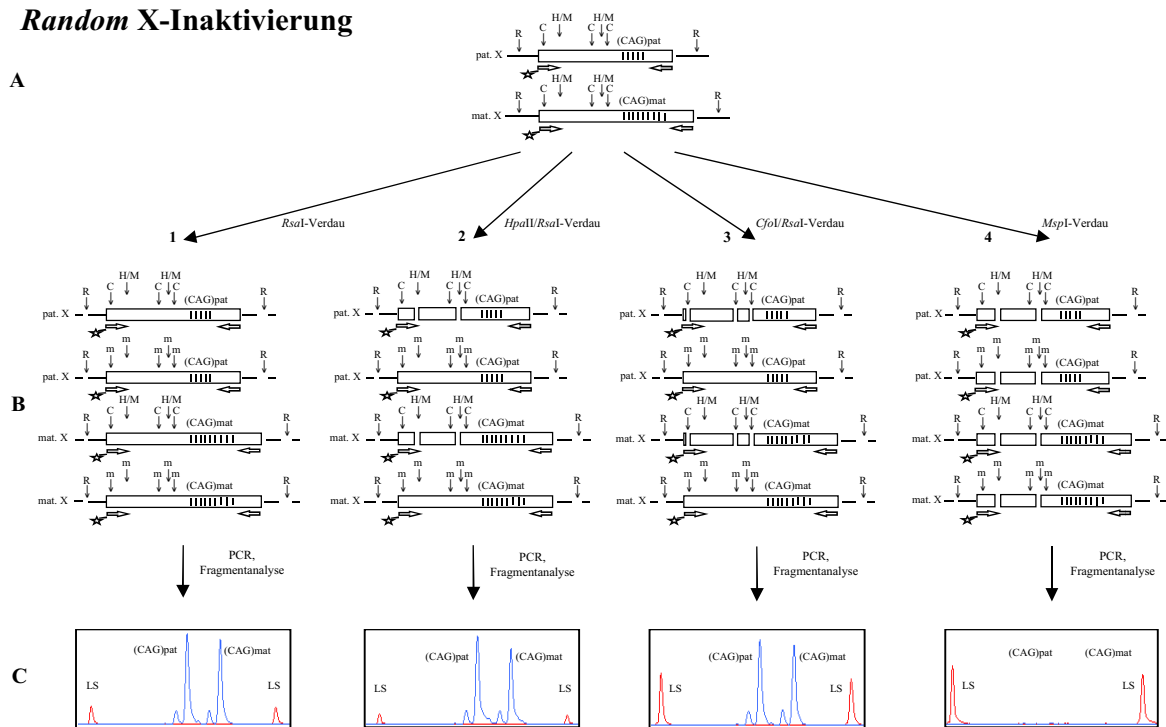


Abb. 8: Schematische Darstellung des Androgenrezeptor-Testes am Beispiel einer *random X*-Inaktivierung. Abgebildet sind ein paternales (pat. X) und ein maternales Allel (mat. X) des Androgenrezeptors (A). Die beiden Allele unterscheiden sich bezüglich ihrer Anzahl an CAG-Repeats (senkrechte Striche), wobei das paternale Allel deutlich weniger CAG-Repeats enthält und damit dem kürzeren Allel entspricht. Die beiden waagrechten Pfeile symbolisieren die Primer der PCR. Der *forward*-Primer ist mit einem Fluoreszenz-Farbstoff (Stern) markiert. Ebenfalls abgebildet sind die Schnittstellen (senkrechte Pfeile) der verwendeten Restriktionsenzyme *RsaI* (R), *HpaII* (H), *CfoI* (C) und *MspI* (M). Das Restriktionsenzym *RsaI* (1) schneidet nur außerhalb des zu amplifizierenden Bereichs (1B) und reduziert so durch eine Fragmentierung der DNA die bevorzugte Amplifikation des kürzeren Allels in der PCR, die sehr häufig bei der Amplifikation unterschiedlich langer Fragmente beobachtet wird. Der Restriktionsverdau mit *RsaI* dient der Darstellung des paternalen und des maternalen Allels in der Fragmentanalyse (1C). Die Berechnung der Fragmentlängen erfolgt mittels eines Längenstandards (LS). Das methylierungssensitive Restriktionsenzym *HpaII* (2) schneidet nur das nicht-methylierte (aktive) Androgenrezeptor-Allel. Das inaktivierte Allel ist durch Methylierung (m) vor einem Restriktionsverdau geschützt (2B) und kann in der nachfolgenden PCR amplifiziert werden. Auch diesem Ansatz wird *RsaI* zugegeben, um die bevorzugte Amplifikation des kürzeren Allels zu reduzieren. Da bei einer *random X*-Inaktivierung einmal das paternale und einmal das maternale Allel inaktiviert wird, können in der Fragmentanalyse beide Allele zu annähernd gleichen Teilen nachgewiesen werden (2C). Auch bei *CfoI* (3) handelt es sich um ein methylierungssensitives Restriktionsenzym. Nur das nicht-methylierte (aktive) Androgenrezeptor-Allel wird geschnitten (3B). Diesem Ansatz wird ebenfalls *RsaI* zugegeben, um die bevorzugte Amplifikation des kürzeren Allels in der PCR zu reduzieren. Nur die inaktivierten, methylierten (m) Allele werden amplifiziert und in der Fragmentanalyse nachgewiesen. Die Ergebnisse nach *HpaII/RsaI*-Restriktionsverdau (2C) und *CfoI/RsaI*-Restriktionsverdau (3C) müssen sich entsprechen. Das Restriktionsenzym *MspI* (4) und *HpaII* erkennen die gleichen Schnittstellen, jedoch schneidet *MspI* unabhängig vom Methylierungszustand der DNA, d. h. methyliertes und nicht-methyliertes Allel (4B). Nach Amplifikation und Fragmentanalyse darf keines der beiden Allele mehr nachweisbar sein (4C). Der *MspI*-Restriktionsverdau dient der Überprüfung der Vollständigkeit des Restriktionsverdau.

Non-random X-Inaktivierung

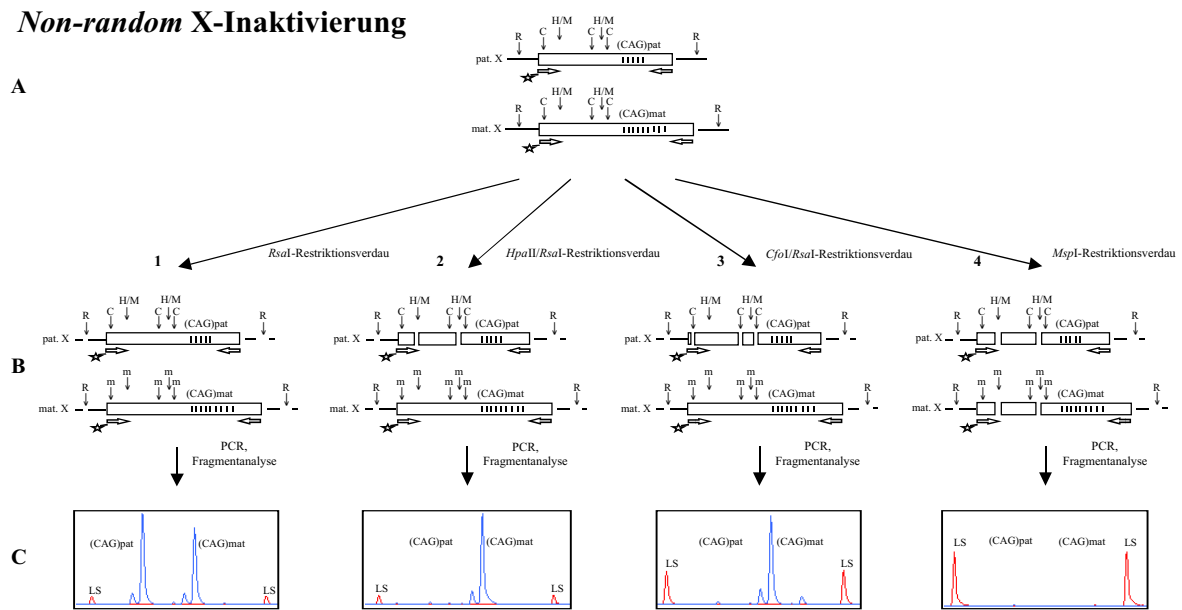


Abb. 9: Schematische Darstellung des Androgenrezeptor-Testes am Beispiel einer *non-random* X-Inaktivierung. Abgebildet sind ein paternales (pat. X) und ein maternales Allel (mat. X) des Androgenrezeptors (**A**). Die beiden Allele unterscheiden sich bezüglich ihrer Anzahl an CAG-Repeats (senkrechte Striche), wobei das paternale Allel deutlich weniger CAG-Repeats enthält und damit dem kürzeren Allel entspricht. Die beiden waagrechten Pfeile symbolisieren die Primer der PCR. Der *forward*-Primer ist mit einem Fluoreszenz-Farbstoff (Stern) markiert. Ebenfalls dargestellt sind die Schnittstellen (senkrechte Pfeile) der verwendeten Restriktionsenzyme *RsaI* (R), *HpaII* (H), *CfoI* (C) und *MspI* (M). Das Restriktionsenzym *RsaI* (**1**) schneidet nur außerhalb des zu amplifizierenden Bereichs (**1B**) und reduziert so durch eine Fragmentierung der DNA die bevorzugte Amplifikation des kürzeren Allels in der PCR, die sehr häufig bei der Amplifikation unterschiedlich langer Fragmente beobachtet wird. Der Restriktionsverdau mit *RsaI* dient der Darstellung des paternalen und des maternalen Allels in der Fragmentanalyse (**1C**). Die Berechnung der Fragmentlängen erfolgt mittels eines Längenstandards (LS). Das methylierungssensitive Restriktionsenzym *HpaII* (**2**) schneidet nur das nicht-methylierte, aktive Androgenrezeptor-Allel (pat. X). Das inaktivierte Allel (mat. X) ist durch Methylierung (m) vor einem Restriktionsverdau geschützt (**2B**) und kann in der nachfolgenden PCR amplifiziert werden. Auch diesem Ansatz wird *RsaI* zugegeben, um die bevorzugte Amplifikation des kürzeren Allels zu reduzieren. Die X-Inaktivierung erfolgte hier zugunsten des paternalen Androgenrezeptor-Allels, d. h. es wurde in fast allen Zellen das maternale Allel inaktiviert. In der Fragmentanalyse ist daher nur noch das maternale Allel nachweisbar (**2C**). Auch bei *CfoI* (**3**) handelt es sich um ein methylierungssensitives Restriktionsenzym. Nur das nicht-methylierte (aktive) Androgenrezeptor-Allel wird geschnitten (**3B**). Diesem Ansatz wird ebenfalls *RsaI* zugegeben, um die bevorzugte Amplifikation des kürzeren Allels in der PCR zu reduzieren. Nur die inaktivierten, methylierten (m) Allele werden amplifiziert und in der Fragmentanalyse nachgewiesen. Die Ergebnisse nach *HpaII/RsaI*-Restriktionsverdau (**2C**) und *CfoI/RsaI*-Restriktionsverdau (**3C**) müssen sich entsprechen. Das Restriktionsenzym *MspI* (**4**) und *HpaII* erkennen die gleichen Schnittstellen, jedoch schneidet *MspI* unabhängig vom Methylierungszustand der DNA, d. h. methyliertes und nicht-methyliertes Allel (**4B**). Nach Amplifikation und Fragmentanalyse darf keines der beiden Allele mehr nachweisbar sein (**4C**). Der *MspI*-Restriktionsverdau dient der Überprüfung der Vollständigkeit des Restriktionsverdaus.

Überprüfung der in der Fragmentanalyse ermittelten Fragmentlängen durch Sequenzierung

Um von der in der Fragmentanalyse ermittelten Länge eines Fragmentes auf die darin enthaltene Anzahl von CAG-Repeats schließen zu können, wurden die mittels Fragmentanalyse errechneten Längen überprüft. Zu diesem Zweck wurden unterschiedlich lange, bezüglich des AR-Polymorphismus homozygote Proben sequenziert. So konnten die exakten Längen der Fragmente bzw. die genaue Anzahl der darin enthaltenen CAG-Repeats bestimmt, und mit den in der Fragmentanalyse ermittelten Längen verglichen werden.

Es stellte sich heraus, daß sich in der Fragmentanalyse der markierte *forward*-Strang bezüglich seiner dargestellten Länge von der des markierten *reverse*-Stranges unterscheidet. Die Verwendung des markierten *forward*-Primers ergab eine vier Basen kürzere Fragmentlänge als durch Sequenzierung des Fragments erwartet. Bei Verwendung des markierten *reverse*-Primers wurde eine Fragmentlänge errechnet, die mit der mittels Sequenzierung ermittelten Länge übereinstimmte (Tab. 5).

Auch die in der PCR verwendete Polymerase hatte Einfluß auf die Fragmentlänge. In Abhängigkeit von der in der Amplifikation verwendeten Art der Polymerase unterscheiden sich die ermittelten Fragmentlängen um eine weitere Base. Tabelle 5 listet die unterschiedlichen Fragmentlängen am Beispiel zweier homozygoter Proben auf.

Die durch die Fragmentanalyse errechnete vermeintliche „Längendifferenz“ des markierten *forward*-Stranges im Vergleich zum markierten *reverse*-Strang wird durch das unterschiedliche Laufverhalten der beiden Stränge im denaturierenden Polyacrylamid-Gel verursacht. Es erklärt sich aus deren unterschiedlicher Sequenz und der daraus resultierenden Sekundärstruktur. Darüberhinaus waren *forward*- und *reverse*-Primer mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert (FAM bzw. TAMRA, beides jedoch Fluorescein-Derivate), die das Laufverhalten im Gel ebenfalls beeinflussen könnten.

Die Addition eines Nukleotids am 3'-Ende von PCR-Produkten ist eine Eigenschaft vieler *Taq*-Polymerasen, wobei meist ein Adenosin angehängt wird. Die für die in Tabelle 5 dargestellten Versuche verwendeten *Taq*-Polymerasen verschiedener Hersteller addierten bis auf eine Ausnahme eine zusätzliche Base an nahezu alle amplifizierten Produkte. Nur die Polymerase der Firma Roche Diagnostics adenylierte durchschnittlich nur 77 % der Produkte. Dadurch entstanden für jedes Allel zwei Peaks, die sich bezüglich ihrer Länge um eine Base unterscheiden. Bei einer Amplifikation mit *Pfu*-Polymerase zeigte sich keine Addition einer zusätzlichen Base.

	sequenzierte Länge	Mittels Fragmentanalyse ermittelte Längen					
		Goldstar Amplitaq (EG)	Amplitaq Gold (PE)	Taq-Polymerase (Promega)	Taq-Polymerase (Roche)	Exo ⁺ Pfu-Polym. (Stratagene)	Exo ⁻ Pfu-Polym. (Stratagene)
Probe 1	214	-	-	-	-	-	-
Forward-Primer	-	211	211	211	211	210	210
Reverse-Primer	-	215	215	215	214/215 Doppelpeak	214	214
Probe 2	226	-	-	-	-	-	-
Forward-Primer	-	223	223	223	223	222	222
Reverse-Primer	-	227	227	227	226/227 Doppelpeak	226	226

PE, Perkin Elmer; EG, Eurogentec; *Forward-Primer*, TAMRA-markiert; *Reverse-Primer*, FAM-markiert.

Tab. 5: Vergleich der sequenzierten Fragmentlängen mit den durch Fragmentanalyse ermittelten Produktlängen bei Verwendung verschiedener DNA-Polymerasen.

Aufgrund der Entstehung von Doppelpeaks, die die Auswertung der Fragmentanalysen erschwerten, eignete sich die *Taq*-Polymerase der Firma Roche Diagnostics nicht für eine Anwendung im Rahmen dieses X-Inaktivierungstestes. Unter den übrigen getesteten Polymerasen stellt die Goldstar Amplitaq-Polymerase die für diese Methode preisgünstigste Alternative dar. Trotz der theoretisch zu kurzen errechneten Fragmentlänge wurde für die folgenden Untersuchungen die Verwendung des markierten *reverse*-Primers aufgrund der höheren Signalstärke des Fluorescein-Farbstoffes FAM beibehalten.

Favorisierung des kürzeren Allels in der PCR

Werden in einer PCR zwei Allele unterschiedlicher Länge amplifiziert, so liegen sie am Ende der Reaktion nur selten in einem Mengenverhältnis von 1:1 vor. Man beobachtet meist eine bevorzugte Amplifikation des kürzeren der beiden Allele. Eine vermehrte Amplifikation eines Allels wird im Androgenrezeptor-Test jedoch im Sinne einer bevorzugten Inaktivierung des betreffenden Allels interpretiert. Eine Favorisierung des kürzeren Allels in der PCR hätte so eine graduelle Verschiebung jedes *random* X-Inaktivierungsmusters in Richtung *non-random* Inaktivierung des kürzeren Allels zur Folge. Andererseits würde jedoch auch eine vermehrte Amplifikation des längeren Allels - bedingt durch dessen bevorzugte Inaktivierung - durch PCR-bedingte Amplifikationsunterschiede im Resultat in Richtung *random* verschoben.

Nicht zu vermeidende, geringfügige Amplifikationsunterschiede der PCR zugunsten des kürzeren oder auch des längeren Allels wurden bei der Berechnung des X-Inaktivierungsverhältnisses durch die Berechnung eines Korrekturfaktors ausgeglichen. Darüberhinaus wurde bei der Etablierung der PCR-Bedingungen versucht, diesen Effekt so gering wie möglich zu halten. Zu geringe Mengen von DNA bzw. degradiertes *Template*, hohe Konzentrationen monovalenter Salze im PCR-Ansatz sowie eine durch seinen hohen GC-Anteil relativ stabile Sekundärstruktur des Androgenrezeptors sind als mögliche

Ursachen für eine bevorzugte Amplifikation des kürzeren Allels beschrieben worden (Mutter & Boynton, 1995). Um diese Faktoren optimal einzustellen, wurden verschiedene Parameter der Methode versuchsweise verändert. Unterschiedliche Polymerasen und PCR-Techniken (*hot start* und *touchdown*) wurden getestet, sowie dGTP ganz oder teilweise durch deaza-dGTP ersetzt. Dieses erleichtert die Amplifikation GC-reicher Fragmente durch die Reduktion der Homoduplex-Schmelztemperatur und der Einzelstrang-Stabilität. Die eingesetzte DNA- und Primermenge wurde verdoppelt sowie die DNA, nach dem genomischen Restriktionsverdau, als Reinigungsschritt nochmals präzipitiert und gelöst. Keine dieser Modifikationen führte zu einer merklich verbesserten Amplifikation des längeren Allels.

Eine bevorzugte Amplifikation des kürzeren Allels war besonders bei den ersten Versuchen aufgefallen, bei denen die Errechnung der Korrekturfaktoren anhand der PCR-Produkte unverdauter DNA erfolgt war. Diese war zuvor wie *HpaII*- bzw. *CfoI*-verdauter DNA behandelt worden, wobei anstelle von Enzym Wasser zugegeben wurde. Erst ein Restriktionsverdau der Kontroll-DNA mit *RsaI*, ermöglichte eine annähernd ausgeglichene Amplifikation der beiden Allele. Mit *RsaI* wurde ein Restriktionsenzym gewählt, das zwar über das gesamte Genom hinweg häufig schneidet, jedoch über keine Schnittstelle in dem zu amplifizierenden Bereich des Androgenrezeptors verfügt. Der Restriktionsverdau der Enzyme *RsaI* sowie *HpaII* und *CfoI* erfolgt im gleichen Puffersystem. Auch deshalb eignet sich *RsaI* besonders gut für die Verwendung als Kontrollenzym. Die Amplifikationsbedingungen der DNA, die zur Errechnung der Korrekturfaktoren herangezogen wird, unterscheidet sich somit nicht von den Bedingungen einer methylierungssensitiv verdauten DNA in bezug auf Salzkonzentration, potenzielle Degradation von DNA und fragmentierter DNA als Template. Durch die Zugabe von *RsaI* zu den Ansätzen mit den methylierungssensitiven Restriktionsenzymen *HpaII*- bzw. *CfoI* ließ sich auch dort eine verbesserte Amplifikation des längeren Allels erzielen.

Optimierung der Zyklenzahl der PCR

Die PCR-Produkte der Allele entsprechen nur dann mengenmäßig den DNA-Templates nach dem genomischen Restriktionsverdau, wenn die Produkte in der exponentiellen Phase der PCR gemessen werden. Nur während dieser Phase ist die Produktmenge proportional zu der eingesetzten DNA-Menge. Diese Linearität besteht über mehrere Zyklen hinweg, in denen Primer, Nukleotide und DNA-Polymerase im Überschuß vorliegen müssen. Danach geht die PCR in eine Sättigungs-Phase über. Pegoraro *et al.* (1994) und Poropat & Nicholson (1998)

kamen bezüglich der exponentiellen Phase der Androgenrezeptor-PCR zu übereinstimmenden Ergebnissen: bis zu 20 bzw. 22 Zyklen liegen die PCR-Produkte in nicht nachweisbaren Konzentrationen vor, zwischen 24 und 34 Zyklen werden dann beide Allele in einem reproduzierbaren Verhältnis amplifiziert. Pegoraro *et al.* (1994) entschieden sich letztlich für eine Zyklenzahl von 28, Poropat & Nicholson (1998) für 26 Zyklen. In dieser Arbeit konnten bis zu einer Zyklenzahl von 24 keine PCR-Produkte im 1 %-Agarosegel nachgewiesen werden. Jedoch waren PCR-Produkte zuverlässig bei 30 Zyklen amplifizierbar, so daß diese Zyklenzahl als Standardbedingung gewählt wurde. Wurde die Zyklenzahl von 35 deutlich überschritten, so waren zunehmend auch Produkte in der Negativkontrolle (*MspI*-geschnittene DNA) nachweisbar.

Reproduzierbarkeit des Testes

Um die Reproduzierbarkeit der Methode zu überprüfen, wurden vier DNA-Proben (A, E, G und S-9853) jeweils zehnmal getestet. Aus den Peakflächen der Allele wurden nach jedem Test für *RsaI*-, *HpaII/RsaI*- und *CfoI/RsaI*-Restriktionsverdau die Quotienten aus kürzerem Allel (Allel 1) und längerem Allel (Allel 2) gebildet. Für die methylierungssensitiven Restriktionsverdau wurden die Allel-Quotienten zum Vergleich vor und nach Einrechnung der Korrekturfaktoren ermittelt. Die Auswertung des *RsaI*-Restriktionsverdau spiegelt die Reproduzierbarkeit der Korrekturfaktoren wider. Ein Quotient ungleich 1 zeigt die verstärkte Amplifikation eines Allels, wobei bei einem Quotienten >1 das kürzere Allel, und bei einem Quotienten <1 das längere Allel vermehrt amplifiziert wurde. Für diese Quotienten wurden Mittelwert, Spannbreite (maximale Peakfläche - minimale Peakfläche) und Variationskoeffizient (Standardabweichung/Mittelwert: Maß für die Streuung der Werte, unabhängig vom Mittelwert) errechnet. Die Variationskoeffizienten der Bestimmungen liegen alle unter 10 % und zeigen somit insgesamt eine sehr gute Reproduzierbarkeit des Testes.

	Quotient: Peakfläche Allel 1/Peakfläche Allel 2			
	Kontroll-DNA A	Kontroll-DNA E	Kontroll-DNA G	Kontroll-DNA S-9853
RsaI-Verdau:				
Mittelwert	1,12	1,13	1,08	1,04
Spannbreite	0,13	0,09	0,14	0,21
Variationskoeffizient	3 %	3 %	4 %	5 %
HpaII/RsaI-Verdau:				
Mittelwert	1,59	0,87	0,53	1,95
Spannbreite	0,38	0,22	0,08	0,54
Variationskoeffizient	9 %	8 %	6 %	9 %
HpaII/RsaI-Verdau (korrigierte Peakfläche):				
Mittelwert	1,42	0,78	0,49	1,88
Spannbreite	0,27	0,2	0,09	0,52
Variationskoeffizient	9 %	8 %	6 %	9 %
CfoI/RsaI-Verdau:				
Mittelwert	1,34	1,34	1,03	1,81
Spannbreite	0,25	0,29	0,21	0,34
Variationskoeffizient	6 %	6 %	7 %	7 %
CfoI/RsaI-Verdau (korrigierte Peakfläche):				
Mittelwert	1,2	1,19	0,96	1,74
Spannbreite	0,26	0,24	0,09	0,49
Variationskoeffizient	7 %	6 %	4 %	7 %

Spannbreite: maximaler Quotient - minimaler Quotient; Variationskoeffizient: Standardabweichung/Mittelwert.

Tab. 6: Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Einzelschritte des Testes. Vier verschiedene Proben wurden jeweils 10 mal untersucht (Restriktionsverdau und Amplifikation).

Vergleich des Androgenrezeptor-Tests mit einer Southern Blot-Technik

Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse des Androgenrezeptor-Testes mit einer bislang gebräuchlichen Methode darzustellen, wurden Proben untersucht, deren X-Inaktivierungsmuster bereits mit einer etablierten Southern Blot-Methode an dem Locus DXS 255 (M27 β -Sonde) (Boyd & Fraser, 1990; Brown *et al.*, 1990) voranalysiert worden waren. Diese Proben wurden uns freundlicherweise von Fr. Dr. hum. biol. Soheylya Chahrokh-Zadeh vom Institut für Pädiatrische Genetik der Universität München zur Verfügung gestellt. Die Verhältnisse der Allele zueinander wurden bei der Southern Blot Technik optisch abgeschätzt und in 3 Gruppen eingeteilt: *random* X-Inaktivierung (beide Allele bleiben nach dem Verdau gleichermaßen nachweisbar), *skewed* X-Inaktivierung (das Inaktivierungsverhältnis ist zugunsten eines Allels verschoben) und *non-random* X-Inaktivierung (ein Allel ist nach dem Verdau nicht mehr nachzuweisen). Die Ergebnisse beider Methoden wichen nur bei einer (S-5416) von insgesamt 10 Proben deutlich voneinander ab. S-5416 zeigte im Southern Blot *random* X-Inaktivierung, im Androgenrezeptor-Test ein ausgeprägtes *Skewing* der X-Inaktivierung. Bei einer Probe (S-10718) war die Beurteilung des Androgenrezeptor-Testes unmöglich, da die Ergebnisse nach *HpaII/RsaI*- und *CfoI/RsaI*-Restriktionsverdau sich stark voneinander unterschieden (> 15). Die übrigen 8 untersuchten Proben erbrachten weitestgehend übereinstimmende Ergebnisse.

Die X-Inaktivierungsmuster der einzelnen Proben sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Probe Nr.	Southern Blot	<i>HpaII/RsaI</i> -Verdau		<i>CfoI/RsaI</i> -Verdau		AR-Test
	Interpretation des Ergebnisses	% inaktiviert		% inaktiviert		Interpretation des Ergebnisses ⁺
		Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2	
S-5416	random	80	20	95	5	ausgeprägtes skewing
S-7051	random	50	50	55	45	random
S-7921	random	50	50	55	45	random
S-9853	random	70	30	65	35	mildes skewing
S-10718*	random	70	30	90	10	nicht interpretierbar
S-9306	skewed	60	40	70	30	mildes skewing
S-10829	skewed	90	10	85	15	ausgeprägtes skewing
S-8377	non-random	100	0	100	0	ausgeprägtes skewing
S-8383	non-random	90	10	90	10	ausgeprägtes skewing
S-10812	non-random	100	0	100	0	ausgeprägtes skewing

*Stark unterschiedliche Werte zwischen *HpaII*- und *CfoI*-verdauten Proben; ⁺ Interpretation nach Harris *et al.*, 1992

Tab. 7: Vergleich der X-Inaktivierungsmuster von 10 Proben nach Androgenrezeptor-Test und Southern Blot mit der Sonde M27B (DXS 255).

Die Ergebnisse des im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingeführten Androgenrezeptor-Testes waren in ihren Endaussagen vergleichbar mit den Ergebnissen einer früher verwendeten Methode. Der Androgenrezeptor-Test bietet jedoch den Vorteil einer zuverlässig quantifizierbaren und standardisierten Auswertung im Vergleich zu der rein optischen Beurteilung des Ergebnisses bei der Southern Blot-Methode.

Unterschiedliche Ergebnisse zwischen dem AR-Test und der Southern Blot-Analyse mittels M27B-Sonde wurden mehrfach und in einer Häufigkeit von bis zu 20 % untersuchter Proben beschrieben (Webb & Watkiss, 1996; Allen *et al.*, 1992). Als mögliche Gründe für diese Diskrepanzen wurden methodische Aspekte wie ein inkompletter methylierungssensitiver Restriktionsverdau oder die bevorzugte Amplifikation eines Allels in der PCR sowie potenzielle Methylierungsunterschiede zwischen den beiden untersuchten Loci Androgenrezeptor und DXS 255 diskutiert. Jedoch wird seit einiger Zeit die Anwendbarkeit des Locus DXS 255 für X-Inaktivierungstests allgemein in Frage gestellt (Brown & Brown, 1993). Zum einen liegt hier im Gegensatz zu exprimierten Genen das aktive Allel methyliert vor und das inaktive bleibt unmethyliert. Zum anderen zeigten sich die Methylierungsmuster der einzelnen Enzymschnittstellen komplexer als zunächst angenommen. Zwei der drei methylierungssensitiven Schnittstellen liegen teilweise auch auf dem aktiven Allel methyliert vor. Es konnten überdies in peripheren Blutzellen, vor allem aber in malignen Zellen, Hypermethylierungen der Enzymschnittstellen nachgewiesen werden, die zur Folge haben, daß etwa die Hälfte der DNA unverdaut bleibt. Darüberhinaus scheint die Methylierung dieses Locus neben der X-Inaktivierung auch von anderen Faktoren abhängig zu sein (Cachia *et al.*, 1993). Die Anwendung eines X-Inaktivierungstestes basierend auf dem Marker DXS 255 wurde daher für die Zwecke dieser Studie nicht in Betracht gezogen.

3.2.2. Untersuchung der X-Inaktivierung in peripheren Blutleukozyten heterozygoter ALD-Überträgerinnen, Nicht-Überträgerinnen aus ALD-Familien und Kontrollen

Fünf der 32 untersuchten heterozygoten ALD-Überträgerinnen und zwei der 10 Nicht-Überträgerinnen aus ALD-Familien Frauen erwiesen als nicht informativ bezüglich des AR-Polymorphismus. Daraus errechnet sich eine Heterozygotenfrequenz von 83 %, die etwas niedriger ist als die für den Locus beschriebene Heterozygotenfrequenz von 90 % (Edwards *et al.*, 1992). Dies liegt wahrscheinlich an der relativ kleinen Stichprobengröße der Studie.

Bei 5 von 32 Proben fanden sich in mehrfach wiederholten Tests reproduzierbare, stark voneinander abweichende X-Inaktivierungsmuster nach *HpaII/RsaI*- und *CfoI/RsaI*-Restriktionsverdau (>15 Prozentpunkte). Polymorphismen im Bereich der Restriktionsschnittstellen wurden durch Sequenzierung ausgeschlossen. Vier dieser Proben zeigten nach *HpaII/RsaI*-Restriktionsverdau *random* und nach *CfoI/RsaI*-Restriktionsverdau eine deutlich zugunsten eines Allels verschobene (*skewed*) X-Inaktivierung. Bei einer Probe fand sich die umgekehrte Situation. Die betreffenden 5 Proben wurden als nicht interpretierbar angesehen und deshalb von der nachfolgenden Auswertung der Ergebnisse ausgeschlossen.

Abbildung 10 stellt die Unterschiede zwischen *HpaII/RsaI*- und *CfoI/RsaI*-Restriktionsverdau der einzelnen Proben dar.

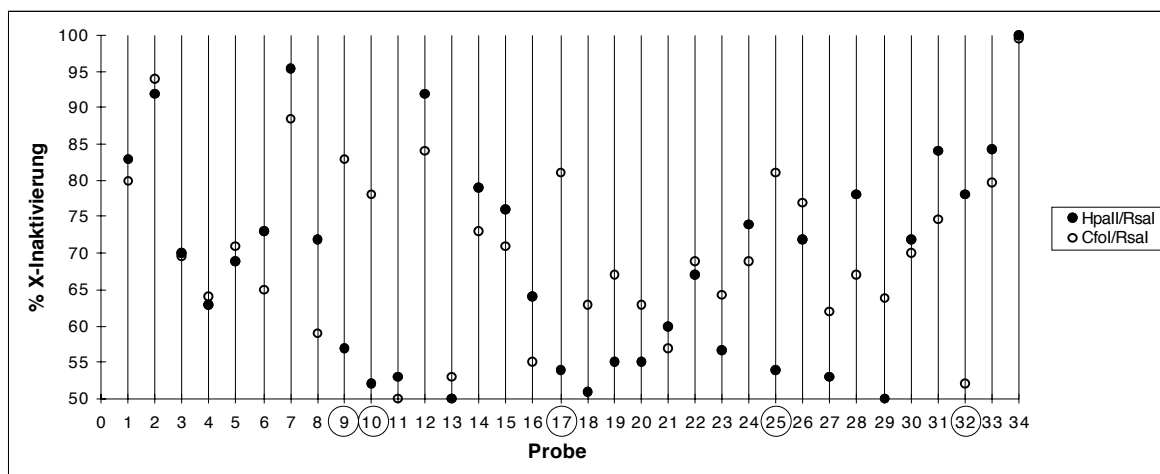


Abb. 10: Unterschiede zwischen *HpaII/RsaI*- und *CfoI/RsaI*-Restriktionsverdau. Für jede untersuchte Probe wurde der Grad der X-Inaktivierung nach beiden methylierungssensitiven Restriktionsverdaus aufgetragen. Ein Unterschied von mehr als 15 Prozentpunkten wurde als nicht interpretierbar gewertet und führte dazu, daß die betreffende Probe von der Auswertung der Daten ausgeschlossen wurde. Die betreffenden 5 Proben sind durch Kreise markiert.

Auch innerhalb des Kontrollkollektivs fanden sich 5 Proben, die aufgrund reproduzierbarer, stark voneinander abweichender Inaktivierungsmuster (> 15 Prozentpunkte) nach *HpaII/RsaI*- und *CfoI/RsaI*-Restriktionsverdau nicht beurteilt werden konnten und von der Auswertung der Ergebnisse ausgeschlossen wurden. Auch bei diesen Individuen konnten keine Polymorphismen im Bereich der Restriktionsschnittstellen nachgewiesen werden. Die Unterschiede zwischen den Ergebnissen nach *HpaII/RsaI*- und *CfoI/RsaI*-Restriktionsverdau der übrigen Kontrollen entsprachen denen des ALD-Kollektivs (nicht abgebildet).

Mit Ausnahme der genannten 10 Proben zeigte sich, daß die beiden methylierungssensitiven Restriktionsverdau im allgemeinen zu übereinstimmenden Ergebnissen führen und dazu geeignet sind, das Resultat des X-Inaktivierungstestes intern zu überprüfen.

Abbildung 11 illustriert die Verteilung der X-Inaktivierungsmuster in Leukozyten bei ALD-Mutationsträgerinnen im Vergleich zu Nicht-Mutationsträgerinnen aus ALD-Familien und einem nicht-verwandten Kontroll-Kollektiv. Hierfür wurden die Ergebnisse nach *HpaII/RsaI*- und *CfoI/RsaI*-Restriktionsverdau gemittelt. Die Einteilung der X-Inaktivierungsmuster erfolgte dabei nach Harris *et al.* (1992).

Bei 7 von 22 Überträgerinnen (32 %) zeigte sich eine ausgeprägte Verschiebung der X-Inaktivierung (*skewing*) zugunsten eines Allels (81-100 %, Abbildung 11A). Im Gegensatz dazu war ein ausgeprägtes *Skewing* bei keiner der Nicht-Überträgerinnen zu beobachten (Abbildung 11B). In dieser Gruppe fanden sich nur *random* X-Inaktivierung (57 %) und mildes *Skewing* (53 %) zu annähernd gleichen Teilen. Die Verteilung der X-Inaktivierungsmuster der Nicht-Überträgerinnen gleicht der Gauss'schen Normalverteilungskurve.

Auch in der Gruppe der nicht-verwandten Kontrollen fanden sich vorwiegend ausgeglichene X-Inaktivierungsmuster (Abbildung 11C). Keine der Kontrollen zeigte eine ausgeprägte Verschiebung zugunsten eines Allels. Bei 23 von 35 Frauen (66 %) konnte *random* X-Inaktivierung (50 – 64 %) nachgewiesen werden. Die übrigen 12 Kontrollen (44 %) zeigten ein nur mildes *Skewing* (65 – 80 %). Die Verteilung der X-Inaktivierungsmuster der Kontrollen entspricht wie die der Nicht-Überträgerinnen aus ALD-Familien einer Normalverteilungskurve.

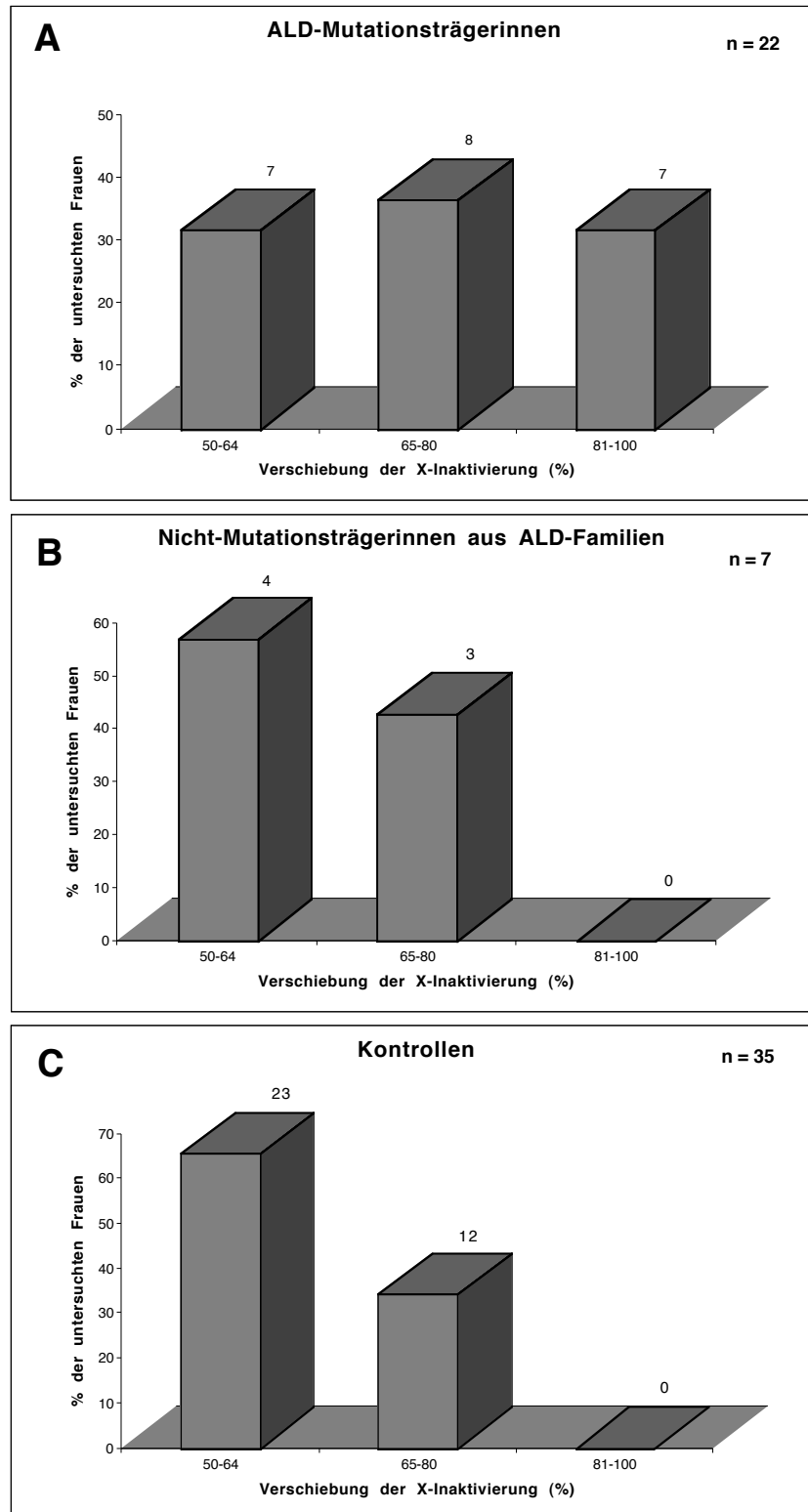


Abb. 11: Verteilung der X-Inaktivierungsmuster in Leukozyten 22 heterozygoter ALD-Mutationsträgerinnen im Vergleich zu 7 Nicht-Mutationsträgerinnen betroffener Familien und 35 Kontrollen. Die X-Inaktivierungsmuster wurden dabei in *random* X-Inaktivierung (50 – 64 %), mildes *Skewing* (65 – 80 %) und ausgeprägtes *Skewing* (81 – 100 %) eingeteilt (Harris et al., 1992).

Die Unterschiede zwischen der Verteilung der X-Inaktivierungsmuster heterozygoter ALD-Mutationsträgerinnen und der des Kontroll-Kollektivs erwiesen sich in einem Mann-Whitney-Test als hoch signifikant ($p < 0,001$). Auch der Nachweis von 7 deutlich zugunsten eines Allels verschobenen X-Inaktivierungsmustern ($> 80:20$) bei 22 heterozygoten ALD-Mutationsträgerinnen verglichen mit keinem Fall von ausgeprägtem *Skewing* ($> 80:20$) bei 35 Kontrollen ist als statistisch hochsignifikant (Fishers-Exakt-Test; $p < 0,001$) anzusehen. Eine statistische Testung der Gruppe der Nicht-Mutationsträgerinnen aus ALD-Familien konnte aufgrund der geringen Stichprobengröße von nur 7 Frauen nicht durchgeführt werden. Jedoch war auch in dieser Gruppe kein ausgeprägtes *Skewing* nachweisbar und die Verteilung der X-Inaktivierungsmuster entsprach mit überwiegend ausgeglichenen X-Inaktivierungsmustern der des Kontroll-Kollektivs.

3.2.3. Korrelation der X-Inaktivierungsmuster mit biochemischen Parametern

ALD-Patienten weisen als biochemisches Leitsymptom stark erhöhte Konzentrationen von VLCFA in Plasma und Geweben auf. Auch bei der überwiegenden Mehrheit der heterozygoten ALD-Überträgerinnen (85 %) finden sich erhöhte Konzentrationen von VLCFA im Plasma, sodaß die Bestimmung der VLCFA im Plasma zur Identifizierung von ALD-Überträgerinnen verwendet werden kann. Hierbei sind vor allem die Konzentration von C26:0 sowie die Quotienten aus C26:0/C22:0 und C24:0/C22:0 (Moser *et al.*, 1999) diagnostisch aussagekräftig. Um den Überlappungsbereich zwischen Kontrollen und heterozygoten Überträgerinnen zu reduzieren, wird in vielen Laboratorien eine Diskriminationsanalyse durchgeführt (Moser *et al.*, 1983). Frauen, die erhöhte Konzentrationen von VLCFA im Plasma, erhöhte Quotienten und einen Diskriminationsfaktor $y > 0,72$ aufweisen, werden biochemisch als Überträgerinnen klassifiziert.

Die Konzentrationen der VLCFA im Plasma der von uns untersuchten 22 heterozygoten ALD-Überträgerinnen und 7 Nicht-Überträgerinnen sind zusammen mit deren X-Inaktivierungsmustern in Tabelle 8 aufgelistet.

	<i>HpaII/RsaI</i> -Verdau		<i>CfoI/RsaI</i> -Verdau		VLCFA-Werte		
	% inaktiviert Allel 1	% inaktiviert Allel 2	% inaktiviert Allel 1	% inaktiviert Allel 2	y	C24:0/C22:0 $\mu\text{g/ml}$	C26:0/C22:0 $\mu\text{g/ml}$
XALD-Mutationsträgerinnen							
MT-1	100	0	100	0	0,92	0,982	0,032
MT-2	95	5	90	10	1,12	1,139	0,044
MT-3	95	5	85	15	0,88	1,048	0,029
MT-4	90	10	95	5	0,96	1,280	0,028
MT-5	85	15	80	20	Werte nicht verfügbar		
MT-6	85	15	75	25	1,17	1,546	0,047
MT-7	85	15	80	20	0,81	1,242	0,029
MT-8	80	20	65	35	1,31	1,474	0,072
MT-9	75	25	70	30	0,95	1,479	0,053
MT-10	75	25	70	30	0,99	1,114	0,047
MT-11	70	30	70	30	0,54	0,811	0,016
MT-12	70	30	60	40	1,11	1,264	0,041
MT-13	70	30	70	30	0,87	1,249	0,039
MT-14	70	30	75	25	Werte nicht verfügbar		
MT-15	65	35	65	35	1,20	1,346	0,048
MT-16	65	35	70	30	0,83	1,028	0,038
MT-17	60	40	60	40	0,85	1,720	0,041
MT-18	55	45	65	35	1,11	1,108	0,033
MT-19	55	45	55	45	0,97	1,219	0,045
MT-20	55	45	65	35	0,99	1,114	0,047
MT-21	55	45	60	40	Werte nicht verfügbar		
MT-22	50	50	65	35	1,00	1,148	0,029
Nicht-Mutationsträgerinnen							
NMT-1	80	20	75	25	0,62	0,921	0,013
NMT-2	70	30	65	35	0,66	0,779	0,021
NMT-3	70	30	70	30	0,63	0,853	0,020
NMT-4	65	35	55	45	0,58	0,785	0,015
NMT-5	55	45	50	50	0,64	0,790	0,020
NMT-6	50	50	55	45	0,51	0,860	0,032
NMT-7	50	50	65	35	0,55	0,926	0,007

Tab. 8: X-Inaktivierungsmuster in Leukozyten von ALD-Mutationsträgerinnen und Nicht-Mutationsträgerinnen betroffener Familien. Neben den Ergebnissen des X-Inaktivierungstestes werden die VLCFA-Konzentrationen aus dem Plasma der Patientinnen aufgelistet. Normwerte: C24:0/C22:0, $0,840 \pm 0,080 \mu\text{g/ml}$; C26:0/C22:0, $0,013 \pm 0,009 \mu\text{g/ml}$. Ein Diskriminationsfaktor y von $> 0,72$ ist biochemisch hinweisend für ALD-Überträgerinnen (Moser *et al.*, 1983). Die Ergebnisse des X-Inaktivierungstests wurden auf die nächsten 5 gerundet.

Bei 19 der 22 heterozygoten ALD-Mutationsträgerinnen und allen Nicht-Überträgerinnen der vorliegenden Arbeit stand Plasma zur Bestimmung der VLCFA zur Verfügung. Achtzehn der molekulargenetisch gesicherten Überträgerinnen konnten auch biochemisch als Überträgerinnen identifiziert werden. Nur Überträgerin MT-11 zeigte normale Konzentrationen von VLCFA. Die VLCFA aller Nicht-Überträgerinnen lagen im Normbereich.

Der mögliche Zusammenhang zwischen dem Grad der X-Inaktivierung in Leukozyten und den biochemischen Parametern im Plasma von ALD-Überträgerinnen wurde in einer

Spearman-Rangkorrelation untersucht. Es wurde das vermehrt inaktivierte Allel (%) mit a) dem Quotienten C26:0/C22:0 ($R = -0,162$), b) dem Quotienten C24:0/C22:0 ($R = -0,069$) und c) dem Diskriminationsfaktor γ für VLCFA ($R = -0,096$) korreliert.

Es zeigte sich keine Korrelation zwischen biochemischen Parametern und X-Inaktivierungsmuster einer Überträgerin.

In Abbildung 12 wurden exemplarisch der Grad der X-Inaktivierung und der Diskriminationsfaktor γ der VLCFA im Plasma gegeneinander aufgetragen.

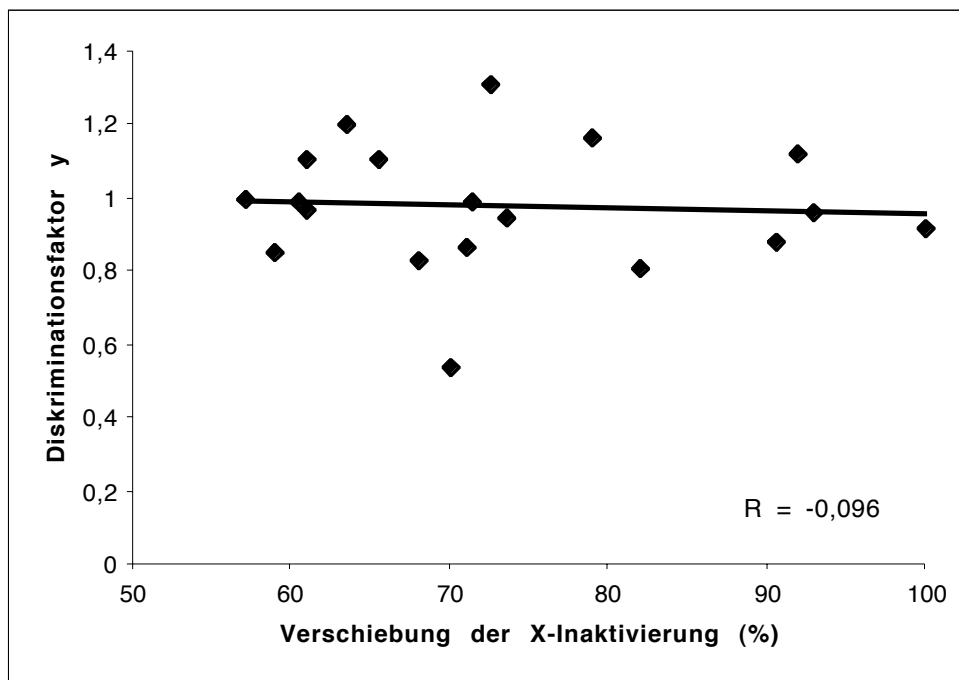


Abb. 12: Beziehung zwischen Diskriminationsfaktor γ der VLCFA im Plasma und dem Grad der X-Inaktivierung heterozygoter ALD-Überträgerinnen.

3.2.4. X-Inaktivierung und Aktivitätszustand des mutierten ALD-Allels in kultivierten Fibroblasten heterozygoter ALD-Überträgerinnen

Von drei heterozygoten ALD-Überträgerinnen und einer Nicht-Überträgerin standen kultivierte Hautfibroblasten zur Untersuchung der X-Inaktivierung sowie für die Bestimmung der VLCFA zur Verfügung. Alle drei Überträgerinnen zeigten dabei die Inaktivierung eines Allels in mehr als 90 % der Zellen im Sinne eines extremen *Skewings* (Fey *et al.*, 1994; Gale *et al.*, 1997; Orstavik *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu fand sich bei der untersuchten Nicht-Überträgerin ein ausgeglichenes X-Inaktivierungsmuster. Tabelle 9 zeigt die X-Inaktivierungsmuster in kultivierten Hautfibroblasten mit den dazugehörigen Konzentrationen der VLCFA.

	<i>HpaII/RsaI</i> -Verdau		<i>CfoI/RsaI</i> -Verdau		VLCFA-Werte		
	% inaktiviert		% inaktiviert		C26:0	C24:0/C22:0	C26:0/C22:0
	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2	$\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein	$\mu\text{g}/\text{ml}$	$\mu\text{g}/\text{ml}$
XALD-Mutationsträgerinnen							
MT-23	100	0	100	0	0,286	1,851	0,071
MT-11	95	5	90	10	0,130	1,911	0,057
MT-24	90	10	100	0	0,326	3,142	0,361
Nicht-Mutationsträgerin							
NMT-8	65	35	60	40	0,122	1,735	0,029

Tab. 9: X-Inaktivierungsmuster in Fibroblasten von ALD-Mutationsträgerinnen und einer Nicht-Mutationsträgerin betroffener Familien. Neben den Ergebnissen des X-Inaktivierungstestes werden die VLCFA-Werte aus den Fibroblasten der Patientinnen aufgelistet. Normwerte: C26:0, $0,096 \pm 0,025 \mu\text{g}/\text{mg}$ Protein; C24:0/C22:0, $2,018 \mu\text{g}/\text{ml} \pm 0,338$; C26:0/C22:0, $0,039 \mu\text{g}/\text{ml} \pm 0,011$. Die Ergebnisse des X-Inaktivierungstests wurden auf die nächsten 5 gerundet.

Um herauszufinden, welches ALD-Allel - das mutierte oder das Wildtyp-Allel - bei den Mutationsträgerinnen in den Fibroblasten aktiv vorlag, wurden RNA-Transkripte untersucht. Hierzu wurden ausgehend von RNA diejenigen Bereiche des ALD-Gens einer Überträgerin amplifiziert und anschließend sequenziert, die die Mutation enthielten. Da nur die Allele des aktiven X-Chromosoms transkribiert werden, konnte so das aktive Allel nachgewiesen werden (Abb. 13). Die Transkriptanalysen wurden zur besseren Veranschaulichung im Vergleich zu Wildtyp-Sequenz (Abb. 13A) und zur heterozygoten Sequenz aus Fibroblasten-DNA abgebildet. MT-24 ist heterozygot bezüglich einer Transversion in Exon 1, die in einem Aminosäureaustausch Serin zu Tryptophan an Position 108 der Aminosäuresequenz resultiert (Abb. 13: MT-24 B). Bei der Untersuchung der RNA-Transkripte findet sich nur das mutierte Allel wieder, d. h., es wurde bevorzugt das Wildtyp-Allel inaktiviert (Abb. 13: MT-24 C).

MT-11 ist ebenfalls heterozygot bezüglich einer Transversion in Exon 1, die jedoch zu einem Aminosäureaustausch Serin zu Cystein an Position 213 führt (Abb. 13: MT-11 B). In der Transkript-Analyse findet sich hier das Wildtyp-Allel als das aktive Allel (Abb. 13: MT-11 C). Bei MT-23 führt eine heterozygote Transition zu einem Kettenabbruch des Proteins nach Aminosäure 671 bei Expression dieses ALD-Allels (Abb. 13: MT-23 B). Die RNA-Analyse zeigt auch hier eine Expression des Wildtyp-Allels (Abb. 13: MT-23 C).

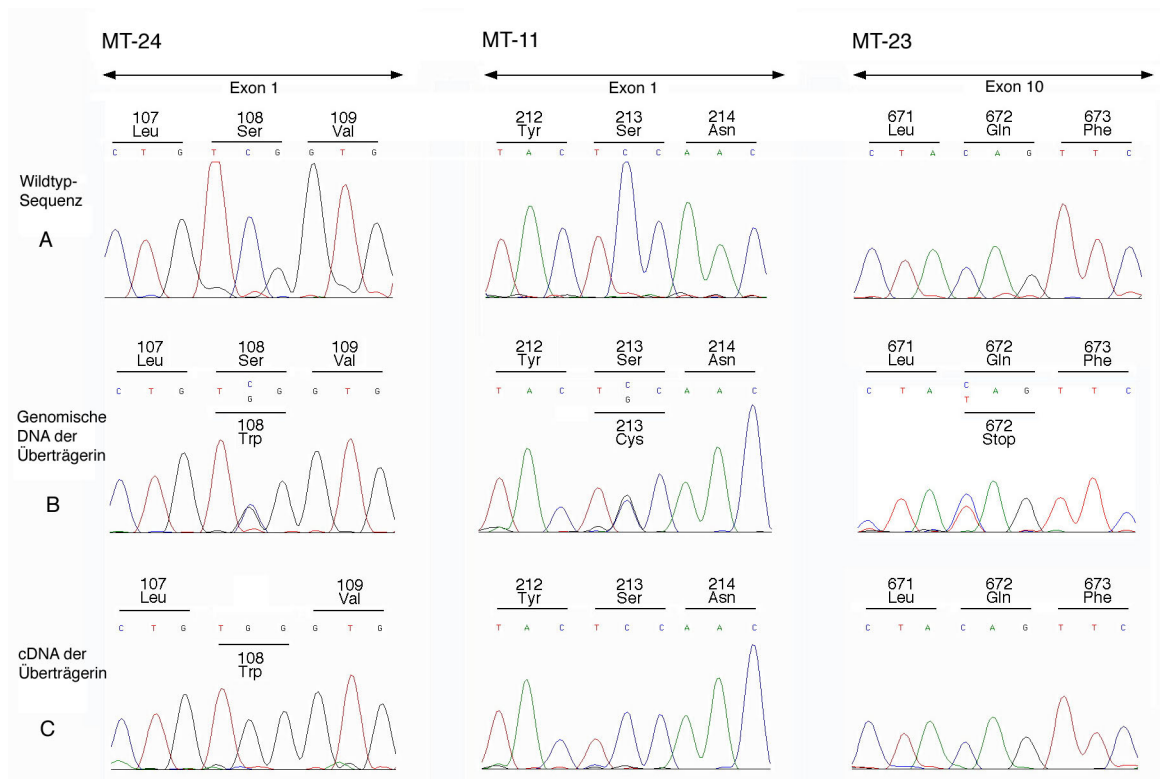


Abb. 13: Untersuchung des vermehrt aktiven ALD-Allels in Hautfibroblasten mit extremem *Skewing* dreier ALD-Überträgerinnen durch Transkriptanalyse. Sequenzierung von genomischer DNA aus Fibroblasten zeigt im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz (A) die Heterozygotie der Überträgerinnen MT-24, MT-11 und MT-23 bezüglich der ALD-Mutation ihrer Familien (B). Amplifikation und Sequenzierung der Mutation ausgehend von RNA aus Fibroblasten zeigt das vermehrt aktive ALD-Allel (C). Bei MT-24 liegt vermehrt das mutierte Allel aktiv vor, bei MT-11 und MT-23 vermehrt das Wildtyp-Allel.

Zwei heterozygote ALD-Überträgerinnen mit extremem *Skewing* inaktivierten das mutierte ALD-Allel in Hautfibroblasten, eine ALD-Überträgerin jedoch das Wildtyp-Allel. Diese Daten zeigen klar, daß sowohl eine bevorzugte Inaktivierung des Wildtyp-Allels als auch des mutierten ALD-Allels bei ALD-Überträgerinnen zu finden ist.

4. Diskussion

Es sollte die Hypothese geprüft werden, ob bei heterozygoten Überträgerinnen von X-ALD eine Verschiebung der X-Inaktivierung zugunsten eines Allels erfolgt. Für die Bearbeitung dieser Fragestellung mußten zunächst die experimentellen Voraussetzungen geschaffen werden: die Etablierung der Mutationsanalyse des *ALD*-Gens zum sicheren Nachweis einer Heterozygotie bezüglich X-ALD sowie die Etablierung eines verlässlichen Testes zur Untersuchung von X-Inaktivierungsmustern. Im Anschluß daran konnte die X-Inaktivierung bei heterozygoten Überträgerinnen von X-ALD im Vergleich zu zwei Kontroll-Kollektiven untersucht werden.

4.1. Mutationsanalyse des *ALD*-Gens

Die X-ALD wird bei männlichen (hemizygoten) Patienten sehr verlässlich durch die deutlich erhöhten Konzentrationen der VLCFA im Plasma diagnostiziert (Moser *et al.*, 1981). Auch die überwiegende Mehrzahl der heterozygoten Mutationsträgerinnen weist mäßiggradig erhöhte Konzentrationen von VLCFA auf. 15 % der weiblichen (heterozygoten) Mutationsträgerinnen jedoch haben normale Konzentrationen von VLCFA in Plasma und/oder Fibroblasten (Moser *et al.*, 1999; Moser *et al.*, 1983). Das bedeutet, daß normale Konzentrationen von VLCFA eine Heterozygotie bezüglich einer Mutation im *ALD*-Gen nicht sicher ausschließen. Auch mit Hilfe von immunzytochemischen Methoden kann das Vorliegen einer Mutation im *ALD*-Gen in etwa 30 % der Fälle nicht sicher ausgeschlossen werden, da nur etwa 70 % der beschriebenen Mutationen zu einem vollständigen Verlust der Nachweisbarkeit von ALDP mittels Immunfluoreszenz führen (Feigenbaum *et al.*, 1996; Kemp *et al.*, 1996; Watkins *et al.*, 1995). Um die ALD-Überträgerinnen innerhalb des Kollektivs der vorliegenden Arbeit sicher identifizieren bzw. ausschließen zu können, wurde daher neben der Bestimmung der VLCFA auch eine Mutationsanalyse des *ALD*-Gens durchgeführt. Bei 15 der 30 zur Verfügung stehenden Familien war eine Mutationsanalyse bereits im Rahmen früherer Studien erfolgt, die verbleibenden 15 Familien wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

In allen 15 untersuchten Familien konnte eine Mutation im *ALD*-Gen identifiziert werden (Tabelle 3 in 3.1.). Das Mutationsspektrum umfaßt Missense- (67 %), Nonsense- (13 %), Splice-Site- (13 %) und Frameshift-Mutationen (6 %). 7 der identifizierten Mutationen wurden bereits

früher bei ALD-Patienten nachgewiesen und durch andere Arbeitsgruppen als X-ALD verursachende Mutationen beschrieben (Braun *et al.*, 1995; Feigenbaum *et al.*, 1996; Kemp *et al.*, 1994; Kok *et al.*, 1995). Bei den verbleibenden 8 Mutationen handelt es sich um neue, bislang noch nicht publizierte Mutationen (Stand: 01.07.01). Unter diesen 8 neuen Mutationen finden sich 5 Missense-Mutationen. Missense-Mutationen führen zu einem Austausch einer einzigen Aminosäure innerhalb des ALDP und stellen die häufigste Mutationsart des *ALD*-Gens (53,5 %) dar (Smith *et al.*, 1999). Aufgrund des Fehlens eines funktionellen Protein-Assays kann die pathogenetische Relevanz dieser Mutationsart nur auf indirektem Weg erklärt werden. Keine der 5 Missense-Mutationen fand sich bei 50 nicht-verwandten Blutspendern. Das Vorliegen eines Polymorphismus konnte dadurch ausgeschlossen werden. Darüberhinaus weisen die vier bekannten humanen peroxisomalen ABC-Halbtransporter untereinander hohe Sequenzhomologien auf. Alle von uns nachgewiesenen Missense-Mutationen führen zu einem Austausch von Aminosäuren an konservierten Positionen des ALDP. An diesen Positionen finden sich nicht nur im ALDP, sondern auch bei mindestens drei der vier peroxisomalen ABC-Halbtransporter die gleichen Aminosäuren (Shani *et al.*, 1996, eigene Daten), wodurch eine hohe funktionelle Bedeutung dieser Positionen für das Protein nahegelegt wird. Die Aminosäuren, die durch die Missense-Mutationen in das Protein eingefügt wurden, unterscheiden sich bezüglich ihrer Eigenschaften wie Größe, Polarität und elektrische Ladung maßgeblich von den an diesen Positionen konservierten Aminosäuren. Daher ist von strukturellen Veränderungen in funktionell bedeutsamen Domänen des Proteins auszugehen. Vier der Mutationen (L160P, V208E, S213C, R285P) finden sich in der membranspannenden Domäne des ALDP, die für Substratbindung und Substratspezifität des Transporters mitverantwortlich zu sein scheint (Shani *et al.*, 1996). Die Mutation G608N liegt inmitten der C-Sequenz, eines innerhalb aller bekannten ABC-Transporter hochkonservierten Motivs der nukleotidbindenden Domäne (Abb. 1).

In zwei Familien (N, O) konnten Splice-Site-Mutationen innerhalb der vier hochkonservierten Basen nachgewiesen werden, die sich bei allen nukleären eukaryotischen Genen an den Übergängen von Exons zu Introns finden (GT-AG-Regel). Diese Mutationen führen dazu, daß Donor- und Akzeptorstellen nicht erkannt, und die betreffenden Introns nicht präzise entfernt werden können. Es wird die jeweils nachfolgende Spleißstelle verwendet, die sich als sogenannte kryptische Spleißstelle auch inmitten des Introns befinden kann. Auf mRNA- Ebene kommt es zu einem Verlust von Exons (*Exon-Skipping*) und der Verschiebung des Leserasters. Im allgemeinen finden sich Splice-Site-Mutationen häufiger im 5'-Bereich (Donorstelle) von Introns als im 3'-

Bereich (Akzeptorstelle). Die Gründe hierfür sind nicht bekannt (Krawczak *et al.*, 1992). Bislang konnten im *ALD*-Gen 5 weitere Splice-Site-Mutationen identifiziert werden, die ebenfalls innerhalb der hochkonservierten GT-AG-Spleißstellen lokalisiert sind (Smith *et al.*, 1999).

In Exon 10 des *ALD*-Gens, welches die C-terminalen 81 Aminosäuren des ALDP kodiert, konnten insgesamt erst 3 Mutationen identifiziert werden (Holzinger *et al.*, 1998; Korenke *et al.*, 1998; Lachtermacher *et al.*, 2000), eine davon im Rahmen dieser Arbeit (Familie L) (Holzinger *et al.*, 1998). Es handelt sich um eine Nonsense-Mutation, die zu einem Abbruch der Aminosäure-Sequenz nach dem Codon 671 und damit zu einem Verlust der 74 C-terminalen Aminosäuren des ALDP führt. Bei dem betreffenden Patienten war ALDP-spezifische mRNA, nicht jedoch das Translationsprodukt ALDP nachweisbar. Aus diesen Beobachtungen kann eine Instabilität des ALDP, verursacht durch den Verlust des C-Terminus, abgeleitet werden. Da es sich bei ALDP um einen Halbtransporter handelt, für dessen Funktion und Stabilität die Bildung von Dimeren von großer Bedeutung ist, könnte der C-Terminus des Proteins beispielsweise bei der Bildung dieser Dimere eine wichtige Rolle spielen. Eine weitere Hypothese wäre, daß der Verlust des C-Terminus den Einbau des Proteins in die peroxisomale Membran verhindert ("Mistargeting") und so in einer vorzeitigen Degradation des Proteins resultiert (Holzinger *et al.*, 1998). Insgesamt zeigten zahlreiche Untersuchungen an Fibroblasten von X-ALD-Patienten, daß bei 67 % aller Mutationen ALDP mittels immunzytochemischer Methoden nicht nachweisbar ist (Feigenbaum *et al.*, 1996; Kemp *et al.*, 1996; Watkins *et al.*, 1995). Jedoch konnte bislang bei allen Patienten, unabhängig von Art und Lokalisation der Mutation, ALDP-spezifische mRNA nachgewiesen werden (Ligtenberg *et al.*, 1995). Der Verlust von ALDP ist somit eher durch Protein-Instabilität als durch RNA-Instabilität bedingt. Die immunologische Nachweisbarkeit von ALDP wurde bislang nur bei Missense-Mutationen beobachtet, die überwiegend (9 von 13 untersuchten Mutationen) in der membranspannenden Domäne lagen (Smith *et al.*, 1999). Die Mechanismen, die zu einem so hohen Anteil an Proteinverlust führen, sind derzeit noch unbekannt.

Zusammenfassend legen die Daten bezüglich der von uns beschriebenen 8 neuen Mutationen nahe, daß sie ursächlich mit dem Auftreten von X-ALD in den betreffenden Familien in Zusammenhang stehen.

Weltweit wurden durch verschiedene Arbeitsgruppen bislang mehr als 300 Mutationen im *ALD*-Gen identifiziert. Sie alle werden in einer elektronischen Datenbank gesammelt (www.x-ald.nl). Eine Zusammenschau von mehr als 200 Mutationen aus dem Jahr 1999 (Smith *et al.*, 1999)

zeigte, daß – wie auch in der vorliegenden Untersuchung – überwiegend Missense-Mutationen (53,5 %) nachzuweisen waren. Weit weniger häufig fanden sich Frameshift- (24 %), Nonsense-Mutationen (8,5 %), größere (> 1 Exon) Deletionen (6,5 %), Deletionen und Insertionen ohne Verschiebung des Leserahmens (5 %) sowie Splice-Site-Mutationen (2,5 %). Bei 68,5 % der Mutationen handelte es sich um “private” Mutationen, d. h. Mutationen, die in nur einer einzigen Familie identifiziert wurden. Nur 31,5 % der Mutationen wurden in mehreren, unverwandten Familien nachgewiesen. Vergleichbar hierzu fanden sich in der vorliegenden Arbeit 53 % neue („private“) und 47 % zuvor beschriebene Mutationen.

Mutationen finden sich in allen Bereichen des *ALD*-Gens, sie sind jedoch nicht gleichmäßig über das Gen verteilt (Moser *et al.*, 2001). Die häufigste Mutation findet sich in Exon 5. Sie konnte auch in unserem Kollektiv in einer Familie (Familie M) nachgewiesen werden. Es handelt sich um eine 2 bp-Deletion (del 1802-02), die bisher bei insgesamt 12 % der untersuchten Familien auftrat und als die “Hot Spot-Mutation” des *ALD*-Gens gilt (Moser *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 1999). Die Deletion von zwei Basenpaaren führt zu einer Verschiebung des Leserahmens und einem vorzeitigen Stop-Codon an Position 554. Dem daraus abgeleiteten Protein fehlt die gesamte ATP-bindende Domäne, es ist deshalb sehr wahrscheinlich funktionell inaktiv. Darüberhinaus finden sich gehäuft Mutationen in der membranspannenden (38 %) sowie der ATP-bindenden (29 %) Domäne des ALDP (Moser *et al.*, 2001). Die membranspannende Domäne wird im wesentlichen vom Exon 1 des *ALD*-Gens kodiert, in dem sich 6 von 15 Mutationen (40 %) des Kollektivs der vorliegenden Arbeit fanden. 5 Mutationen (33%) fanden sich in den Exons 5, 6, 7 und 8, den Exons, die die nukleotidbindende Domäne kodieren.

Bezüglich Art und Häufigkeit der Mutationen, deren Verteilung innerhalb der *ALD*-Gens, sowie der Häufigkeit des Auftretens von Neu- und Spontanmutationen unterscheiden sich die Daten der vorliegenden Arbeit somit nicht von den bisher in der Literatur veröffentlichten Daten.

In einer (6,6 %) von 15 Familien (Familie J) fand sich eine Spontanmutation des Index-Patienten, d. h. kein weiteres Familienmitglied ist Träger dieser Mutation. Dies entspricht etwa den in anderen Untersuchungen berichteten Häufigkeiten von Spontanmutationen von 6,8 % (Feigenbaum *et al.*, 1996) und 7,8 % (Fanen *et al.*, 1994). Im allgemeinen würde man bei einer X-chromosomalen Erkrankung, bei der etwa 36 % der betroffenen männlichen Patienten das reproduktionsfähige Alter nicht erreichen (*reproduktive fitness* 0,36; entspricht dem Anteil der CCALD-Verlaufsformen) (Bezman *et al.*, 2001), eine Spontanmutationsrate von 20 % erwarten

(Feigenbaum *et al.*, 1996). Die deutlich niedrigere beobachtete Spontanmutationsrate mag darauf zurückzuführen sein, daß die Prävalenz der milderen Verlaufsformen von X-ALD, insbesondere AMN und ADO, häufiger ist als bislang vermutet, diese Formen aber oftmals nicht diagnostiziert werden (Sadeghi-Nejad & Senior, 1990; van Geel *et al.*, 1994).

Bei allen untersuchten Frauen der 15 Familien konnte eine heterozygote Mutation im *ALD*-Gen entweder eindeutig nachgewiesen, oder aber sicher ausgeschlossen werden. Hingegen können durch die Bestimmung der VLCFA in Plasma oder Fibroblasten nicht alle ALD-Überträgerinnen sicher diagnostiziert werden, da 15 % aller obligat heterozygoten Überträgerinnen normale Konzentrationen an VLCFA aufweisen. Die Anwendung alternativer diagnostischer Methoden wie der immunologische Nachweis von ALDP oder eine Mutationsanalyse ist daher häufig erforderlich. Der Nachweis von ALDP mittels Immunfluoreszenz setzt hierbei jedoch einerseits Informationen bezüglich der Nachweisbarkeit von ALDP beim Index-Patienten voraus. Andererseits führen etwa 30 % der Mutationen des *ALD*-Gens nicht zu einem vollständigen Verlust von ALDP und machen so die Anwendung dieser Methode unmöglich. So zeigte XALD-37 (MT-11) normale Konzentrationen von VLCFA im Plasma, obwohl zwei ihrer Söhne an einer CCALD erkrankt waren und sie damit die genetischen Kriterien einer obligat heterozygoten Überträgerin erfüllte. Daten bezüglich der immunologischen Nachweisbarkeit von ALDP lagen hier nicht vor. Der experimentelle Nachweis des Überträgerstatus gelang schließlich nur durch Mutationsanalyse. Jedoch auch bei biochemisch identifizierten Überträgerinnen kann die sichere Nachweisbarkeit einer Mutation im heterozygoten Zustand von essentieller Bedeutung sein. Dies zeigte sich bei Familie M und der von uns durchgeführten pränatalen Diagnose. Der Index-Patient der Familie war mehrere Jahren zuvor an CCALD verstorben, bevor eine Mutationsanalyse oder der immunologische Nachweis von ALDP verfügbar waren. Probenmaterial des Index-Patienten stand nicht mehr zur Verfügung. Die Bestimmung der VLCFA aus kultivierten Amnionzellen des Fötus hatte kein eindeutiges Ergebnis erbracht. Das Vorliegen einer X-ALD konnte erstmals durch den Nachweis einer heterozygoten Mutation im *ALD*-Gen der Mutter sowie dem Ausschluß dieser Mutation beim Fötus ausgeschlossen werden (Maier *et al.*, 1999).

Der Nachweis einer Mutation im *ALD*-Gen im heterozygoten Zustand stellt zwar die sicherste Methode zum Nachweis oder Ausschluß eines heterozygoten ALD-Überträgerstatus dar. Ihr sind jedoch gerade bei fehlender Information bezüglich des Index-Patienten Grenzen gesetzt. So

können größere Deletionen, d. h. Deletionen die mehr als ein Exon umspannen, durch Sequenzierung von heterozygoten Individuen nicht erfaßt werden. Diese Mutationen machen jedoch etwa 6,5 % der Mutationen im *ALD*-Gen aus. Es entsteht also auch bei der Durchführung einer Mutationsanalyse bei potenziellen Überträgerinnen eine diagnostische Lücke von etwa 6,5 %.

Eines der Ziele dieser Arbeit war es deshalb zu prüfen, ob mit Hilfe der Untersuchung der X-Inaktivierung diese diagnostische Lücke geschlossen werden kann.

Darüberhinaus war der Nachweis einer heterozygoten Mutation im *ALD*-Gen bei den Überträgerinnen Voraussetzung für die nachfolgende Untersuchung der X-Inaktivierung heterozygoter Überträgerinnen von X-ALD im Vergleich zu zwei Kontroll-Kollektiven.

4.2. Untersuchung der X-Inaktivierung

Etablierung, Modifizierung und Optimierung der Nachweismethode

Der Androgenrezeptor-Test (Allen *et al.*, 1992), der auf einem methylierungssensitiven Restriktionsverdau und der Amplifikation eines Polymorphismus im Androgenrezeptor basiert, stellt einen reproduzierbaren und verlässlichen Test zur Untersuchung von X-Inaktivierungsmustern dar. Er weist entscheidende Vorteile gegenüber früher verwendeten X-Inaktivierungstests auf.

Erstens handelt es sich bei dem untersuchten CAG-Repeat um einen hochpolymorphen Locus, der eine Anwendung dieses Tests bei über 90 % aller Frauen ermöglicht.

Zweitens befinden sich die Schnittstellen der methylierungssensitiven Enzyme *HpaII* und *CfoI* in so geringer Distanz zu dem untersuchten Polymorphismus, daß eine PCR anstelle eines weitaus aufwendigeren Southern Blots möglich ist.

Und drittens erfordert der Test aufgrund der Amplifikation mittels PCR im Vergleich zu einem Southern Blot nur sehr geringe Mengen an DNA.

In der vorliegenden Arbeit wurde der ursprünglich beschriebene Test modifiziert und weiter verbessert. Zum einen wurde durch die Verwendung eines fluoreszenzmarkierten Primers in der PCR eine automatisierte Auswertung und objektive Quantifizierung mittels Fragmentanalyse

ermöglicht und der Einsatz radioaktiver Substanzen vermieden. Ein weiteres Ziel war es, die beiden Hauptfehlerquellen des Tests – die bevorzugte Amplifikation des kürzeren Allels in der PCR und den nicht vollständigen genomischen Restriktionsverdau – weitestgehend zu eliminieren.

Die bevorzugte Amplifikation des kürzeren Allels in der PCR konnte durch eine Fragmentierung der DNA außerhalb des zu amplifizierenden Bereichs durch das Restriktionsenzym *RsaI* deutlich reduziert werden. Dabei wurden mit *RsaI* nicht nur die Proben geschnitten, mit deren Hilfe die Korrekturfaktoren berechnet wurden (Abb. 8 u.9: 1), sondern *RsaI* wurde auch den methylierungssensitiven Enzymen zugegeben, um so auch bei diesen Proben eine vergleichbare Amplifikation beider Allele zu gewährleisten (Abb. 8 u.9: 2 u. 3). Ein vergleichbares Vorgehen wurde auch von Kopp *et al.* (1997) beschrieben.

Zur Erstellung verlässlicher Ergebnisse müssen die methylierungssensitiven Restriktionsverdau genomischer DNA unter möglichst kontrollierten Bedingungen ablaufen. Es wurde deshalb mit Hilfe eines *MspI*-Restriktionsverdau ein zusätzlicher Kontrollschritt eingeführt, der für jede einzelne Probe die Vollständigkeit des genomischen Restriktionsverdau überprüft. Das Restriktionsenzym *MspI* erkennt dieselbe Schnittstelle wie *HpaII* und schneidet auch wie *HpaII*. Es schneidet jedoch immer, unabhängig vom Methylierungszustand der DNA. Bei einem vollständigen Restriktionsverdau darf also nach *MspI*-Restriktionsverdau kein PCR-Produkt mehr amplifizierbar sein (Abb. 8 u.9: 4).

Zur Überprüfung der Verlässlichkeit und Konsistenz des Ergebnisses wurde mit *HpaII* und *CfoI* in getrennten Ansätzen verdaut. Beide methylierungssensitiven Restriktionsenzyme verfügen über Schnittstellen in dem zu amplifizierenden Bereich, die mit der X-Inaktivierung korrelieren. Sofern Konsistenz vorliegt, müssen die getrennt voneinander ausgewerteten Ergebnisse nach den beiden Verdau also in engen Grenzen übereinstimmen. In der vorliegenden Arbeit wurden Proben, deren Ergebnisse nach *HpaII/RsaI*- und *CfoI/RsaI*-Verdau mehr als 15 Prozentpunkte differierten, als nicht interpretierbar angesehen und von einer weiteren Beurteilung ausgeschlossen. In den drei untersuchten Gruppen (heterozygote ALD-Überträgerinnen, Nicht-Überträgerinnen aus ALD-Familien und Kontrollen) fanden sich insgesamt 10 solcher Proben. Ungeklärte Unterschiede dieser Art wurden bislang nicht beschrieben. In erster Linie, weil der überwiegende Teil der Autoren für den Test ausschließlich *HpaII* verwendete (Busque *et al.*, 1996; Kopp *et al.*, 1997; Vulliamy *et al.*, 1997; Yoshioka *et al.*, 1998) oder mit beiden Restriktionsenzymen gleichzeitig inkubierte (Pegoraro *et al.*, 1994). Im Gegensatz zur

vorliegenden Arbeit konnten Unterschiede zwischen den beiden Enzymen so bisher nicht zur Darstellung kommen. Allen *et al.* (1992) hielten eine getrennte Untersuchung mit beiden methylierungssensitiven Restriktionsenzymen für unnötig, da die Lage der Primer so gewählt wurde, daß zwei Schnittstellen jedes Enzyms flankiert werden. Es wurde postuliert, daß auf diese Weise mögliche, geringfügige Methylierungsunterschiede zwischen den Schnittstellen ausgeglichen würden. Diese Annahme kann durch die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit eindeutig widerlegt werden. Für das Auftreten dieser Unterschiede sind verschiedene Gründe denkbar:

Möglicherweise sind die Methylierungsmuster der einzelnen Restriktionsenzym-Schnittstellen komplexer als bisher angenommen und müssen noch eingehender untersucht werden. Die Methylierung von CpG-Inseln im 5'-Bereich von Genen des inaktiven X-Chromosoms zeigt keine konservierten Muster, sondern erfolgt sehr heterogen. Das Spektrum reicht von nahezu vollständig methylierten Abschnitten bis hin zu Bereichen, in denen nur eine einzige konstante Methylierung vorliegt (Park & Chapman, 1994; Pfeifer *et al.*, 1990; Tommasi *et al.*, 1993; Tribioli *et al.*, 1992).

Auch eine differenzielle Methylierung des aktiven Androgenrezeptor-Allels könnte zu den Unterschieden zwischen *HpaII/RsaI*- und *CfoI/RsaI*-restriktionsverdauten Proben führen. Liegen beispielsweise auch die *HpaII*-Schnittstellen des aktiven Allels teilweise methyliert vor, werden diese Allele im methylierungssensitiven Restriktionsverdau nicht geschnitten. Eine *non-random* X-Inaktivierung würde dann in variablem Ausmaß in Richtung *random* X-Inaktivierung verschoben. Diese Hypothese könnte das beobachtete geringgradig vermehrte Auftreten von *random* X-Inaktivierung nach Inkubation mit *HpaII* erklären. Ähnliche Phänomene differenzieller Methylierung von Allelen wurden im Verlauf der Anwendung der früher sehr gebräuchlichen Sonde M27 β (DXS255) beobachtet. Zwei der drei Schnittstellen auf dem inaktiven Allel liegen dort unmethyliert oder aber partiell methyliert vor. Nur das aktive Allel wird hier konstant methyliert (Fey *et al.*, 1994).

Eine weitere Ursache könnte eine Hypermethylierung der DNA inaktivierter Allele sein. Diese führt zu einem inkomplettem Verdau und *non-random* X-Inaktivierung wird in Richtung *random* verschoben (El-Kassar *et al.*, 1998). Hypermethylierung wurde verstärkt in peripheren Blutzellen, aber auch in einigen Malignomen beobachtet (Gale *et al.*, 1992; Hendriks *et al.*, 1991; Hodges *et al.*, 1991).

Wir konnten beobachten, daß die Unterschiede nach *HpaII/RsaI*- und *CfoI/RsaI*-Restriktionsverdau bei zwei Schwestern (XALD-51 und XALD-53) in gleicher Weise auftraten. Eine familiäre Häufung aufgrund besonderer Eigenschaften von DNA-Methylasen ist daher nicht auszuschließen. Letztendlich könnten jedoch auch Unterschiede zwischen den Aktivitäten der beiden Enzyme zu den beobachteten Unterschieden beitragen, indem unter Versuchsbedingungen eines der beiden Restriktionsenzyme besser schneidet als das andere oder weniger anfällig für Inhibitoren ist. Die Unterschiede wären dann als Ausdruck eines inkompletten Verdau zu werten. Dagegen spricht allerdings die sehr gute Reproduzierbarkeit sowohl des Testes als auch der Unterschiede.

Zusammenfassend zeigt unsere Evaluierung des Androgenrezeptor-Testes, daß

- für die analytische Qualitätssicherung der Ergebnisse die Verwendung von zwei verschiedenen methylierungssensitiven Restriktionsenzymen in getrennten Ansätzen unbedingt zu empfehlen ist.
- durch die Verwendung eines fluoreszenzmarkierten Primers die Auswertung der Ergebnisse automatisierbar ist und der Einsatz radioaktiver Substanzen vermieden werden kann.
- Bei der Etablierung einer neuen Methode eine Optimierung der Testbedingungen (DNA-Polymerase, PCR-Bedingungen, Primerwahl etc.) für die Generierung reproduzierbarer Ergebnisse erforderlich ist.

X-Inaktivierung bei ALD-Überträgerinnen und Kontrollen

Ein Großteil der heterozygoten ALD-Überträgerinnen zeigt in abgemilderter Form biochemische sowie klinische Merkmale einer X-ALD (Moser *et al.*, 2001). Dies wurde in der Vergangenheit auf eine zugunsten des mutierten Allels verschobene X-Inaktivierung der ALD-Überträgerinnen zurückgeführt (Gärtner *et al.*, 1998; Migeon *et al.*, 1981; Moser *et al.*, 2001). Diese Hypothese wurde jedoch nie eindeutig bewiesen und es liegen widersprüchliche Daten vor (Watkiss *et al.*, 1993). Unter Verwendung einer verbesserten Testmethode wurde in der vorliegenden Arbeit die X-Inaktivierung in Leukozyten einer großen Gruppe von ALD-Überträgerinnen im Vergleich zu einem verwandten und einem nicht-verwandten Kontrollkollektiv untersucht.

Die Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen in jeder weiblichen somatischen Zelle wird als Mechanismus angesehen, der dem Ausgleich der Gen-Dosis im Vergleich zur männlichen Zelle mit nur einem X-Chromosom dient (Lyon, 1961). Es handelt sich um einen zufälligen Prozeß, der dazu führt, daß die Gewebe weiblicher Individuen aus einem Mosaik von Zellen bestehen, in denen einmal das maternale und einmal das paternale X-Chromosom exprimiert wird. Dabei trägt jede der beiden Zell-Populationen zu annähernd gleichen Teilen zu diesem Mosaik bei. Da es sich um einen zufälligen Prozeß handelt, folgt die Verteilung der X-Inaktivierungsmuster einer Gauß'schen Normalverteilung. Eine zugunsten eines X-Chromosoms verschobene X-Inaktivierung kommt bei gesunden Individuen nur sehr selten vor (Puck & Willard, 1998). Daher ist es nicht überraschend, daß in der vorliegenden Arbeit weder in der verwandten noch in der nicht-verwandten Kontrollgruppe ausgeprägtes *Skewing* (> 80:20) nachgewiesen werden konnte. Auch in der überwiegenden Mehrzahl der Studien, in denen ähnliche Tests verwendet wurden, war ein ausgeprägtes *Skewing* bei den Kontrollen nur selten zu beobachten (10 – 17 % der Kontrollen) (Busque *et al.*, 1996; Harris *et al.*, 1992; Mitterbauer *et al.*, 1999; Orstavik *et al.*, 1998; Pegoraro *et al.*, 1994; Puck *et al.*, 1992). In einigen wenigen Studien jedoch zeigten bis zu 30 % der Kontrollen eine deutliche Verschiebung der X-Inaktivierung zugunsten eines Allels (Gale *et al.*, 1997; Naumova *et al.*, 1996; Racchi *et al.*, 1998; Sumita *et al.*, 1998). Dieser höhere Prozentsatz kann zufällig auftreten oder in der angewandten Methode begründet sein. Wahrscheinlich jedoch ist er durch die im Vergleich zur vorliegenden Arbeit sehr viel kleineren Stichprobengrößen der betreffenden Kontrollkollektive bedingt. Immer wieder werden auch genetische Faktoren als Gründe für eine Verschiebung der X-Inaktivierung postuliert. In den letzten Jahren wurden einzelne Familien beschrieben, in denen eine familiäre Verschiebung der X-Inaktivierung zugunsten eines Allels beobachtet wurde (Belmont, 1996; Naumova *et al.*, 1996; Parolini *et al.*, 1998). Eine Identifizierung der zugrundeliegenden genetischen Faktoren gelang noch nicht. Bisher konnte nur eine Mutation im XIST-Gen nachgewiesen werden, die zu einer vermehrten X-Inaktivierung des betroffenen X-Chromosoms führt (Plenge *et al.*, 1997). Diese Mutationen sind jedoch sehr selten und können daher nicht das häufige Auftreten von ausgeprägtem *Skewing* in den genannten Kontrollkollektiven erklären.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die X-Inaktivierung in Leukozyten von 22 ALD-Überträgerinnen untersucht werden. Dabei zeigte sich *random* X-Inaktivierung (50:50 - 65:35), mildes (<65:35 - 80:20) und ausgeprägtes *Skewing* (>80:20) zu annähernd gleichen Teilen. Die

Verteilung der X-Inaktivierungsmuster der ALD-Überträgerinnen (Abb. 11A) unterschied sich deutlich von der der Nicht-Überträgerinnen aus ALD-Familien (Abb. 11B) und der der Kontrollen (Abb. 11C). In keiner der beiden Kontrollgruppen konnte ausgeprägtes *Skewing* nachgewiesen werden. Die Unterschiede zwischen Überträgerinnen und Kontrollen erwiesen sich als statistisch hochsignifikant. Aufgrund der sehr kleinen Stichprobengröße der Nicht-Überträgerinnen mußte bei dieser Gruppe auf eine statistische Testung verzichtet werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen eindeutig, daß es bei heterozygoten ALD-Mutationsträgerinnen deutlich häufiger zu einer Verschiebung der X-Inaktivierung zugunsten eines Allels in Leukozyten kommt. Es ist davon auszugehen, daß diese Verschiebung mit dem mutierten ALD-Allel in Zusammenhang steht.

Alle sieben Überträgerinnen, die ein ausgeprägtes *Skewing* zeigten, gehörten unterschiedlichen Familien an. Familiäre (genetische) Ursachen einer zugunsten eines Allels verschobenen X-Inaktivierung erscheinen daher sehr unwahrscheinlich, da nicht zu erwarten ist, daß diese in sieben Familien eines Kollektivs auftreten. Darüberhinaus war das Auftreten des ausgeprägten *Skewings* klar mit dem Überträgerstatus assoziiert. Es war bei keiner der sieben Nicht-Überträgerinnen der betroffenen Familien nachzuweisen.

Auch altersbedingte Faktoren sind nur schwer mit dem häufigen Auftreten von ausgeprägtem *Skewing* bei Überträgerinnen in Zusammenhang zu bringen. Die vermehrte Häufigkeit von extremem *Skewing* (> 90:10) aufgrund von Stammzellverlust und Selektionsvorgängen bei Frauen über 65 Jahren wurde von einigen Autoren postuliert (Busque *et al.*, 1996; Fey *et al.*, 1994; Gale *et al.*, 1997). Jedoch zeigte nur eine (MT-3) von drei Überträgerinnen in der betreffenden Altersgruppe dieses Kollektivs extremes *Skewing*, die beiden anderen waren *random* X-inaktiviert (MT-22) bzw. zeigten nur mildes *Skewing* (MT-13). In der altersmäßig vergleichbaren Kontrollgruppe dagegen fand sich kein ausgeprägtes *Skewing*.

Das signifikant häufigere Auftreten von ausgeprägtem *Skewing* in Leukozyten heterozygoter Überträgerinnen von X-ALD im Vergleich zu einem verwandten und einem nicht-verwandten Kontrollkollektiv kann insgesamt nicht durch ALD-unabhängige Variablen, wie genetische Faktoren, die primär die X-Inaktivierung beeinflussen, Mutationen im XIST-Gen oder das Alter der Überträgerinnen erklärt werden. Es ist vielmehr davon auszugehen, daß die beobachtete Verschiebung der X-Inaktivierung zugunsten eines Allels mit dem mutierten ALD-Allel der Überträgerinnen in direktem Zusammenhang steht.

In Abhängigkeit des bevorzugt inaktivierten Allels kann eine Verschiebung der X-Inaktivierung zugunsten eines Allels theoretisch sowohl erhöhte wie auch normale Konzentrationen von VLCFA im Plasma erklären. Es wurden daher die X-Inaktivierungsmuster der einzelnen Überträgerinnen mit deren biochemischen Parametern korreliert. Dabei zeigte sich keinerlei Zusammenhang zwischen dem Grad der X-Inaktivierung in Leukozyten und der Akkumulation von VLCFA im Plasma. Im Gegensatz dazu schienen bevorzugt inaktiviertes Allel und Konzentration von VLCFA in den drei zur Verfügung stehenden Zell-Linien kultivierter Fibroblasten übereinzustimmen. Dies könnte dadurch bedingt sein, daß die Akkumulation von VLCFA in Plasma nicht ausschließlich von Leukozyten verursacht wird, aber unter Kulturbedingungen die Fibroblasten die einzige Quelle der gemessenen VLCFA darstellen.

Im Rahmen der vorliegenden Studie standen aufgrund der Probenacquisition über Einsendelabors keine detaillierten neurologischen Untersuchungsbefunde der einzelnen Überträgerinnen zur Verfügung. Untersuchungen zur Thematik potenzieller Zusammenhänge zwischen X-Inaktivierung und dem Auftreten neurologischer Symptome bei ALD-Überträgerinnen waren daher nicht Ziel dieser Arbeit. In einer Untersuchung von Watkiss *et al.* (1993), die 12 heterozygote Überträgerinnen umfaßte, konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen klinischem Erscheinungsbild und X-Inaktivierung in Leukozyten gezeigt werden.

Die Inaktivierung eines X-Chromosoms kann in den einzelnen Geweben zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Embryonalentwicklung erfolgen. Dies führt dazu, daß das konstitutionelle X-Inaktivierungsmuster von Gewebe zu Gewebe unterschiedlich sein kann (Gale *et al.*, 1994). Auch die Größe der Stammzellpopulation eines Gewebes ist in diesem Zusammenhang von großer Bedeutung. Je kleiner die Stammzellpopulation eines Gewebes ist, desto häufiger kommt es zu einer Verschiebung der X-Inaktivierung zugunsten eines Allels (Puck *et al.*, 1992). Daher wird *Skewing* im allgemeinen häufig in peripheren Blutzellen beobachtet, die über einen berechneten Stammzellen-Pool von nur ca. 20 Zellen verfügen (Puck *et al.*, 1992). Seltener hingegen zeigt sich *Skewing* in Muskelzellen und Fibroblasten (Gale *et al.*, 1994). Ungewöhnlicherweise fanden sich unserer Studie in allen drei Zell-Linien kultivierter Fibroblasten heterozygoter ALD-Mutationsträgerinnen X-Inaktivierungsmuster, die als extremes *Skewing* bezeichnet werden (>95:5; (Fey *et al.*, 1994; Gale *et al.*, 1997; Orstavik *et al.*, 1998)).

Das häufige Auftreten von *non-random* X-Inaktivierungsmustern in Leukozyten und Fibroblasten heterozygoter Überträgerinnen von X-ALD konnte in der vorliegenden Arbeit eindeutig bewiesen werden. Es stellt sich jedoch die Frage nach den Mechanismen, die zu der beobachteten Verschiebung der X-Inaktivierung führen. Der häufige Auftreten von *Skewing* spiegelt sehr wahrscheinlich Selektionsmechanismen wider, die nach dem primären Inaktivierungsprozeß wirken. Diese kommen möglicherweise in Fibroblasten deutlich stärker zum Tragen und resultieren so in einem stärker ausgeprägten *Skewing*. Bei den X-chromosomal gebundenen Immundefektsyndromen Wiskott-Aldrich-Syndrom (Fearon *et al.*, 1988) und Agammglobulinämie (Conley *et al.*, 1986) wurde eine Begrenzung der Wirkung solcher Selektionsmechanismen auf ein bestimmtes "Zielgewebe" beschrieben. Es wurde postuliert, daß die X-Inaktivierung anderer Gewebe aufgrund einer geringeren Bedeutung des Genproduktes für die Entwicklung dieser Gewebe unbeeinflußt bleibt. In bezug auf X-ALD müßte diese Hypothese durch die Untersuchung der X-Inaktivierung in verschiedenen Geweben überprüft werden. In einer zurückliegenden Untersuchung fanden sich Hinweise auf ein deutlich ausgeprägteres *Skewing* in Fibroblasten verglichen mit Leukozyten (Migeon *et al.*, 1981). In dieser Studie wurde jedoch, ausgehend von der überwiegenden Anzahl der Fibroblastenzell-Klone, ein Selektionsvorteil des mutierten Allels beschrieben. Die X-ALD ist zum derzeitigen Zeitpunkt die einzige X-chromosomal gebundene Erkrankung, bei der eine Selektion gegen das Wildtyp-Allel postuliert wurde. Trotz der geringen Probenzahl widerlegen die neuen Transkript-Untersuchungen der vorliegenden Arbeit die Hypothese eines Selektionsvorteils zugunsten des mutierten Allels. Zwei von drei Überträgerinnen zeigten eine Selektion zugunsten des Wildtyp-Allels, eine Überträgerin zeigte eine Selektion zugunsten des ALD-Allels.

Interessanterweise finden sich bei ALD-Mutationsträgerinnen einerseits *random* und *non-random* X-Inaktivierung, andererseits aber auch eine Selektion zugunsten und zu Ungunsten des ALD-Allels. Möglicherweise wirken modifizierende Faktoren auf die Selektionsmechanismen ein. Ähnliches wurde im Falle des Barth-Syndroms postuliert (Orstavik *et al.*, 1998). Beim Barth-Syndrom handelt es sich um eine seltene X-chromosomal vererbte Erkrankung, die charakterisiert ist durch eine Myopathie der Herz- und Skelettmuskulatur, Neutropenie und Kleinwuchs. Wie beim Barth-Syndrom führen auch Mutationen im *ALD*-Gen zu einem breiten Spektrum klinischer Verläufe. Identische Mutationen können selbst innerhalb einer Familie zu unterschiedlicher phänotypischer Ausprägung führen (Berger *et al.*, 1994; Moser *et al.*, 2001). Die Existenz modifizierender genetischer und/oder Umweltfaktoren wurde immer wieder

postuliert (Maestri & Beaty, 1992; Moser *et al.*, 1992). Als mögliche Kandidaten hierfür werden die drei anderen bekannten peroxisomalen ABC-Halbtransporter ALDR, PMP70 und PMP69 sowie alle die Gene, die an der Regulation der VLCS beteiligt sind, diskutiert (Smith *et al.*, 1999). Die genannten Gene werden zudem gewebsspezifisch exprimiert.

In Analogie zu hemizygoten ALD-Patienten könnten dieselben modifizierende Faktoren auch bei ALD-Überträgerinnen von Bedeutung sein. In einigen Überträgerinnen führt die Mutation im *ALD*-Gen zu extremem Skewing zugunsten des mutierten Allels. Bei anderen könnten modifizierende Faktoren eine Unterdrückung der Favorisierung des mutierten Allels bewirken und so zu nur mildem *Skewing* oder sogar zu einer Favorisierung des Wildtyp-Allels führen. Die gewebsspezifische Expression der einzelnen modifizierenden Gene könnte darüberhinaus zur Erklärung des unterschiedlichen Ausmaßes der Akkumulation von VLCFA und/oder der Verschiebung der X-Inaktivierung in den einzelnen Geweben beitragen.

Ausblick

Die X-Inaktivierungsmuster heterozygoter ALD-Überträgerinnen in unterschiedlichen Geweben sollten eingehend untersucht werden. Sie könnten Aufschluß geben über die Relevanz des Genproduktes ALDP für die Differenzierung der betreffenden Gewebe und damit letztlich dazu beitragen, einige der pathogenetischen Mechanismen von X-ALD zu klären. Die Durchführung von Transkriptanalysen ist zur Beantwortung der Frage nach einer Selektion zugunsten oder zu Ungunsten des mutierten ALD-Allels für jeden Einzelfall unabdingbar. Darüberhinaus wird die Identifizierung der modifizierenden genetischen Faktoren von großer Bedeutung sein.

Auch eine Mutationsanalyse des *ALD*-Gens wird weiterhin in nahezu allen ALD-Familien erforderlich sein. Einerseits stellt sie die sicherste Methode zur Identifizierung heterozygoter Überträgerinnen dar. Andererseits erhöht die Mutationsanalyse die diagnostische Sicherheit pränataler Diagnosen. Und nicht zuletzt liefert sie wertvolle ergänzende Informationen im Rahmen vieler wissenschaftlicher Fragestellungen

5. Zusammenfassung

Die X-chromosomal gebundene Adrenoleukodystrophie stellt eine vererbte Störung der peroxisomalen β -Oxidation von Fettsäuren dar, die zu einer Akkumulation von überlangkettigen Fettsäuren in allen Körperflüssigkeiten führt. X-ALD wird durch Mutationen im *ALD*-Gen verursacht, welches ein peroxisomales Membranprotein aus der Superfamilie der ABC-Transporter (*ATP-binding cassette*) kodiert. Die Erkrankung führt zu einer fortschreitenden Demyelinisierung des ZNS, einer peripheren Neuropathie sowie adrenokortikaler Insuffizienz. Es findet sich jedoch eine sehr hohe Variabilität phänotypischer Verlaufsformen. Aus bislang unklaren Gründen zeigt ein Großteil der heterozygoten Überträgerinnen - im Gegensatz zu der überwiegenden Mehrzahl anderer X-chromosomal vererbter Erkrankungen - sowohl die biochemischen als auch die klinischen Merkmale einer X-ALD in abgemilderter Form. Zur Erklärung dieses Phänomens sollte die Untersuchung der X-Inaktivierung heterozygoter Überträgerinnen beitragen, da in der Vergangenheit postuliert wurde, daß eine zugunsten des mutierten *ALD*-Allels verschobene X-Inaktivierung (mit-)verantwortlich sei für das Auftreten erhöhter Konzentrationen überlangkettiger Fettsäuren und neurologischer Symptome bei *ALD*-Überträgerinnen.

Zur Untersuchung der X-Inaktivierung wurde der hochinformativ Androgenrezeptor-Test etabliert und in einigen Punkten modifiziert und verbessert. Das Testprinzip beruht auf der PCR-Amplifikation eines hochpolymorphen CAG-Repeats im Exon 1 des Androgenrezeptor-Gens nach einer Inkubation von genomischer DNA mit methylierungssensitiven Restriktionsenzymen. Die Verwendung eines fluoreszenz-markierten Primers in der PCR ermöglichte eine präzise automatisierte Auswertung mittels Fragmentanalyse.

Neben einer Bestimmung der überlangkettigen Fettsäuren im Plasma wurde der Heterozygotenstatus der *ALD*-Überträgerinnen durch eine Mutationsanalyse des *ALD*-Gens eindeutig belegt. Dabei konnten in allen 15 untersuchten Familien Mutationen im *ALD*-Gen identifiziert werden. Bei 8 Familien fanden sich neue, bislang unveröffentlichte Mutationen. Das Mutationsspektrum umfaßte 10 Missense- (67 %), zwei Nonsense- (13 %), zwei Splice-Site-Mutationen (13 %) und eine Frameshift-Mutation (6 %).

Die X-Inaktivierungsmuster in Leukozyten heterozygoter *ALD*-Überträgerinnen wurden erstmals im Vergleich zu einem verwandten und einem nicht-verwandten Kontrollkollektiv untersucht. Bei 7 von 22 Überträgerinnen (32 %) zeigte sich eine ausgeprägte Verschiebung der X-

Inaktivierung (*Skewing*) zugunsten eines Allels (> 80:100). Im Gegensatz dazu war ein ausgeprägtes *Skewing* weder bei den Nicht-Überträgerinnen aus ALD-Familien noch bei den Kontrollen zu beobachten. In diesen Gruppen fanden sich nur *random* X-Inaktivierung und mildes *Skewing* zu annähernd gleichen Teilen. Bei beiden Gruppen glich die Verteilung der X-Inaktivierungsmuster einer Gauss'schen Normalverteilungskurve. Die Unterschiede zwischen ALD-Überträgerinnen und unverwandtem Kontrollkollektiv erwiesen sich als statistisch hochsignifikant.

Eine Korrelation zwischen dem Grad der X-Inaktivierung in Leukozyten heterozygoter ALD-Überträgerinnen und deren biochemischen Parametern (Konzentration überlangkettiger Fettsäuren im Plasma) war nicht nachweisbar.

Unsere Daten belegen, daß das häufige Auftreten einer Verschiebung der X-Inaktivierung zugunsten eines Allels bei ALD-Überträgerinnen mit dem mutierten ALD-Allel in Zusammenhang steht und wahrscheinlich durch Selektionsmechanismen verursacht wird. Diese Selektionsmechanismen wirken nach dem primären X-Inaktivierungsprozeß. Andere sekundäre Einflußvariablen wie Alter oder genetische Faktoren des X-Inaktivierungsprozesses selbst wurden mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen.

Anhand von Transkriptanalysen in kultivierten Fibroblasten konnte darüberhinaus gezeigt werden, daß einerseits eine Selektion zugunsten des Wildtyp-Allels, andererseits jedoch auch eine Selektion zugunsten des mutierten Allels vorkommt. Der bislang in der Literatur postulierte Selektionsvorteil des mutierten ALD-Allels wird somit in Frage gestellt.

LITERATURVERZEICHNIS

- Allen RC, Nachtman RG, Rosenblatt HM & Belmont JW. (1994). Application of carrier testing to genetic counseling for X-linked agammaglobulinemia. *Am J Hum Genet* **54**, 25-35.
- Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM & Belmont JW. (1992). Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet* **51**, 1229-39.
- Aubourg P. (1996). X-linked Adrenoleukodystrophy. In *Handbook of Clinical Neurology: Neurodystrophies and Neurolipidoses* (ed. H. W. Moser), pp. 447-483. Elsevier Science, Amsterdam.
- Aubourg P, Blanche S, Jambaque I, Rocchiccioli F, Kalifa G, Naud-Saudreau C, Rolland MO, Debre M, Chaussain JL, Griscelli C & et al. (1990). Reversal of early neurologic and neuroradiologic manifestations of X-linked adrenoleukodystrophy by bone marrow transplantation. *N Engl J Med* **322**, 1860-6.
- Barr ML & Carr DH. (1961). Correlations between sex chromatin and sex chromosomes. *Acta Cytologica* **6**, 34-35.
- Belmont JW. (1996). Genetic control of X inactivation and processes leading to X-inactivation skewing. *Am J Hum Genet* **58**, 1101-8.
- Berger J, Molzer B, Fae I & Bernheimer H. (1994). X-linked adrenoleukodystrophy (ALD): a novel mutation of the ALD gene in 6 members of a family presenting with 5 different phenotypes. *Biochem Biophys Res Commun* **205**, 1638-43.
- Bezman L, Moser AB, Raymond GV, Rinaldo P, Watkins PA, Smith KD, Kass NE & Moser HW. (2001). Adrenoleukodystrophy: incidence, new mutation rate, and results of extended family screening. *Ann Neurol* **49**, 512-7.
- Boehm CD, Cutting GR, Lachtermacher MB, Moser HW & Chong SS. (1999). Accurate DNA-based diagnostic and carrier testing for X-linked adrenoleukodystrophy. *Mol Genet Metab* **66**, 128-36.
- Boyd Y & Fraser NJ. (1990). Methylation patterns at the hypervariable X-chromosome locus DXS255 (M27 beta): correlation with X-inactivation status. *Genomics* **7**, 182-7.
- Braun A, Kammerer S, Ambach H & Roscher AA. (1996). Characterization of a partial pseudogene homologous to the adrenoleukodystrophy gene and application to mutation detection. *Hum Mutat* **7**, 105-8.
- Braun A, Ambach H, Kammerer S, Rolinski B, Stöckler S, Rabl W, Gärtner J, Zierz S & Roscher AA. (1995). Mutations in the gene for X-linked adrenoleukodystrophy in patients with different clinical phenotypes. *Am J Hum Genet* **56**, 854-61.
- Broccardo C, Troffer-Charlier N, Savary S, Mandel JL & Chimini G. (1998). Exon organisation of the mouse gene encoding the Adrenoleukodystrophy related protein (ALDRP). *Eur J Hum Genet* **6**, 638-41.
- Brown CJ, Carrel L & Willard HF. (1997). Expression of genes from the human active and inactive X chromosomes. *Am J Hum Genet* **60**, 1333-43.
- Brown CJ, Hendrich BD, Rupert JL, Lafreniere RG, Xing Y, Lawrence J & Willard HF. (1992). The human XIST gene: analysis of a 17 kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus. *Cell* **71**, 527-42.
- Brown CJ, Ballabio A, Rupert JL, Lafreniere RG, Grompe M, Tonlorenzi R & Willard HF. (1991a). A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature* **349**, 38-44.
- Brown CJ, Lafreniere RG, Powers VE, Sebastio G, Ballabio A, Pettigrew AL, Ledbetter DH, Levy E, Craig IW & Willard HF. (1991b). Localization of the X inactivation centre on the human X chromosome in Xq13. *Nature* **349**, 82-4.
- Brown RM & Brown GK. (1993). X chromosome inactivation and the diagnosis of X linked disease in females. *J Med Genet* **30**, 177-84.
- Brown RM, Fraser NJ & Brown GK. (1990). Differential methylation of the hypervariable locus DXS255 on active and inactive X chromosomes correlates with the expression of a human X-linked gene. *Genomics* **7**, 215-21.
- Busque L, Mio R, Mattioli J, Brais E, Blais N, Lalonde Y, Maragh M & Gilliland DG. (1996). Nonrandom X-inactivation patterns in normal females: lyonization ratios vary with age. *Blood* **88**, 59-65.
- Cachia, PG, Culligan DJ, Thomas ED, Whittaker J, Jacobs A & Padua RA. (1992). Methylation of the DXS255 hypervariable locus 5' CCGG site may be affected by factors other than X-chromosome activation status. *Genomics* **14**, 70-74.
- Conley ME, Brown P, Pickard AR, Buckley RH, Miller DS, Raskind WH, Singer JW & Fialkow PJ. (1986). Expression of the gene defect in X-linked agammaglobulinemia. *N Engl J Med* **315**, 564-7.
- Dooley JM & Wright BA. (1985). Adrenoleukodystrophy mimicking multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci* **12**,

- 73-4.
- Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey CT & Chakraborty R. (1992). Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* **12**, 241-53.
- El-Kassar N, Hetet G, Briere J & Grandchamp B. (1998). X-chromosome inactivation in healthy females: incidence of excessive lyonization with age and comparison of assays involving DNA methylation and transcript polymorphisms. *Clin Chem* **44**, 61-7.
- El-Kassar N, Hetet G, Briere J & Grandchamp B. (1997). Clonality analysis of hematopoiesis in essential thrombocythemia: advantages of studying T lymphocytes and platelets. *Blood* **89**, 128-34.
- El-Kassar N, Hetet G, Li Y, Briere J & Grandchamp B. (1995). Clonal analysis of haemopoietic cells in essential thrombocythaemia. *Br J Haematol* **90**, 131-7.
- Fanen P, Guidoux S, Sarde CO, Mandel JL, Goossens M & Aubourg P. (1994). Identification of mutations in the putative ATP-binding domain of the adrenoleukodystrophy gene. *J Clin Invest* **94**, 516-20.
- Fearon ER, Kohn DB, Winkelstein JA, Vogelstein B & Blaese RM. (1988). Carrier detection in the Wiskott Aldrich syndrome. *Blood* **72**, 1735-9.
- Feigenbaum V, Lombard-Platet G, Guidoux S, Sarde CO, Mandel JL & Aubourg P. (1996). Mutational and protein analysis of patients and heterozygous women with X-linked adrenoleukodystrophy. *Am J Hum Genet* **58**, 1135-44.
- Fey MF, Liechti-Gallati S, von Rohr A, Borisch B, Theilkas L, Schneider V, Oestreicher M, Nagel S, Ziemiecki A & Tobler A. (1994). Clonality and X-inactivation patterns in hematopoietic cell populations detected by the highly informative M27 beta DNA probe. *Blood* **83**, 931-8.
- Gale RE, Fielding AK, Harrison CN & Linch DC. (1997). Acquired skewing of X-chromosome inactivation patterns in myeloid cells of the elderly suggests stochastic clonal loss with age. *Br J Haematol* **98**, 512-9.
- Gale RE & Linch DC. (1994). Interpretation of X-chromosome inactivation patterns. *Blood* **84**, 2376-8.
- Gale RE, Wheadon H, Boulos P & Linch DC. (1994). Tissue specificity of X-chromosome inactivation patterns. *Blood* **83**, 2899-905.
- Gale RE, Wheadon H & Linch DC. (1992). Assessment of X-chromosome inactivation patterns using the hypervariable probe M27 beta in normal hemopoietic cells and acute myeloid leukemic blasts. *Leukemia* **6**, 649-55.
- Gärtner J, Braun A, Holzinger A, Roerig P, Lenard HG & Roscher AA. (1998). Clinical and genetic aspects of X-linked adrenoleukodystrophy. *Neuropediatrics* **29**, 3-13.
- Gärtner J & Valle D. (1993). The 70 kDa peroxisomal membrane protein: an ATP-binding cassette transporter protein involved in peroxisome biogenesis. *Semin Cell Biol* **4**, 45-52.
- Goodship J, Carter J, Espanol T, Boyd Y, Malcolm S & Levinsky RJ. (1991). Carrier detection in Wiskott-Aldrich syndrome: combined use of M27 beta for X-inactivation studies and as a linked probe. *Blood* **77**, 2677-81.
- Harris A, Collins J, Vetrie D, Cole C & Bobrow M. (1992). X inactivation as a mechanism of selection against lethal alleles: further investigation of incontinentia pigmenti and X linked lymphoproliferative disease. *J Med Genet* **29**, 608-14.
- Heard E, Clerc P & Avner P. (1997). X-chromosome inactivation in mammals. *Annu Rev Genet* **31**, 571-610.
- Hendriks RW, Kraakman ME, Mensink RG & Schuurman RK. (1991). Differential methylation at the 5' and the 3' CCGG sites flanking the X chromosomal hypervariable DXS255 locus. *Hum Genet* **88**, 105-11.
- Hodges E, Howell WM, Boyd Y & Smith JL. (1991). Variable X-chromosome DNA methylation patterns detected with probe M27 beta in a series of lymphoid and myeloid malignancies. *Br J Haematol* **77**, 315-22.
- Holzinger A, Maier E, Stöckler-Ipsiroglu S, Braun A & Roscher AA. (1998). Characterization of a novel mutation in exon 10 of the adrenoleukodystrophy gene. *Clin Genet* **53**, 482-7.
- Holzinger A, Kammerer S, Berger J & Roscher AA. (1997a). cDNA cloning and mRNA expression of the human adrenoleukodystrophy related protein (ALDRP), a peroxisomal ABC transporter. *Biochem Biophys Res Commun* **239**, 261-4.
- Holzinger A, Kammerer S & Roscher AA. (1997b). Primary structure of human PMP69, a putative peroxisomal ABC-transporter. *Biochem Biophys Res Commun* **237**, 152-7.
- Kamijo K, Kamijo T, Ueno I, Osumi T & Hashimoto T. (1992). Nucleotide sequence of the human 70 kDa peroxisomal membrane protein: a member of ATP-binding cassette transporters. *Biochim Biophys Acta* **1129**, 323-7.
- Kemp S, Wei HM, Lu JF, Braiterman LT, McGuinness MC, Moser AB, Watkins PA & Smith KD. (1998). Gene redundancy and pharmacological gene therapy: implications for X-linked adrenoleukodystrophy. *Nat Med* **4**, 1261-8. Kemp S, Mooyer PA, Bolhuis PA, van Geel BM, Mandel JL, Barth PG, Aubourg P & Wanders RJ.

- (1996). ALDP expression in fibroblasts of patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *J Inherit Metab Dis* **19**, 667-74.
- Kemp S, Ligtenberg MJ, van Geel BM, Barth PG, Wolterman RA, Schoute F, Sarde CO, Mandel JL, van Oost BA & Bolhuis PA. (1994). Identification of a two base pair deletion in five unrelated families with adrenoleukodystrophy: a possible hot spot for mutations. *Biochem Biophys Res Commun* **202**, 647-53.
- Kok F, Neumann S, Sarde CO, Zheng S, Wu KH, Wei HM, Bergin J, Watkins PA, Gould S, Sack G & et al. (1995). Mutational analysis of patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Hum Mutat* **6**, 104-15.
- Kopp P, Jaggi R, Tobler A, Borisch B, Oestreicher M, Sabacan L, Jameson JL & Fey MF. (1997). Clonal X-inactivation analysis of human tumours using the human androgen receptor gene (HUMARA) polymorphism: a non-radioactive and semiquantitative strategy applicable to fresh and archival tissue. *Mol Cell Probes* **11**, 217-28.
- Korenke GC, Krasemann E, Meier V, Beuche W, Hunneman DH & Hanefeld F. (1998). First missense mutation (W679R) in exon 10 of the adrenoleukodystrophy gene in sibs with adrenomyeloneuropathy. *Hum Mutat Suppl* **1**, S204-6.
- Krawczak M, Reiss J & Cooper DN. (1992). The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet* **90**, 41-54.
- Lachtermacher MB, Seuanez HN, Moser AB, Moser HW & Smith KD. (2000). Determination of 30 X-linked adrenoleukodystrophy mutations, including 15 not previously described. *Hum Mutat* **15**, 348-53.
- Ligtenberg MJ, Kemp S, Sarde CO, van Geel BM, Kleijer WJ, Barth PG, Mandel JL, van Oost BA & Bolhuis PA. (1995). Spectrum of mutations in the gene encoding the adrenoleukodystrophy protein. *Am J Hum Genet* **56**, 44-50.
- Liu LX, Janvier K, Berteaux-Lecellier V, Cartier N, Benarous R & Aubourg P. (1999). Homo- and heterodimerization of peroxisomal ATP-binding cassette half-transporters. *J Biol Chem* **274**, 32738-43.
- Lombard-Platet G, Savary S, Sarde CO, Mandel JL & Chimini G. (1996). A close relative of the adrenoleukodystrophy (ALD) gene codes for a peroxisomal protein with a specific expression pattern. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1265-9.
- Lu JF, Lawler AM, Watkins PA, Powers JM, Moser AB, Moser HW & Smith KD. (1997). A mouse model for X-linked adrenoleukodystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9366-71.
- Lyon MF. (1961). Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* **190**, 372-373.
- Maestri NE & Beaty TH. (1992). Predictions of a 2-locus model for disease heterogeneity: application to adrenoleukodystrophy. *Am J Med Genet* **44**, 576-82.
- Maier EM, Roscher AA, Kammerer S, Mehnert K, Conzelmann E & Holzinger A. (1999). Prenatal diagnosis of X-linked adrenoleukodystrophy combining biochemical, immunocytochemical and DNA analyses. *Prenat Diagn* **19**, 364-8.
- Migeon BR, Moser HW, Moser AB, Axelman J, Sillence D & Norum RA. (1981). Adrenoleukodystrophy: evidence for X linkage, inactivation, and selection favoring the mutant allele in heterozygous cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 5066-70.
- Miller SA, Dykes DD & Polesky HF. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* **16**, 1215.
- Mitterbauer G, Winkler K, Gisslinger H, Geissler K, Lechner K & Mannhalter C. (1999). Clonality analysis using X-chromosome inactivation at the human androgen receptor gene (Humara). Evaluation of large cohorts of patients with chronic myeloproliferative diseases, secondary neutrophilia, and reactive thrombocytosis. *Am J Clin Pathol* **112**, 93-100.
- Moser AB, Kreiter N, Bezman L, Lu S, Raymond GV, Naidu S & Moser HW. (1999). Plasma very long chain fatty acids in 3,000 peroxisome disease patients and 29,000 controls. *Ann Neurol* **45**, 100-10.
- Moser HW, Smith KD, Watkins PA, Powers J & Moser AB. (2001). X-linked Adrenoleukodystrophy. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, vol. II (ed. C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly and D. Valle), pp. 3257-3301. McGraw-Hill, New York.
- Moser HW, Smith KD & Moser AB. (1995). X-Linked Adrenoleukodystrophy. In *The Metabolic And Molecular Bases Of Inherited Disease*, vol. 2 (ed. C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly and D. Valle), pp. 2325-2349. McGraw-Hill, Inc., New York.
- Moser HW, Moser AB, Smith KD, Bergin A, Borel J, Shankroff J, Stine OC, Merette C, Ott J, Krivit W & et al. (1992). Adrenoleukodystrophy: phenotypic variability and implications for therapy. *J Inherit Metab Dis* **15**, 645-64.
- Moser HW, Moser AE, Trojak JE & Supplee SW. (1983). Identification of female carriers of adrenoleukodystrophy. *J Pediatr* **103**, 54-9.

- Moser HW, Moser AB, Frayer KK, Chen W, Schulman JD, O'Neill BP & Kishimoto Y. (1981). Adrenoleukodystrophy: increased plasma content of saturated very long chain fatty acids. *Neurology* **31**, 1241-9.
- Moser HW, Moser AB, Kawamura N, Murphy J, Suzuki K, Schaumburg H & Kishimoto Y. (1980). Adrenoleukodystrophy: elevated C26 fatty acid in cultured skin fibroblasts. *Ann Neurol* **7**, 542-9.
- Mosser J, Douar AM, Sarde CO, Kioschis P, Feil R, Moser H, Poustka AM, Mandel JL & Aubourg P. (1993). Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature* **361**, 726-30.
- Mutter GL & Boynton KA. (1995). PCR bias in amplification of androgen receptor alleles, a trinucleotide repeat marker used in clonality studies. *Nucleic Acids Res* **23**, 1411-8.
- Naumova AK, Plenge RM, Bird LM, Leppert M, Morgan K, Willard HF & Sapienza C. (1996). Heritability of X chromosome--inactivation phenotype in a large family. *Am J Hum Genet* **58**, 1111-9.
- Netik A, Forss-Petter S, Holzinger A, Molzer B, Unterrainer G & Berger J. (1999). Adrenoleukodystrophy-related protein can compensate functionally for adrenoleukodystrophy protein deficiency (X-ALD): implications for therapy. *Hum Mol Genet* **8**, 907-13.
- Orstavik KH, Orstavik RE, Naumova AK, D'Adamo P, Gedeon A, Bolhuis PA, Barth PG & Toniolo D. (1998). X chromosome inactivation in carriers of Barth syndrome. *Am J Hum Genet* **63**, 1457-63.
- Pai GS, Khan M, Barbosa E, Key LL, Craver JR, Cure JK, Betros R & Singh I. (2000). Lovastatin therapy for X-linked adrenoleukodystrophy: clinical and biochemical observations on 12 patients. *Mol Genet Metab* **69**, 312-22.
- Park JG & Chapman VM. (1994). CpG island promoter region methylation patterns of the inactive-X-chromosome hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene. *Mol Cell Biol* **14**, 7975-83.
- Parolini O, Ressmann G, Haas OA, Pawlowsky J, Gadner H, Knapp W & Holter W. (1998). X-linked Wiskott-Aldrich syndrome in a girl. *N Engl J Med* **338**, 291-5.
- Pegoraro E, Schimke RN, Arahata K, Hayashi Y, Stern H, Marks H, Glasberg MR, Carroll JE, Taber JW, Wessel HB & et al. (1994). Detection of new paternal dystrophin gene mutations in isolated cases of dystrophinopathy in females. *Am J Hum Genet* **54**, 989-1003.
- Pfeifer GP, Tanguay RL, Steigerwald SD & Riggs AD. (1990). In vivo footprint and methylation analysis by PCR-aided genomic sequencing: comparison of active and inactive X chromosomal DNA at the CpG island and promoter of human PGK-1. *Genes Dev* **4**, 1277-87.
- Plenge RM, Hendrich BD, Schwartz C, Arena JF, Naumova A, Sapienza C, Winter RM & Willard HF. (1997). A promoter mutation in the XIST gene in two unrelated families with skewed X-chromosome inactivation. *Nat Genet* **17**, 353-6.
- Poropat RA & Nicholson GA. (1998). Determination of gene dosage at the PMP22 and androgen receptor loci by quantitative PCR. *Clin Chem* **44**, 724-30.
- Powers JM, Moser HW, Moser AB, Ma CK, Elias SB & Norum RA. (1987). Pathologic findings in adrenoleukodystrophy heterozygotes. *Arch Pathol Lab Med* **111**, 151-3.
- Puck JM & Willard HF. (1998). X inactivation in females with X-linked disease. *N Engl J Med* **338**, 325-8.
- Puck JM, Stewart CC & Nussbaum RL. (1992). Maximum-likelihood analysis of human T-cell X chromosome inactivation patterns: normal women versus carriers of X-linked severe combined immunodeficiency. *Am J Hum Genet* **50**, 742-8.
- Puck JM, Nussbaum RL & Conley ME. (1987). Carrier detection in X-linked severe combined immunodeficiency based on patterns of X chromosome inactivation. *J Clin Invest* **79**, 1395-400.
- Racchi O, Mangerini R, Rapezzi D, Rolfo M, Gaetani GF & Ferraris AM. (1998). X chromosome inactivation patterns in normal females. *Blood Cells Mol Dis* **24**, 439-47.
- Restuccia D, Di Lazzaro V, Valeriani M, Oliviero A, Le Pera D, Colosimo C, Burdi N, Cappa M, Bertini E, Di Biase A & Tonali P. (1997). Neurophysiological abnormalities in adrenoleukodystrophy carriers. Evidence of different degrees of central nervous system involvement. *Brain* **120**, 1139-48.
- Sadeghi-Nejad A & Senior B. (1990). Adrenomyeloneuropathy presenting as Addison's disease in childhood. *N Engl J Med* **322**, 13-6.
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger F, Nicklen S & Coulson AR. (1977). DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Sarde CO, Mosser J, Kioschis P, Kretz C, Vicaire S, Aubourg P, Poustka A & Mandel JL. (1994). Genomic organization of the adrenoleukodystrophy gene. *Genomics* **22**, 13-20.

- Schmidt S, Traber F, Block W, Keller E, Pohl C, von Oertzen J, Schild H, Schlegel U & Klockgether T. (2001). Phenotype assignment in symptomatic female carriers of X-linked adrenoleukodystrophy. *J Neurol* **248**, 36-44.
- Shani N, Jimenez-Sanchez G, Steel G, Dean M & Valle D. (1997). Identification of a fourth half ABC transporter in the human peroxisomal membrane. *Hum Mol Genet* **6**, 1925-31.
- Shani N, Sapag A & Valle D. (1996). Characterization and analysis of conserved motifs in a peroxisomal ATP-binding cassette transporter. *J Biol Chem* **271**, 8725-30.
- Shapiro E, Krivit W, Lockman L, Jambaque I, Peters C, Cowan M, Harris R, Blanche S, Bordigoni P, Loes D, Ziegler R, Crittenden M, Ris D, Berg B, Cox C, Moser H, Fischer A & Aubourg P. (2000). Long-term effect of bone-marrow transplantation for childhood-onset cerebral X-linked adrenoleukodystrophy. *Lancet* **356**, 713-8.
- Singh I, Khan M, Key L & Pai S. (1998a). Lovastatin for X-linked adrenoleukodystrophy. *N Engl J Med* **339**, 702-3.
- Singh I, Pahan K & Khan M. (1998b). Lovastatin and sodium phenylacetate normalize the levels of very long chain fatty acids in skin fibroblasts of X- adrenoleukodystrophy. *FEBS Lett* **426**, 342-6.
- Smith KD, Kemp S, Braiterman LT, Lu JF, Wei HM, Geraghty M, Stetten G, Bergin JS, Pevsner J & Watkins PA. (1999). X-linked adrenoleukodystrophy: genes, mutations, and phenotypes. *Neurochem Res* **24**, 521-35.
- Stanislaus R, Pahan K, Singh AK & Singh I. (1999). Amelioration of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats by lovastatin. *Neurosci Lett* **269**, 71-4.
- Stöckler S, Millner M, Molzer B, Ebner F, Korner E & Moser HW. (1993). Multiple sclerosis-like syndrome in a woman heterozygous for adrenoleukodystrophy. *Eur Neurol* **33**, 390-2.
- Sumita DR, Vainzof M, Campiotto S, Cerqueira AM, Canovas M, Otto PA, Passos-Bueno MR & Zatz M. (1998). Absence of correlation between skewed X inactivation in blood and serum creatine-kinase levels in Duchenne/Becker female carriers. *Am J Med Genet* **80**, 356-61.
- Suzuki Y, Isogai K, Teramoto T, Tashita H, Shimozawa N, Nishimura M, Asano T, Oda M, Kamei A, Ishiguro H, Kato S, Ohashi T, Kobayashi H, Eto Y & Kondo N. (2000). Bone marrow transplantation for the treatment of X-linked adrenoleukodystrophy. *J Inherit Metab Dis* **23**, 453-8.
- Tommasi S, LeBon JM, Riggs AD & Singer-Sam J. (1993). Methylation analysis by genomic sequencing of 5' region of mouse Pcg-1 gene and a cautionary note concerning the method. *Somat Cell Mol Genet* **19**, 529-41.
- Tribioli C, Tamanini F, Patrosso C, Milanese L, Villa A, Pergolizzi R, Maestrini E, Rivella S, Bione S, Mancini M & et al. (1992). Methylation and sequence analysis around EagI sites: identification of 28 new CpG islands in XQ24-XQ28. *Nucleic Acids Res* **20**, 727-33.
- Van Geel BM, Assies J, Weverling GJ & Barth PG. (1994). Predominance of the adrenomyeloneuropathy phenotype of X-linked adrenoleukodystrophy in The Netherlands: a survey of 30 kindreds. *Neurology* **44**, 2343-6.
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Preisinger AC, Willard HF, Michelson AM, Riggs AD & Orkin SH. (1987). Clonal analysis using recombinant DNA probes from the X-chromosome. *Cancer Res* **47**, 4806-13.
- Vulliamy TJ, Knight SW, Dokal I & Mason PJ. (1997). Skewed X-inactivation in carriers of X-linked dyskeratosis congenita. *Blood* **90**, 2213-6.
- Wainscoat JS & Fey MF. (1990). Assessment of clonality in human tumors: a review. *Cancer Res* **50**, 1355-60.
- Wanders RJ, Mooyer PW, Dekker C & Vreken P. (1998). X-linked adrenoleukodystrophy: improved prenatal diagnosis using both biochemical and immunological methods. *J Inherit Metab Dis* **21**, 285-7.
- Watkins PA, Gould SJ, Smith MA, Braiterman LT, Wei HM, Kok F, Moser AB, Moser HW & Smith KD. (1995). Altered expression of ALDP in X-linked adrenoleukodystrophy. *Am J Hum Genet* **57**, 292-301.
- Watkiss E, Webb T & Bunday S. (1993). Is skewed X inactivation responsible for symptoms in female carriers for adrenoleukodystrophy? *J Med Genet* **30**, 651-4.
- Webb T & Watkiss EA. (1996). A comparative study of X-inactivation in Rett syndrome probands and control subjects. *Clinic Genet* **49**, 189-95
- Wengler GS, Parolini O, Fiorini M, Mella P, Smith H, Ugazio AG & Notarangelo LD. (1997). A PCR-based non-radioactive X-chromosome inactivation assay for genetic counseling in X-linked primary immunodeficiencies. *Life Sci* **61**, 1405-11.
- Yoshioka M, Yorifuji T & Mituyoshi I. (1998). Skewed X inactivation in manifesting carriers of Duchenne muscular dystrophy. *Clin Genet* **53**, 102-7.

DANKSAGUNG

Vor allem möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Professor A. A. Roscher bedanken. Er brachte mir das Vertrauen für die Bearbeitung dieser komplexen Thematik entgegen und vermittelte mir geduldig die Grundlagen wissenschaftlichen Arbeitens. Es ist nahezu unmöglich, sich seiner Begeisterungsfähigkeit für wissenschaftliche Fragestellungen zu entziehen.

Ganz besonderer Dank gilt Dr. Dr. Andreas Braun, der dieses Projekt anregte und mir auch nach seinem Weggang in die USA immer wieder mit Rat und Tat zur Seite stand. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei Dr. Stefan Kammerer bedanken, der meine Arbeit sehr kompetent weiterbetreute, bevor er Andreas Braun nach San Diego folgte.

Allen Kollegen des Molekularbiologischen Labors im Dr. von Haunerschen Kinderspital möchte ich für ihre Hilfe und Freundschaft danken: Alfred Heger, Nils Krone, Peter Mayerhofer und Wulf Röschinger, die mit viel Geduld und konstruktiven Ratschlägen mein destruktives Verhältnis zu Computern zu durchbrechen versuchten. Und Ania Muntau, die nicht nur meine Oberärztin, sondern auch meine Freundin wurde. Auch allen Mit-Doktoranden sei an dieser Stelle gedankt. Trotz unvermeidlicher Durststrecken habe ich dank Euch allen meine Zeit immer gerne im Labor verbracht.

Für ihre tatkräftige praktische Unterstützung geht ein großes Dankeschön an Andrea Vielhauer für die unermüdliche Messung überlangkettiger Fettsäuren in allerlei Körperflüssigkeiten, Heide Hinz für unzählige Fragmentgele und Dr. Soheyla Charokh-Zadeh für die Durchführung der Southern Blot-Analysen.

Und schließlich gilt mein Dank meiner Familie und meinen Freunden, die mich während der vergangenen Jahre begleitet und nach Kräften unterstützt haben. Vor allem meiner Freundin Sabine Forsyth (der besten von allen) für ihre beständige Freundschaft und Zuneigung. Bei meinen Eltern möchte ich mich neben allem anderen besonders für eines bedanken: meinen heißgeliebten und unerschütterlichen Bruder. Manuel Maier.

LEBENS LAUF

Name: Esther Maria Maier
Geburtsdatum: 02.06.1970 in Garmisch-Partenkirchen
Adresse: Schlotthauerstr. 10 a, 81541 München
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulische Ausbildung: 1976 - 1980 Grundschule Mittenwald
1980 - 1989 St. Irmengard-Gymnasium
in Garmisch-Partenkirchen

Schulabschluß: Allgemeine Hochschulreife am 24.06.1989

Berufsausbildung: Sept. 90 bis Aug. 92: Berufsfachschule für
medizinisch-technische Laboratoriumsassistentinnen
am Max von Pettenkofer-Institut der LMU München

Abschluß: Staatsexamen für MTLA am 04.08.92

Studium: Humanmedizin an der LMU München (ab Sommersemester 93)
Ärztliche Vorprüfung am 31.03.95
Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 15.04.96
Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 22.03.99
Praktisches Jahr (26.04.99 – 26.03.00) in den Fächern:
Innere Medizin, Pädiatrie und Chirurgie
Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 04.05.00

Tätigkeiten: BIORAD Laboratories München (Okt. 92 - April 93):
MTLA-Tätigkeit
Dr. v. Haunersches Kinderspital der Universität München,
Abteilung Klinische Biochemie und Molekularbiologie
(Aug. 94 – Mai 00): MTLA-Tätigkeit
Dr. v. Haunersches Kinderspital der Universität München:
Seit 01.08.00: Ärztin im Praktikum (bis 31.01.02)

PUBLIKATIONSLISTE

Veröffentlichungen zum Thema der Dissertation

Maier EM, Kammerer S, Muntau AC, Wichers M, Braun A, Roscher AA.

Neurological Symptoms in Female Carriers of X-linked Adrenoleukodystrophy are Related to Skewing of X inactivation.

Zur Publikation eingereicht bei Annals of Neurology.

Maier EM, Roscher AA, Kammerer S, Mehnert K, Conzelmann E, Holzinger A.

Prenatal diagnosis of X-linked Adrenoleukodystrophy combining biochemical, immunocytochemical and DNA analysis. Prenatal Diagnosis. 1999, 19: 364 – 368

Holzinger A, Maier E, Stöckler-Ipsiroglu S, Braun A, Roscher AA.

Characterization of a novel mutation in exon 10 of the adrenoleukodystrophy gene.

Clinical Genetics. 1998, 53: 482 - 487

Weitere Veröffentlichungen

Holzinger A, Maier EM, Bück C, Mayerhofer PU, Haworth JC, Moroz S, Hadorn HB, Sadler JE, Roscher AA. Mutations in the proenteropeptidase gene are the molecular cause of congenital enteropeptidase deficiency.

American Journal of Human Genetics. 2002, 70(1):20 – 25.

Von Ehrenstein OS, von Mutius E, Maier E, Hirsch T, Schaal W, Carr D, Roscher AA, Olgemöller B, Nicolai T, Weiland SK. Lung function of school children with low levels of alpha₁-antitrypsin and tobacco smoke exposure. European Respiratory Journal. 2002; in Druck

Braun A, Maier E, Kammerer S, Müller B, Roscher AA.

A novel sequence polymorphism in the promoter region of the human B2-bradykinin receptor gene. Human Genetics. 1996; 97: 688-689

Braun A, Kammerer S, Maier E, Böhme E, Roscher AA.

Polymorphism in the gene for the human B2-bradykinin receptor. New tools in assessing a genetic risk for bradykinin-associated diseases. Immunopharmacology. 1996; 33: 32-35

Zitierfähige Abstracts

Maier EM, Kammerer S, Muntau AC, Roscher AA.

Female Carriers of adrenoleukodystrophy show skewed patterns of X inactivation but no favourisation of the mutant allele. Journal of Inherited Metabolic Disease. 2000; 23: 255 (Suppl.1)

- Maier EM, Leitner C, Löhrs U, Kuhnle U. True Hermaphroditism due to a Familial Point Mutation of the SRX Gene in an Extended Family. *Hormone Research*. 2000; 53: 87 (Suppl. 2)
- Holzinger A, Maier EM, Bück C, Mayerhofer PU, Haworth JC, Moroz S, Sadler JE, Roscher AA, Hadorn HB. Mutations in the proenteropeptidase gene are the primary cause of congenital enteropeptidase deficiency. *European Journal of Pediatrics*. 2001; 160: R24 (Suppl. 3)
- Holzinger A, Maier EM, Bück C, Mayerhofer PU, Haworth JC, Moroz S, Sadler JE, Roscher AA, Hadorn HB. Identification of mutations in the enteropeptidase gene in congenital enteropeptidase deficiency. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2000; 31: S128 (Suppl. 2)
- Nohe N, Auberger K, Maier E. The Prothrombin 20210 G-> A Mutation in Children with Thrombosis. *Annals of Hematology* 1998; 76: A36 (Suppl. 1)
- Brandau O, Seidel J, Maier E, Brodherr-Heberlein S, Meitinger T, Döhlemann C. SSCP analysis of KVLQT1 and HERG in 17 patients with long QT syndrome (LQTS). *Pacing and Clinical Electrophysiology*. 1997; 20, No. 8, Part II, p. 2133