

Molekulargenetische Charakterisierung von Patienten mit dem MLS-Syndrom: Identifizierung des ursächlichen Krankheitsgens

KUMULATIVE DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
„**Doktor der Naturwissenschaften**“


des Departments Biologie der Fakultät für
Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg

vorgelegt von
Isabella Wimplinger
aus Erlangen

Hamburg 2007

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Frau Professor Dr. K. KUTSCHE
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. A. RODEWALD
Tag der Disputation: 09. November 2007

Hamburg, den 18. Oktober 2007



Professor Dr. Reinhard Lieberei
Leiter des Departments Biologie

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG.....	1
EINLEITUNG.....	3
FORSCHUNGSBERICHT	9
Mutations of the mitochondrial holocytochrome <i>c</i> -type synthase in X-linked dominant microphthalmia with linear skin defects syndrome (2006) <i>American Journal of Human Genetics</i> 79: 878-889.	9
Mother and daughter with a terminal Xp deletion: Implication of chromosomal mosaicism and X-inactivation in the high clinical variability of the microphthalmia with linear skin defects (MLS) syndrome (2007) <i>European Journal of Medical Genetics</i> , im Druck	26
<i>HCCS</i> loss-of-function missense mutation in a female with bilateral microphthalmia and sclerocornea: a novel gene for severe ocular malformations? (2007) <i>Molecular Vision</i> 13: 1475-82	35
LITERATURVERZEICHNIS.....	43
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	52
DANKSAGUNG.....	53
ANHANG: Publikationen.....	54

ZUSAMMENFASSUNG

Das MIDAS (Mikrophthalmie, dermale Aplasia und Sklerocornea) - Syndrom oder MLS („microphthalmia with linear skin defects“) - Syndrom ist durch eine Symptomtrias bestehend aus uni- bzw. bilateraler Mikrophthalmie, Sklerocornea und linearen erythematösen Hautdefekten im Gesichts- und Halsbereich gekennzeichnet. Diese seltene, X-chromosomal dominant vererbte Erkrankung ist für männliche Feten *in utero* letal und weist eine hohe phänotypische Variabilität auf. Obwohl für einige wenige Patientinnen mit MLS ein unauffälliger weiblicher Karyotyp beschrieben wurde, zeigt die Mehrzahl der Patientinnen ein zytogenetisch nachweisbares chromosomales Rearrangement, das meistens mit einer terminalen Deletion des p-Arms eines der beiden X-Chromosomen einhergeht. In der für das MLS-Syndrom kritischen Region in Xp22.2 sind die drei Gene *MID1*, *HCCS* und *ARHGAP6* bekannt, wobei vor Beginn dieser Arbeit in keinem dieser Gene Punktmutationen oder kleinere Rearrangements bei Patienten mit MLS-Syndrom identifiziert werden konnten.

Bei zwei Schwestern mit MLS-Syndrom und ihrer asymptotischen Mutter wurde von einer mit uns kooperierenden Arbeitsgruppe eine Mikrodeletion in Xp22.2 identifiziert, die Teile des *HCCS*-Gens umfasst. Ausgehend von diesem Befund wurde eine *HCCS*-Mutationsanalyse bei zwei sporadischen Patientinnen mit MLS-Syndrom und unauffälligem Karyotyp durchgeführt, die jeweils eine heterozygot vorliegende *de novo* Punktmutation, c.589C>T/p.R197X bzw. c.649C>T/p.R217C, ergab. Beide Mutationen wurden bei weiblichen Kontrollpersonen nicht nachgewiesen. *HCCS* kodiert für die mitochondriale Holocytochrom c-Typ-Synthese, die die kovalente Bindung zwischen der prosthetischen Hämgruppe und dem Apocytochrom *c* katalysiert, wodurch die reife Form des Cytochrom *c* (Holocytochrom *c*) entsteht. Holocytochrom *c* ist sowohl für die oxidative Phosphorylierung im Rahmen der Atmungskette als auch für die apoptotische Form des Zellsterbens essentiell. Mithilfe eines Hefekomplementations-Assays wurde der Einfluss der jeweiligen Mutation auf die Funktion des *HCCS*-Proteins untersucht. Dazu wurde ein *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm verwendet, dessen Atmungskettenfunktion aufgrund einer Deletion im *HCCS*-Ortholog (*CYC3*) gestört ist. Im Gegensatz zum *HCCS*-Wildtyp-Protein konnte keines der beiden mutierten humanen *HCCS*-Proteine den Enzymdefekt des Hefestamms aufheben. Um zu prüfen, ob der Funktionsverlust der mutanten Proteine auf eine veränderte subzelluläre Lokalisation zurückzuführen ist, wurden mit einem HA-Epitop versehene *HCCS*-Fusionsproteine in CHO-K1-Zellen exprimiert und ihre intrazelluläre Verteilung analysiert. Während das *HCCS*-Wildtyp-Protein und das Protein mit der p.R217C-Mutation eine Lokalisation in den Mitochondrien zeigte, wies das aus der p.R197X-Mutation resultierende, COOH-terminal trunkeerte *HCCS*-Δ197-268-Protein eine diffuse zytoplasmatische und nukleäre Verteilung in der Zelle auf.

Das Endprodukt der enzymatischen Reaktion der Holocytochrom *c*-Typ-Synthese, Holocytochrom *c*, ist, wie oben erwähnt, an der oxidativen Phosphorylierung und der Apoptose beteiligt. Darüber hinaus konnte für das *HCCS*-Protein selbst eine pro-apoptotische Wirkung

gezeigt werden. Es ist daher anzunehmen, dass Zellen mit einer funktionellen Nullisomie für *HCCS* neben einem schweren Atmungskettendefekt auch Störungen apoptotischer Prozesse aufweisen können. Dies könnte alternative Wege des Zelltods (z.B. Nekrose) begünstigen. Wir stellten daher die Hypothese auf, dass in *HCCS*-defizienten Zellen das Gleichgewicht von Apoptose zu Nekrose verschoben sein könnte, wodurch eine Schädigung der betroffenen Gewebe durch inflammatorische Prozesse resultieren könnte. Somit ist denkbar, dass der komplexe Phänotyp der Patientinnen mit MLS-Syndrom nicht nur auf einer Beeinträchtigung der Atmungskettenfunktion der *HCCS*-defizienten Zellen, sondern auch auf veränderten Zelltodmechanismen während der Embryonalentwicklung beruht.

Die große phänotypische Variabilität bei Patientinnen mit MLS-Syndrom ist bemerkenswert und bis heute nicht verstanden. Wir haben eine kleine Patientin mit klassischen Zeichen des MLS-Syndroms sowie ihre phänotypisch unauffällige Mutter näher untersucht. Die molekularzytogenetische Analyse ergab, dass die Tochter in allen 100 untersuchten Metaphasen der kultivierten Lymphozyten auf einem ihrer beiden X-Chromosomen eine terminale Deletion trägt [46,X,del(X)(p22.2)], die das *HCCS*-Gen einschließt. Demgegenüber wurde die gleiche X-chromosomale Deletion bei der Mutter in 89 von 100 Metaphasen nachgewiesen, während in 11 Metaphasen der Karyotyp 45,X festgestellt wurde. Eine Haplotyp-Analyse ergab, dass sich die Deletion auf dem paternalen X-Chromosom der Mutter ereignet hat. Für beide Frauen konnte ein komplett verschobenes X-Inaktivierungsmuster in den Blutzellen nachgewiesen werden, wobei das die Deletion aufweisende X-Chromosom stets inaktiviert vorlag. Es wurde von uns die Vermutung aufgestellt, dass das Fehlen von MLS-spezifischen Zeichen bei der Mutter sowohl auf ein günstiges X-Inaktivierungsmuster in den verschiedenen Geweben während der frühen Embryonalentwicklung als auch auf das Vorliegen des o.g. chromosomalen Mosaiks zurückzuführen sein könnte.

Die große phänotypische Variabilität beim MLS-Syndrom gab uns auch Anlass zu der Vermutung, dass Mutationen im *HCCS*-Gen möglicherweise bei Patienten mit isolierten Augenfehlbildungen vorkommen können. Deshalb wurde bei 27 weiblichen Neugeborenen mit einer isolierten bzw. syndromalen Form der Mikrophthalmie/Anophthalmie eine Mutationsanalyse im *HCCS*-Gen durchgeführt und bei einer Patientin mit bilateraler Mikrophthalmie und Sklerocornea die heterozygot vorliegende Missense-Mutation c.475G>A/p.E159K identifiziert. Diese wurde bei 234 weiblichen Kontrollpersonen nicht detektiert. Funktionelle Analysen ergaben eine regelrechte mitochondriale Lokalisation des *HCCS*-E159K-Proteins, jedoch konnte es die gestörte Atmungskettenfunktion des *CYC3*-defizienten Hefestamms nicht komplementieren. Die Identifizierung einer sehr wahrscheinlich pathogenen Mutation bei einem Mädchen mit isoliert vorliegenden okulären Fehlbildungen deutet darauf hin, dass es sich bei *HCCS* um ein Kandidatengen für schwere isolierte Entwicklungsstörungen der Augen handeln könnte.

EINLEITUNG

Beim MIDAS-Syndrom handelt es sich um eine seltene, X-chromosomal dominant vererbte neurokutane Entwicklungsstörung, die bei männlichen Individuen zur Letalität *in utero* führt. Das Syndrom ist durch die Symptomtrias Mikrophthalmie, Dermalaplasie und Sklerocornea charakterisiert. In der internationalen Fachliteratur wird es fast ausschließlich als MLS („microphthalmia with linear skin defects“) - Syndrom bezeichnet, weshalb im Folgenden diese Bezeichnung verwendet wird.

Das MLS-Syndrom weist eine hohe inter- und intrafamiliäre phänotypische Variabilität auf. Neben dem klassischen Phänotyp mit linearen erythematösen Hautdefekten entlang der Blaschko-Linien im Gesichts- und Halsbereich, uni- oder bilateraler Mikrophthalmie und cornealen Trübungen werden verschiedene fakultative Symptome beobachtet. Dazu gehören eine Agenesie des Corpus callosum, Katarakte, Krampfanfälle, Kardiomyopathien, Analfehlbildungen, Zwerchfellhernien und mentale Retardierung (Van den Veyver 2002). Die klinische Diagnose des MLS-Syndroms wird zum Teil dadurch erschwert, dass klassische Merkmale, z.B. die Mikrophthalmie und/oder die Dermalaplasie, bei einzelnen Patientinnen nicht beobachtet werden. In der Vergangenheit wurde wiederholt die Hypothese aufgestellt, dass die Schwere des MLS-Phänotyps durch das individuelle X-Inaktivierungsmuster in den betroffenen Geweben beeinflusst wird (Lindsay et al. 1994, Franco und Ballabio 2006).

Konventionelle und molekularzytogenetische Untersuchungen hatten gezeigt, dass die Mehrzahl der Patienten mit MLS-Syndrom bei vorliegendem XX-Komplement ein chromosomales Rearrangement aufweist, welches zu einer partiellen Monosomie in der Region Xp22.2 führt (Al-Gazali et al. 1990, Temple et al. 1990, Allanson und Richter 1991, Lindsay et al. 1994, Mücke et al. 1995, Ogata et al. 1998, Stratton et al. 1998, Kayserili et al. 2001, Anguiano et al. 2003). Bei diesen Chromosomenaberrationen handelt es sich in den meisten Fällen um terminale Xp-Deletionen oder unbalancierte X;Y-Translokationen. Letztere wurden sowohl bei phänotypisch weiblichen als auch männlichen Individuen identifiziert (Al-Gazali et al. 1988, Mücke et al. 1995, Paulger et al. 1997, Stratton et al. 1998, Anguiano et al. 2003).

Größere Deletionen, die den Verlust mehrerer benachbarter Gene zur Folge haben, können zu einem so genannten Contiguous-gene-Syndrom führen. Da jedoch bei den untersuchten Patientinnen mit MLS die Deletionsgröße nicht mit der Schwere des Phänotyps korreliert und auch Patientinnen mit einem unauffälligen weiblichen Karyotyp beschrieben worden waren (Happle et al. 1993, Bird et al. 1994, Zvulunov et al. 1998, Kherbaoui-Redouani et al. 2003, Morleo et al. 2005), wurde vermutet, dass auch submikroskopische Rearrangements oder Punktmutationen in einem einzigen, zu dieser Zeit noch unbekanntem Gen ursächlich für den MLS-Phänotyp sein könnten (Bird et al. 1994, Schaefer et al. 1996).

Das MLS-Syndrom weist phänotypische Überlappungen mit den ebenfalls X-chromosomal dominant vererbten Erkrankungen Aicardi- und Goltz-Gorlin-Syndrom auf. So wird bei allen drei Erkrankungen u.a. eine gestörte Entwicklung der Augen und des ZNS beobachtet. In der Fachliteratur war wiederholt spekuliert worden, dass es sich um allelische Erkrankungen handeln könnte, die auf unterschiedliche Mutationen innerhalb desselben Gens zurückzuführen sind (Ballabio 1995), oder dass diese Syndrome sich jeweils im Sinne eines Contiguous-gene-Syndroms manifestieren. Dabei wurde vermutet, dass das Fehlen einer unterschiedlichen Anzahl benachbarter Gene aus der Region Xp22.2 zu einer spezifischen klinischen Manifestation des Krankheitsphänotyps führt (Spranger et al. 1998). Lindsay und Kollegen (1994) postulierten ebenfalls, dass die genannten drei Syndrome auf dem Defekt desselben Gens bzw. derselben Gene beruhen und dass die phänotypischen Unterschiede durch die X-Inaktivierung bedingt sein könnten.

Wie bei einigen anderen X-chromosomal dominanten Erkrankungen, beispielsweise der Incontinentia pigmenti und dem OFCD (okulären-fazialen-kardialen-dentalen) – Syndrom, findet man auch in den peripheren Blutzellen der von MLS betroffenen Patientinnen typischerweise ein einseitiges X-Inaktivierungsmuster (Franco und Ballabio 2006). Zu Beginn dieser Arbeit war das X-Inaktivierungsmuster in peripheren Leukozyten von zehn Patienten mit MLS-Syndrom und einem X-chromosomalen Rearrangement untersucht worden, wobei neun der Patienten ein einseitiges X-Inaktivierungsmuster aufwiesen. In allen Fällen handelte es sich bei dem inaktivierten X-Chromosom stets um das Rearrangierte (Ogata et al. 1998 und darin zitierte Referenzen, Anguiano et al. 2003). Besteht bei einer Patientin der Verdacht auf ein MLS-Syndrom, kann die Bestimmung des X-Inaktivierungsmusters in peripheren Blutzellen differentialdiagnostisch hilfreich sein, da z.B. bei den Patientinnen mit Aicardi-Syndrom meist ein zufälliges X-Inaktivierungsmuster beobachtet wird (Hoag et al. 1997). In der Vergangenheit war wiederholt postuliert worden, dass bei Frauen mit MLS und einem heterozygoten genetischen Defekt die Zellen, in denen das normale Allel exprimiert wird, gegenüber jenen, die das mutierte Allel exprimieren, einen Selektionsvorteil aufweisen (Lindsay et al. 1994, Franco und Ballabio 2006).

Um die mit dem MLS-Syndrom assoziierte chromosomale Region zu definieren, wurden in der Vergangenheit Deletions- und Translokationsbruchpunkte auf dem distalen kurzen Arm des X-Chromosoms kartiert (Wapenaar et al. 1993, Wapenaar et al. 1994). Dabei handelte es sich sowohl um Bruchpunkte, die bei Patienten mit MLS-Phänotyp als auch um solche, die bei Patienten ohne MLS-Syndrom gefunden worden waren. Dies führte letztlich zur Eingrenzung einer Region von etwa 570 Kb in Xp22.2 (Wapenaar et al. 1994). Diese kritische Region für MLS, in der die drei Gene *MID1*, *HCCS* und *ARHGAP6* liegen, ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

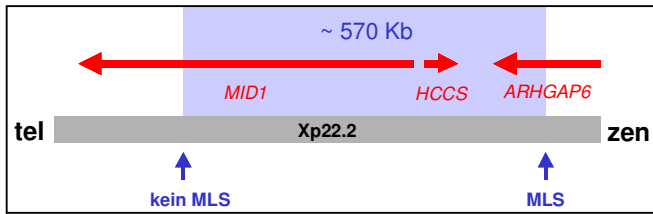


Abb. 1: Schematische Darstellung der minimalen kritischen Region für MLS in Xp22.2

Durch den grauen fett markierten Balken ist ein Ausschnitt aus der physikalischen Karte der Region Xp22.2 dargestellt. Die Orientierung von Telomer (tel) nach Zentromer (zen) ist angegeben. Die drei in der kritischen Region lokalisierten Gene sind durch rote Pfeile dargestellt, die bezeichnet sind. Dabei gibt die Pfeilspitze die Orientierung der Gene in 5'→3'-Richtung an. Die minimale kritische

Region für MLS ist als hellblaue Fläche dargestellt, die Größe der Region ist angegeben. Die Grenzen der kritischen Region sind durch blaue Pfeile markiert und geben die Lokalisation der Bruchpunkte an, welche zur Eingrenzung der Region geführt haben. Dabei wird die Region distal durch den Bruchpunkt eines Patienten mit X;Y-Translokation begrenzt, der keinen MLS-Phänotyp zeigt. Proximal wird die Region durch den Bruchpunkt einer Patientin mit MLS begrenzt, die die kleinste Xp-Deletion aufweist, die bisher bei Patienten mit MLS identifiziert wurde.

Das *MID1*-Gen kodiert für das MID1-Protein, das zur Familie der RING (Really Interesting New Gene)-Finger-Proteine gehört. Es handelt sich dabei um ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein (MAP) mit E3-Ubiquitinligase-Aktivität (Quaderi et al. 1997). Mutationen im *MID1*-Gen sind mit dem Opitz-G/BBB-Syndrom assoziiert (Quaderi et al. 1997). Dieses ist durch congenitale Fehlbildungen der ventralen Mittellinie, die sich u.a. in Hypertelorismus, Gaumenspalte, Herzfehlern und Hypospadie äußern, charakterisiert (De Falco et al. 2003).

HCCS ist das einzige der drei Gene, das vollständig in der kritischen Region liegt. Es kodiert für eine mitochondriale Holo-cytochrom *c*-Typ-Synthase, eine Hämlyase, die für die Cytochrom *c*-Biosynthese an der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran verantwortlich ist (Schaefer et al. 1996, Schwarz und Cox 2002). Dabei katalysiert HCCS zwischen dem inaktiven Vorläufer des Cytochrom *c*, Apocytochrom *c* bzw. *c*₁, und einer prosthetischen Hämgruppe die Ausbildung einer kovalenten Bindung. Aus dieser Reaktion entsteht die reife Form, das Holo-cytochrom *c* bzw. *c*₁. Der Vorgang der Cytochrom *c*-Biosynthese ist in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt.

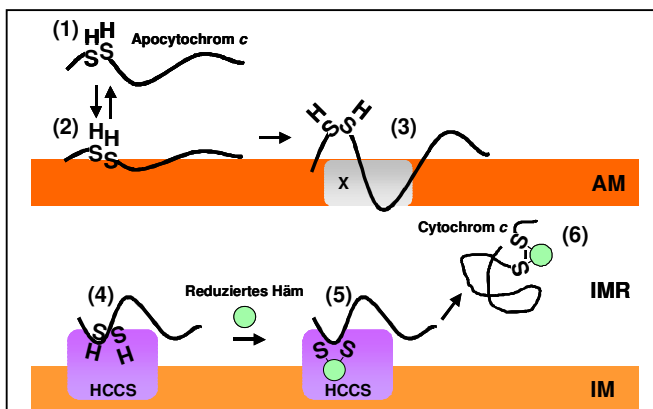


Abb. 2: Schematische Darstellung der Cytochrom *c*-Biosynthese an der inneren Mitochondrienmembran

(1) Das inaktive Apocytochrom *c* wird im Zytoplasma synthetisiert und (2) assoziiert zunächst über elektrostatische Anziehungskräfte mit der äußeren Mitochondrienmembran. (3) Danach erfolgt eine spezifische Interaktion mit einer Protease-resistenten Komponente. (4) Nach Diffusion durch den Intermembranraum bindet das Apoprotein hochaffin an die Holo-cytochrom *c*-Typ-Synthase, welche an der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran gebunden ist. (5) Häm *c*, ein Porphyrin-Ringsystem mit einem eingebetteten Eisenatom, wird aus Häm *b* im Intermembranraum synthetisiert. Das reduzierte Häm bindet direkt an HCCS, welches die Bildung von zwei Thioetherbrücken zwischen zwei Cysteinyln-Resten des

Apocytochroms und den Vinylgruppen der Hämgruppe katalysiert. (6) Die Bindung des Apocytochroms an Häm *c* bewirkt die Faltung zum aktiven (Holo)-Cytochrom *c* und führt zur Loslösung von HCCS. AM, äußere Membran der Mitochondrien; IM, innere Membran der Mitochondrien; IMR, Intermembranraum; HCCS, Holo-cytochrom *c*-Typ-Synthase; SH, Thiolgruppen der beiden Cysteinyln-Reste des Apocytochrom *c*; X, Protease-resistente Komponente (Abbildung modifiziert nach Mayer et al. 1995).

Das Endprodukt Cytochrom *c* bzw. *c*₁ ist an zwei unterschiedlichen zellulären Prozessen, der oxidativen Phosphorylierung (Hatefi 1985) und dem Caspase-abhängigen Zelltod (Apoptose), beteiligt (Jiang und Wang 2004).

ARHGAP6 kodiert für ein Rho GTPase-aktivierendes Protein (Rho GAP). Dieses Protein aktiviert die kleine GTPase RhoA, die an der Reorganisation des Aktinzytoskeletts beteiligt ist (Schaefer et al. 1997).

Zu Beginn dieser Arbeit waren in den Genen *HCCS* und *ARHGAP6* keine pathogenen Mutationen beim Menschen bekannt. Um die Pathogenese des MLS-Syndroms aufzuklären und um das ursächliche Gen für MLS zu finden, waren in der Vergangenheit Knockout-Mäuse für die Gene *HCCS* und *ARHGAP6* hergestellt worden. Demnach führen Mutationen im *Arhgap6*-Gen bei der Maus weder zu phänotypischen noch zu verhaltensbiologischen Auffälligkeiten, womit eine Beteiligung dieses Gens am MLS-Syndrom unwahrscheinlich erschien (Prakash et al. 2000). Eine Deletion des gesamten *Hccs*-Gens sowie von angrenzenden Bereichen des *Mid1*- und *Arhgap6*-Gens in der Maus führte dagegen zu einem frühzeitigen Absterben hemi-, homo- und heterozygoter Embryonen (Prakash et al. 2002). Der Versuch, in männlichen embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) einen direkten Knockout des *HCCS*-Gens zu erzeugen, scheiterte, da die so manipulierten *Hccs*-nullisomen ES-Zellen bereits in Kultur abstarben. Daher konnte die Deletion des *Hccs*-Gens in Mäusen nur durch eine experimentelle Strategie erzeugt werden, die LoxP-Rekombinationspunkte und Cre-Rekombinase verwendete. Nur insgesamt vier heterozygote weibliche Tiere mit der so erzeugten *Hccs*-Deletion kamen lebend zur Welt. Der Phänotyp war variabel und eines der Tiere wies verkleinerte Augen auf (Prakash et al. 2002, Van den Veyver 2002). Diese Beobachtungen korrelieren mit der Seltenheit und der phänotypischen Variabilität des MLS-Syndroms. Bemerkenswerterweise konnte die Letalität bei hemi-, homo- und heterozygoten Tieren durch die Überexpression des humanen *HCCS*-Gens von einem BAC-Klon aufgehoben werden (Prakash et al. 2002). Diese Ergebnisse deuteten stark darauf hin, dass die männliche Letalität beim MLS-Syndrom auf den Verlust des *HCCS*-Gens zurückzuführen sein könnte (Prakash et al. 2002).

Um das für MLS ursächliche Gen zu identifizieren, wurden Patientinnen mit MLS-Phänotyp und offensichtlich unauffälligem Karyotyp in den letzten Jahren gezielt molekulargenetisch untersucht. So wurde die DNA von zwei Patientinnen mithilfe polymorpher Mikrosatellitenmarker aus der Region Xp22.2 untersucht, jedoch war kein Verlust der Heterozygotie nachzuweisen, der eine submikroskopische Deletion in dieser Region hätte vermuten lassen können (Cox et al. 1998). Nachfolgend wurde der unauffällige zytogenetische Befund einer der Patientinnen, die zuvor von Cox und Kollegen (1998) untersucht worden war, und der von drei weiteren Patientinnen mittels serieller FISH-Analysen mit genomischen Klonen aus der MLS-kritischen Region sowie mit einer

genomweiten Array-CGH („comparative genomic hybridization“) - Analyse von Morleo und Kollegen (2005) bestätigt. Um submikroskopische Rearrangements zu identifizieren, waren zudem Southern-Blot-Analysen mit Sonden aus der Kodierregion von *HCCS* und *ARHGAP6* durchgeführt worden. Es konnten keine aberranten Banden detektiert werden. Auch die Mutationsanalyse in den Genen *MID1*, *HCCS* und *ARHGAP6* ergab für keine der vier Patientinnen eine pathogene Mutation (Morleo et al. 2005). Somit war zu Beginn dieser Arbeit unklar, ob eines der drei Gene aus der kritischen MLS-Region, oder aber ein völlig anderes das ursächliche Krankheitsgen für dieses Syndrom ist.

Vorbemerkungen

In den nachfolgenden Forschungsberichten werden Experimente und Ergebnisse, die von mir durchgeführt bzw. generiert wurden, in der **Ich-Form** beschrieben, während für solche Daten, die von anderen erzielt wurden, die **indirekte Rede** verwendet wird.

FORSCHUNGSBERICHT

1. Isabella Wimplinger, Manuela Morleo, Georg Rosenberger, Daniela Iaconis, Ulrike Orth, Peter Meinecke, Israella Lerer, Andrea Ballabio, Andreas Gal, Brunella Franco & Kerstin Kutsche

Mutations of the mitochondrial holocytochrome c-type synthase in X-linked dominant microphthalmia with linear skin defects syndrome (2006)

American Journal of Human Genetics 79: 878-889.

Das MLS („microphthalmia with linear skin defects“) - Syndrom ist eine seltene, X-chromosomal dominant vererbte Erkrankung, die in den meisten Fällen mit einer partiellen Aneuploidie für die Region Xp22.2 einhergeht. In dieser Arbeit werden erstmalig heterozygote Mutationen im *HCCS*-Gen, das für die mitochondriale Holocytochrom c-Typ-Synthase kodiert, bei Patientinnen mit MLS-Syndrom und unauffälligem Karyotyp beschrieben. So wurde eine 8,6 Kb große, u.a. die 5'-Region des *HCCS*-Gens umfassende Mikrodeletion bei zwei Schwestern mit MLS-Syndrom und sehr variablem Phänotyp sowie bei ihrer asymptomatischen Mutter gefunden. Außerdem konnte bei zwei sporadischen Patientinnen mit MLS-Syndrom und unauffälligem Karyotyp eine jeweils heterozygot vorliegende *de novo* Punktmutation (c.649C>T/p.R217C bzw. c.589C>T/p.R197X) in *HCCS* detektiert werden. Sowohl die Missense- als auch die Nonsense-Mutation konnte bei weiblichen Kontrollpersonen nicht nachgewiesen werden. Bei alle Patientinnen mit einer Mutation in *HCCS* wurde ein verschobenes X-Inaktivierungsmuster in peripheren Blutzellen nachgewiesen.

Die molekulargenetischen Daten wurden durch funktionelle Studien unterstützt. Zum einen wurde ein Hefekomplementations-Assay durchgeführt, mit dessen Hilfe der Einfluss der Punktmutationen auf die Integrität bzw. Funktion des HCCS-Proteins während der oxidativen Phosphorylierung (Atmungskette) getestet wurde. Es zeigte sich, dass die beiden überexprimierten, mutierten Proteine (R217C und COOH-terminal trunkiertes HCCS-Δ197-268) im Gegensatz zu HCCS-Wildtyp den für das HCCS-Ortholog Cyc3p-defizienten *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm nicht komplementierten. Um zu analysieren, ob der Verlust der Komplementationsfähigkeit der beiden mutanten HCCS-Proteine durch eine veränderte subzelluläre Lokalisation zu erklären ist, wurden Immunfluoreszenz-Experimente durchgeführt. Hierzu wurden die verschiedenen, mit einem HA-Epitop versehenen HCCS-Proteine in CHO-K1-Zellen ektopisch exprimiert. Während das Protein mit der p.R217C-Mutation sowie HCCS-Wildtyp in den Mitochondrien nachweisbar war, lag das HCCS-Δ197-268-Protein diffus im Zytoplasma und im Kern verteilt vor.

Das *HCCS*-Genprodukt ist eine Hämlyase, d.h. es katalysiert die kovalente Bindung der Häm-Gruppe an unreifes Cytochrom c, wodurch nach einer Konformationsänderung die reife

Form des Cytochrom *c* entsteht. Letzteres ist sowohl für die oxidative Phosphorylierung als auch für den Caspase-abhängigen Zelltod (Apoptose) von entscheidender Bedeutung. Die aus der Literatur bekannte indirekte und direkte Beteiligung der Holocytochrom *c*-Typ-Synthese am apoptotischen Zelltod hat uns zu der Hypothese geführt, dass eine Verschiebung des Gleichgewichts vom Caspase-abhängigen Zelltod zum Caspase-unabhängigen Zellsterben, und hier insbesondere zum Zelltod durch Nekrose, mit inflammatorischen Prozessen und damit einhergehend mit einer Schädigung der betroffenen Gewebe während der Embryonalentwicklung von weiblichen Individuen mit einem heterozygoten *HCCS*-Gendefekt assoziiert sein könnte. Inwieweit eine Störung des Gleichgewichts zwischen Apoptose und Nekrose, eine beeinträchtigte oxidative Phosphorylierung und/oder das individuelle X-Inaktivierungsmuster die Schwere des MLS-Phänotyps beeinflussen, bleibt in der Zukunft herauszufinden.

Dieser Forschungsbericht fasst die Daten von zwei Arbeitsgruppen (Prof. Dr. Kerstin Kutsche, Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf und Dr. Brunella Franco, Telethon Institut für Genetik und Medizin in Neapel, Italien) zusammen, die sich beide mit der molekularen Charakterisierung von Patientinnen mit dem MLS-Syndrom beschäftigt haben, um den für diese Erkrankung ursächlichen Gendefekt zu finden. Die erzielten Ergebnisse ergänzten bzw. bestätigten einander.

Wie eingangs bereits ausgeführt, war vor Beginn dieser Arbeit mehrfach versucht worden, bei Patientinnen mit MLS und normalem Karyotyp ein mit dieser Erkrankung assoziiertes submikroskopisches Rearrangement innerhalb des kritischen Intervalls in Xp22.2 nachzuweisen (Cox et al. 1998, Morleo et al. 2005). Der mit uns kooperierenden italienischen Arbeitsgruppe war von einer in Israel arbeitenden klinischen Genetikerin Untersuchungsmaterial einer Familie zur Verfügung gestellt worden, in der es zwei betroffene Schwestern mit MLS und sehr variablem Phänotyp gibt. Die jüngere der beiden, die Index-Patientin BA912, weist mit schwerer bilateraler Mikrophthalmie und Sklerocornea sowie linearen Hautdefekten im Gesicht die für MLS typische Symptomtrias auf. Im Alter von sechs Monaten wurde sie aufgrund einer junctionalen Tachykardie durch Elektroablation behandelt. Die ältere Schwester zeigt vergleichsweise milde Symptome und weist auf dem linken Auge eine Trübung der Hornhaut auf, ein angeborenes Glaukom mit vollständiger vorderer Synechie und eine weiße vordere Katarakt. Ihr rechtes Auge zeigte ein Leukom der Hornhaut, das sich im weiteren Verlauf jedoch zurückbildete. Die gesunden, nicht miteinander verwandten Eltern haben noch vier gesunde Kinder, drei Söhne und eine Tochter (Abb. 1B; Wimplinger et al. 2006). Das Paar hatte noch eine weitere Tochter, die eine bilaterale Anophthalmie aufwies und wenige Stunden nach der Geburt verstarb. Weiterhin sind drei spontane Aborte bei der klinisch unauffälligen Mutter bekannt.

Bei der Patientin BA912 handelt es sich um eine der Patientinnen mit MLS, die bereits auf molekularer Ebene, u.a. durch Array-CGH-Analyse, ausgiebig charakterisiert worden waren und bei denen keine Hinweise auf das Vorliegen eines submikroskopischen Rearrangements erzielt werden konnten. Anzumerken bleibt allerdings, dass die durchgeführte Array-CGH lediglich ein geringes Auflösungsvermögen hatte, so dass nur Deletionen oder Duplikationen, die größer als 1 Mb sind, hätten detektiert werden können (Morleo et al. 2005). Aufgrund des klassischen Phänotyps der Patientin BA912 und der Annahme, dass sowohl der klinische Phänotyp der älteren Schwester als auch der der postpartal verstorbenen Schwester in das MLS-Spektrum fällt, wurde in dieser Familie, bestehend aus den zwei Schwestern mit MLS, ihren vier gesunden Geschwistern und den Eltern, eine Segregationsanalyse durchgeführt. Mit dieser Untersuchung sollte bei den beiden Patientinnen nach einem Verlust der Heterozygotie im kritischen MLS-Intervall gesucht werden. Die verwendeten Mikrosatellitenmarker *DXS7108*, *CxM06* und *CxM09* befinden sich distal vom *HCCS*-Gen, ein CGG-Repeat liegt in der 5'-UTR („untranslated region“) des *HCCS*-Gens (SNP *rs5901444*) und zwei weitere Marker liegen proximal zur kritischen Region (*DXS8019*, *DXS999*) (Abb. 1A; Wimplinger et al. 2006). Zunächst wurden für alle Familienmitglieder Haplotypen erstellt. Dabei fiel auf, dass die vom MLS-Syndrom betroffenen Schwestern einen anderen maternalen Haplotyp geerbt hatten als ihre gesunden Geschwister (Abb. 1B; Wimplinger et al. 2006). Zudem zeigte sich, dass die beiden Patientinnen für den CGG-Repeat im *HCCS*-Gen nur das paternale (8 CGG-Repeats) und kein maternales Allel aufweisen, im Gegensatz zu ihren gesunden Geschwistern, die an dieser Stelle heterozygot sind (Abb. 1B; Wimplinger et al. 2006). Die Mutter zeigt an diesem Locus ebenfalls nur ein Allel (7 CGG-Repeats), ist also entweder homo- oder hemizygot. Da die beiden betroffenen Schwestern einen maternalen Haplotyp ohne maternales Allel für den CGG-Repeat im *HCCS*-Gen geerbt hatten, ließ dies vermuten, dass sowohl die beiden Patientinnen als auch ihre asymptotische Mutter hemizygot für diesen Marker sind und dementsprechend in diesem Bereich eine Mikrodeletion aufweisen konnten.

Um weitere Hinweise auf das Vorliegen einer Mikrodeletion im 5'-Bereich des *HCCS*-Gens zu erhalten, wurde eine Southern-Blot-Analyse an genomischer DNA der Patientin BA912 mit einer cDNA-Sonde durchgeführt, die komplementär zur 5'-UTR des *HCCS*-Gens war. Im Vergleich zu den DNAs von Kontrollpersonen traten bei der Patientin BA912 neben dem erwarteten Muster aberrante Banden auf, die auf ein Rearrangement unter Einbeziehung des *HCCS*-Gens hindeuteten (Abb. 2A; Wimplinger et al. 2006).

Um das Vorliegen der vermuteten Deletion zu bestätigen, wurde eine quantitative Real-time PCR durchgeführt. Dazu wurden Abschnitte der Exons 1 bis 7 von *HCCS* amplifiziert, indem genomische DNA der an MLS erkrankten Schwestern und ihrer gesunden Mutter als Matrize eingesetzt wurde. Die relative Kopienanzahl der einzelnen Exons wurde mittels der $\Delta\Delta C_t$ -

Methode („comparative threshold cycle method“) bestimmt. Dabei konnte gezeigt werden, dass bei den drei Probandinnen die relative Kopienanzahl der Exons 1 bis 3 der einer haploiden und die der Exons 4 bis 7 einer diploiden Kontrollperson entspricht. Somit liegt bei den erkrankten Schwestern und ihrer Mutter eine Mikrodeletion vor, die mindestens die Exons 1 bis 3 des *HCCS*-Gens einschließt (Abb. 2B; Wimplinger et al. 2006).

Zur Bestimmung der genauen Deletionsgröße wurde ein den Bruchpunkt überspannendes Amplikon aus der genomischen DNA der von MLS betroffenen Schwestern und ihrer gesunden Mutter generiert. Erwartungsgemäß war dieses Produkt bei einer Kontrollperson nicht nachweisbar. Die nachfolgende Sequenzierung dieses „junction“-Fragments ergab, dass sich die Mikrodeletion über 8672 Bp erstreckte und die *HCCS*-Exons 1 und 2, die ersten 83 Bp des Exons 3, Teile der 5'-UTR des *MID1*-Gens, die jeweiligen intronischen Sequenzen dieser Gene sowie den dazwischenliegenden intergenischen Abschnitt umfasst (Abb. 2C; Wimplinger et al. 2006).

Die Identifizierung einer Teile des *HCCS*-Gens umfassenden Mikrodeletion ließ uns vermuten, dass *HCCS*-Mutationen mit dem MLS-Phänotyp assoziiert sein könnten. Da mir DNA-Proben von zwei Patientinnen mit MLS-Syndrom und unauffälligem weiblichen Karyotyp zur Verfügung standen, sollten diese einer Mutationsanalyse im *HCCS*-Gen unterzogen werden. Bei der ersten Patientin (MS1) handelte es sich um ein zum Untersuchungszeitpunkt fünfjähriges Mädchen (Abb. 3B; Wimplinger et al. 2006). Sie ist das erste Kind gesunder, nicht verwandter Eltern. Nach der Geburt wurde bei dem Säugling eine bilaterale Mikrophthalmie diagnostiziert, die besonders stark auf der rechten Seite ausgeprägt war. Die Hornhäute beider Augen waren trüb und vaskularisiert. Auffällig waren außerdem lineare und fleckförmige erythematöse Hautläsionen, die sowohl im Gesicht entlang der Wangen als auch im Halsbereich rechts vorlagen (Abb. 3A; Wimplinger et al. 2006). Mit drei Monaten wurde bei der Patientin eine vollständige Sklerocornea festgestellt. Die Hautaplasien waren zu diesem Zeitpunkt schon weitgehend verheilt. Bei einer Nachuntersuchung der Patientin im Alter von sechs Monaten wurde eine leichte Entwicklungsverzögerung festgestellt. Aufgrund der Symptomtrias Mikrophthalmie, Sklerocornea und den bei Geburt deutlich sichtbaren linearen Hautdefekten wurde der Verdacht auf ein MLS-Syndrom geäußert. Mit 13 Monaten wurden bei der Patientin MRT-Untersuchungen durchgeführt. Hier zeigten sich asymmetrische Augenfehlbildungen, wobei der rechte Bulbus kleiner als der linke war. Außerdem wurden eine Hypoplasie des Corpus callosum, das Fehlen des Septum pellucidum sowie eine geringfügige Erweiterung des dritten Ventrikels beobachtet. Bei der Wiedervorstellung der Patientin mit fünf Jahren lag die Körpergröße im Normbereich, und sie zeigte eine leichte bis mittelgradige Entwicklungsverzögerung.

Desweiteren lag mir die DNA-Probe eines zum Untersuchungszeitpunkt neunjährigen Mädchens (Patientin MS2) vor (Abb. 3C; Wimplinger et al. 2006). Die Patientin wurde in der 41. Schwangerschaftswoche nach unauffällig verlaufener Schwangerschaft als erstes Kind gesunder, nicht verwandter Eltern geboren. Nach der Geburt wurden eine bilaterale Mikrophthalmie, Mikrocorneae und Cornealtrübungen diagnostiziert. Lineare Hautdefekte im Gesicht- und Halsbereich waren nicht sichtbar, allerdings wurden pustulöse Effloreszenzen am Rücken bemerkt. Im Alter von einem Jahr wurde die Patientin wegen einer tachykarden Herzrhythmusstörung mit breiten Kammerkomplexen unklarer Genese stationär behandelt. Die Tachykardien waren medikamentös sehr schwer beherrschbar. Letztendlich konnte durch eine orale Medikation, die aus einer hochdosierten Kombination aus Sotalol und Flecainid bestand, eine Verbesserung der Symptome erzielt werden. Der Verlauf wurde durch einen Infarkt der Arteria cerebri media rechts mit Ausbildung einer Hemiparese und Spastik links kompliziert. Die neurologische Symptomatik bildete sich unter krankengymnastischer Behandlung teilweise zurück. Im Alter von acht Jahren erlitt das Mädchen einen ersten tonisch-klonischen Krampfanfall. Zu dieser Zeit wurde aufgrund des komplexen Augenbefundes, der rezidivierenden ventrikulären Tachykardien und des Krampfanfalls erstmals der Verdacht auf ein MLS-Syndrom geäußert.

Die DNA-Proben der Patientinnen MS1 und MS2 wurden von mir einer Mutationsanalyse im *HCCS*-Gen unterzogen. Dazu amplifizierte ich zunächst neben der Kodierregion (Exons 2 bis 7) auch angrenzende intronische Sequenzen durch PCR und führte nachfolgend eine Sequenzierung der erhaltenen Amplikons durch. Bei der Auswertung der Sequenzen konnte ich bei der Patientin MS1 im Exon 6 des *HCCS*-Gens, an der Position 589 der Kodierregion, einen heterozygoten Austausch von Cytosin nach Thymin identifizieren (c.589C>T). Dieser Austausch hat zur Folge, dass anstelle eines Codons für Arginin ein Stop-Codon entsteht (p.R197X); es handelt sich also um eine Nonsense-Mutation (Abb. 3D links; Wimplinger et al. 2006). Bei der Patientin MS2 ergab die Mutationsanalyse im Exon 7 des *HCCS*-Gens einen heterozygoten Austausch von Cytosin nach Thymin an der Position 649 der Kodierregion (c.649C>T), für den die Aminosäuresubstitution von Arginin nach Cystein an der Position 217 der *HCCS*-Aminosäurekette (p.R217C) vorhergesagt wird. Daher liegt hier vermutlich eine Missense-Mutation vor (Abb. 3D, rechts; Wimplinger et al. 2006). Um herauszufinden, ob es sich bei den gefundenen Austauschen um bekannte SNPs handelt, recherchierte ich in den Datenbanken von NCBI (National Center for Biotechnology Information) und ENSEMBL [es handelt sich hierbei um ein gemeinsames Projekt zwischen EMBL-EBI (European Molecular Biology Laboratory und European Bioinformatics Institute) und dem Wellcome Trust Sanger Institut]. Es stellte sich heraus, dass keiner der gefundenen Austausche in den SNP-Datenbanken verzeichnet war. Daraufhin analysierte ich, ob die beobachteten genetischen Veränderungen bei Kontrollpersonen vorkommen. Ich untersuchte 50 (c.589C>T) bzw. 110

(c.649C>T) DNAs von weiblichen Kontrollpersonen auf das Vorliegen des entsprechenden Austauschs, indem ich das entsprechende *HCCS*-Exon aus den genomischen DNAs amplifizierte und einer SSCP („single stranded conformation polymorphism“) - Analyse unterzog. Ich konnte die Veränderungen bei keiner der Kontrollpersonen nachweisen. Da auch die Eltern der beiden Patientinnen MS1 und MS2 die jeweilige Mutation im *HCCS*-Gen nicht tragen, wie ich durch direkte Sequenzanalyse des entsprechenden PCR-Produkts zeigen konnte, gingen wir davon aus, dass die Punktmutationen bei den Patientinnen mit MLS-Syndrom *de novo* entstanden sind. Die Elternschaft hatte ich zuvor für beide Eltern-Kind-Trios anhand von zehn hochpolymorphen Mikrosatellitenmarkern bestätigt. Die Befunde, dass keine der Punktmutationen bei Kontrollpersonen gefunden wurde, und dass die gesunden Eltern der Patientinnen die jeweilige Mutation nicht aufweisen, deuteten stark darauf hin, dass es sich in beiden Fällen um pathogene Sequenzvarianten handelt.

Nachfolgend wurden die Auswirkungen der gefundenen Punktmutationen auf die Enzymaktivität von HCCS durch funktionelle Studien charakterisiert. Um die möglichen Auswirkungen im Vorfeld abschätzen zu können, recherchierte ich in der Literatur nach bekannten Domänen des HCCS-Proteins. Neben in der Evolution konservierten CPV-Motiven, die sich aus den Aminosäuren Cystein, Prolin und Valin zusammensetzen und für die Bindung von HCCS an Häm *c* essentiell sind (Steiner et al. 1996), weist HCCS im dritten Viertel der Aminosäurekette zwei aufeinanderfolgende hochkonservierte „targeting“-Motive auf, die zusammen für den Transport von HCCS ins Mitochondrium verantwortlich sind (Diekert et al. 1999). Die Missense-Mutation c.649C>T betrifft den in der Evolution hochkonservierten Arginin-Rest an der Position 217 der HCCS-Aminosäurekette, welcher nur eine Aminosäure C-terminal zum zweiten „targeting“-Motiv lokalisiert ist (Abb. 3E; Wimplinger et al. 2006). Die Nonsense-Mutation c.589C>T führt 21 Nukleotide stromaufwärts der letzten Exon-Exon-Verbindung (Exons 6 und 7) zum verfrühten Auftreten eines Stop-Codons. Obwohl diese Mutation auch zu einem *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD) führen könnte, werden mRNAs, bei denen ein vorzeitiges Stop-Codon weniger als 50-55 Nukleotide stromaufwärts der am weitesten 3' gelegenen Exon-Exon-Verbindung lokalisiert ist, im Allgemeinen nicht durch NMD abgebaut (Nagy und Maquat 1998). Wahrscheinlicher ist, dass das vorzeitige Stop-Codon zu einem Abbruch der Proteinbiosynthese an der Position 196 der Aminosäurekette führt, wodurch ein trunkiertes Protein entsteht (Verlust der 72 C-terminalen Aminosäuren: $\Delta 197-268$). Die Folge ist u.a. der partielle Verlust des C-terminalen „targeting“-Motivs. In der folgenden Abbildung sind die Domänenstruktur des HCCS-Proteins und die theoretischen Auswirkungen der Punktmutationen auf Proteinebene schematisch dargestellt.

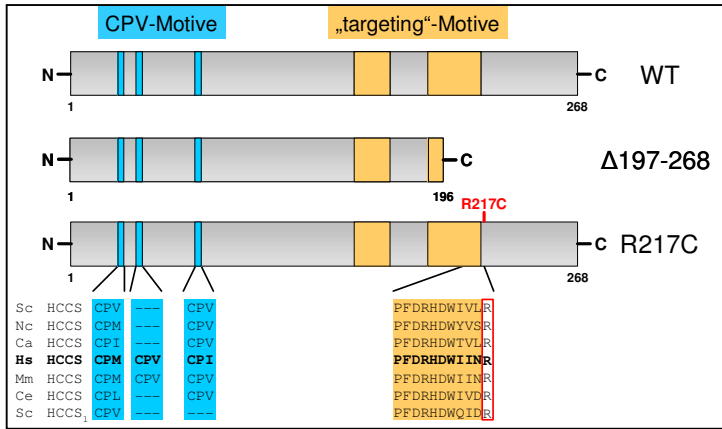


Abb. 3: Schematische Darstellung der Domänenstruktur des HCCS-Proteins sowie der möglichen Auswirkungen der Punktmutationen auf Proteinebene

Die verschiedenen HCCS-Proteine, das Wildtyp-Protein (WT), das trunktierte ($\Delta 197-268$) und das die p.R217C-Mutation tragende Protein sind untereinander durch einen waagerechten grauen Balken dargestellt und rechts beschriftet. N- und C-Terminus sind gekennzeichnet. Die Anzahl der Aminosäuren ist unterhalb der Domänenstruktur angegeben. Funktionelle Domänen sind durch vertikale farbige Balken eingezeichnet. Dabei sind die CPV-Motive blau und die beiden mitochondrialen „targeting“-Motive orange farbig dargestellt. Die Position der Missense-Mutation ist in rot angegeben. Unterhalb der Domänenstruktur ist für die CPV-Motive und für einen Teil des zweiten „targeting“-Motivs ein Aminosäurevergleich von HCCS-Proteinen verschiedener Spezies gezeigt. Die Aminosäuren sind im Einbuchstaben-Code angegeben, wobei die humane Sequenz jeweils fett hervorgehoben ist. Der von der p.R217C-Mutation betroffene konservierte Arginin-Rest ist durch einen roten Kasten hervorgehoben. Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; Nc, *Neurospora crassa*; Ca, *Candida albicans*; Hs, *Homo sapiens*; Mm, *Mus musculus*; Ce, *Caenorhabditis elegans*. HCCS₁ ist eine bei *S. cerevisiae* vorhandene Cytochrom *c*₁-spezifische Hämlyase.

Um den Einfluss der beiden Punktmutationen auf die enzymatische Aktivität der Hämlyase zu untersuchen, benutzte ich einen Hefekomplementations-Assay. Für diesen stand mir ein *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm (B-8025) zur Verfügung, der eine Deletion im *CYC3*-Gen aufweist. *CYC3* kodiert für Cyc3p, das HCCS-Ortholog der Hefe, wobei zwischen dem humanen Protein und dem Hefeprotein eine Aminosäure-Identität von ca. 35% besteht. Die *CYC3*-Deletion führt dazu, dass der Hefestamm auf einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle (z.B. Glycerol) kein Wachstum mehr zeigt. In der folgenden Abbildung ist der Zusammenhang zwischen einem auf einem Cyc3p-Mangel basierenden Atmungsketten-defekt und der Verwertung von Glycerol schematisch dargestellt.

Um den Einfluss der beiden Punktmutationen auf die enzymatische Aktivität der Hämlyase zu untersuchen, benutzte ich einen Hefekomplementations-Assay. Für diesen stand mir ein *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm (B-8025) zur Verfügung, der eine Deletion im *CYC3*-Gen aufweist. *CYC3* kodiert für Cyc3p, das HCCS-Ortholog der Hefe, wobei zwischen dem humanen Protein und dem Hefeprotein eine Aminosäure-Identität von ca. 35% besteht. Die *CYC3*-Deletion führt dazu, dass der Hefestamm auf einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle (z.B. Glycerol) kein Wachstum mehr zeigt. In der folgenden Abbildung ist der Zusammenhang zwischen einem auf einem Cyc3p-Mangel basierenden Atmungsketten-defekt und der Verwertung von Glycerol schematisch dargestellt.

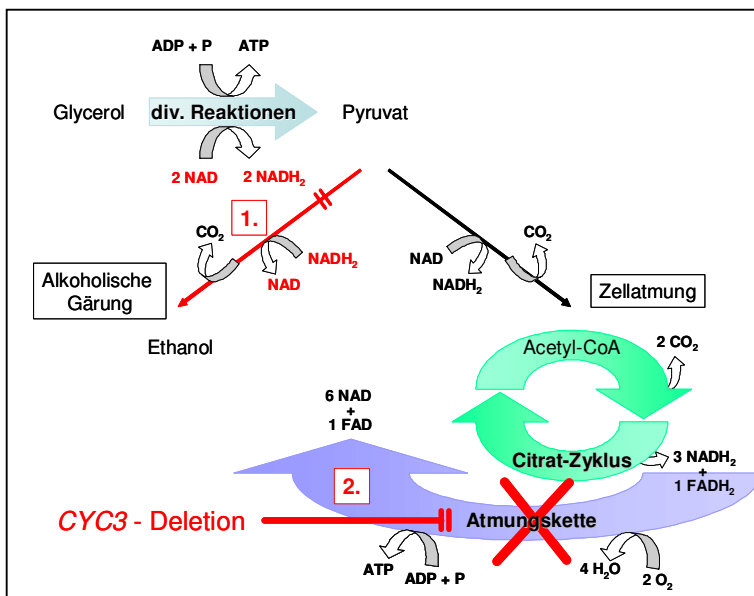


Abb. 4: Verstoffwechslung von Glycerol und deren Beeinträchtigung durch eine Cyc3p-Defizienz

Glycerol wird durch mehrere Reaktionen in Pyruvat umgewandelt. Pro Glycerol-Molekül fallen dabei zwei Reduktionsäquivalente (NADH_2) an, so dass durch nachfolgende Prozesse auch wieder zwei NAD generiert werden müssen. Durch die anaerob ablaufende alkoholische Gärung (links) wird durch den Pyruvat-Abbau nur ein Molekül NADH_2 zu NAD oxidiert (1.), weshalb Glycerol nicht vergoren werden kann. Durch oxidative Prozesse sind Hefen unter aeroben Bedingungen in der Lage, Glycerol zu „veratmen“ (Zellatmung, rechts). Dabei wird Pyruvat oxidativ zu Acetyl-CoA decarboxyliert und im Citrat-Zyklus zu CO_2 oxidiert. Die dabei anfallenden Reduktionsäquivalente (NADH_2 und FADH_2) werden in der Atmungskette auf molekularen Sauerstoff (O_2) übertragen und es wird ATP synthetisiert. Fällt die Atmungskette

aufgrund eines Mangels an Cytochrom *c* aus (z.B. bedingt durch eine Cyc3p-Defizienz der Hefe), kann Glycerol auch unter aeroben Bedingungen nicht mehr zur Energiegewinnung genutzt werden (2.). Acetyl-CoA, Acetyl-Coenzym A; ATP, Adenosin-triphosphat; ADP, Adenosindiphosphat; CO_2 , Kohlendioxid; FAD, Flavinadenindinukleotid (oxidiert); FADH_2 , Flavinadenindinukleotid (reduziert); H_2O , Wasser; NAD, Nicotinamidadenindinukleotid (oxidiert); NADH_2 , Nicotinamidadenindinukleotid (reduziert); O_2 , molekularer Sauerstoff; P, Phosphatrest.

Zu Beginn meiner Promotionsarbeit lagen Erkenntnisse darüber vor, dass der Cyc3p-Enzymdefekt des Hefestamms B-8025 durch die Expression des humanen HCCS-Proteins komplementiert werden kann, d.h. diese Hefe-Mutante ist dann wieder in der Lage, unter aeroben Bedingungen in Medien zu wachsen, die ausschließlich Glycerol als Energie-Quelle enthalten (Schwarz und Cox 2002).

Im Rahmen der Vorarbeiten für den Hefekomplementations-Assay klonierte ich die Kodierregionen *HCCS-Δ197-268*, *HCCS-R217C*, *HCCS-WT* und *CYC3* jeweils in den Hefeexpressionsvektor pYEX4Tps, mithilfe dessen es möglich ist, die verschiedenen HCCS-Proteine in der Hefe als N-terminale GST (Glutathion-S-Transferase) – Fusionsproteine zu exprimieren. Alle Konstrukte wurden von mir durch Sequenzierung überprüft. Nachdem ich die einzelnen Konstrukte in den Hefestamm B-8025 transformiert hatte, züchtete ich die Hefen zunächst in Glucose-haltigem Selektionsmedium an. Einen Teil der Flüssigkultur verwendete ich zur Herstellung von Proteinlysaten, um die Expression der GST-Fusionsproteine mithilfe eines gegen GST gerichteten, HRP („horse radish peroxidase“)-gekoppelten Antikörpers zu überprüfen. In einer nachfolgenden Western-Blot-Analyse konnte ich die Expression der GST-Fusionsproteine *HCCS-Δ197-268*, *HCCS-R217C*, *HCCS-WT* und *Cyc3p* nachweisen (Abb. 4B; Wimplinger et al. 2006). Die restliche Kultur benutzte ich dazu, um die Wachstumseigenschaften der verschiedenen Transformanten auf Glycerol-Agar zu testen. Wie erwartet, stellte ich nach einigen Tagen der Bebrütung der Platten bei 30°C fest, dass Hefen, die *Cyc3p* bzw. humanes HCCS-Wildtyp-Protein exprimierten, deutlich sichtbare Kolonien bildeten. Demgegenüber konnten Hefen, die eines der beiden mutierten HCCS-Proteine (*R217C* bzw. *Δ197-268*) exprimierten, sich auf Glycerol-haltigem Agar nicht vermehren und bildeten dementsprechend keine Kolonien (Abb. 4A; Wimplinger et al. 2006). Mittels Western-Blot-Analyse gelang mir auch für Hefen, die die Proteine GST-*HCCS-WT* bzw. GST-*Cyc3p* in Glycerol-haltigem Medium exprimieren sollten, die Detektion der entsprechenden Proteinbanden (Abb. 4B; Wimplinger et al. 2006). Somit konnte ich mithilfe des Hefekomplementations-Assays zeigen, dass keines der beiden mutierten humanen HCCS-Proteine den Enzymdefekt des *CYC3*-defizienten Hefestamms komplementieren kann. Daraus schloß ich, dass die mutierten *HCCS*-Genprodukte ihre Funktion innerhalb der Cytochrom *c*-Biosynthese sehr wahrscheinlich nicht mehr ausüben können.

Eine Möglichkeit, den Verlust der Komplementationsfähigkeit der beiden mutierten HCCS-Proteine zu erklären, bestand darin, dass sowohl das C-terminal trunkierte als auch das die *R217C*-Mutation aufweisende HCCS-Protein nicht mehr in die Mitochondrien transportiert wird. Um dies zu analysieren, führte ich Immunfluoreszenz-Experimente durch. Dazu klonierte ich die Kodierregionen *HCCS-Δ197-268*, *HCCS-R217C* und *HCCS-WT* jeweils in den eukaryotischen Expressionsvektor pMT2SM-HA-DEST. Dieser Vektor ermöglicht die

Expression der verschiedenen HCCS-Proteine als N-terminale HA (Häm~~a~~gglutinin) - Fusionsproteine. Alle Konstrukte wurden von mir durch Sequenzierung überprüft und nachfolgend in CHO-K1-Zellen transfiziert. Am nächsten Tag inkubierte ich die Zellen mit dem Supravital-Farbstoff „MitoTracker“, der Mitochondrien in lebenden Zellen spezifisch anfärbt, und fixierte sie nachfolgend. Um die HA-markierten HCCS-Fusionsproteine zu detektieren, inkubierte ich die fixierten und permeabilisierten Zellen mit einem gegen HA gerichteten, Fluorescein-gekoppelten Antikörper und wertete die Zellpräparate unter dem Konfokalmikroskop aus. Wie ich erwartet hatte, lokalisierte das HCCS-Wildtyp-Protein in den Mitochondrien (Abb. 5A-C; Wimplinger et al. 2006). Auch das die p.R217C-Mutation tragende HCCS-Protein zeigte eine Kolo-kalisation mit den durch „MitoTracker“ angefärbten Mitochondrien (Abb. 5D-F; Wimplinger et al. 2006). Dagegen beobachtete ich für das trun-kierte Protein eine zytoplasmatische und nukleäre Verteilung (Abb. 5G-I; Wimplinger et al. 2006). Um auszuschließen, dass das HA-Epitop die subzelluläre Lokalisation von HCCS beeinträchtigt, wurden die entsprechenden HCCS-Proteine zusätzlich mit einer N-terminalen bzw. C-terminalen EGFP-Markierung bzw. einem C-terminalen V5-Epitop versehen. Diese Konstrukte stellte ich mithilfe des Gateway-Systems her. Durch nachfolgende Immunfluoreszenz-Experimente konnte ich zeigen, dass die mit diesen Epitopen versehenen HCCS-Proteine dieselbe subzelluläre Verteilung aufweisen wie die entsprechenden HA-HCCS-Fusionsproteine. Aus diesen Ergebnissen schloß ich, dass der hochkonservierte Argininrest an der Position 217 des HCCS-Proteins zwar vermutlich essentiell für die Hämlyasefunktion ist, dass jedoch eine Aminosäuresubstitution von Arginin nach Cystein an dieser Position keinen Einfluss auf die korrekte subzelluläre Lokalisation des Proteins hat. Dagegen scheinen die 72 C-terminalen Aminosäuren des HCCS-Proteins für dessen korrekte Lokalisation notwendig zu sein. Beide Ergebnisse stehen in Einklang mit der Beobachtungen von Diekert und Kollegen (1999), wonach es sich bei den Aminosäureresten 190 – 216 um eines der konservierten mitochondrialen „targeting“-Motive des HCCS-Proteins handelt, das für die mitochondriale Lokalisation des HCCS-Proteins essentiell ist.

Es wird angenommen, dass Hämlyasen zellautonom arbeiten und daher ein *HCCS*-Gendefekt in einer Zelle nicht durch eine benachbarte Zelle mit funktionell intaktem HCCS aufgehoben werden kann. Weibliche Embryos, die heterozygot für eine Mutation im *HCCS*-Gen sind, weisen zumindest bis zu einem bestimmten Entwicklungsstadium aufgrund der zufälligen X-Inaktivierung eine Zellpopulation auf, in welcher das Wildtyp-Allel exprimiert wird, und eine zweite, in der das defekte Allel aktiv sein sollte. Letztere weist somit eine funktionelle Nullisomie auf, die vermutlich zu einem selektiven Zellverlust und nachfolgend zu einem verschobenen X-Inaktivierungsmuster in den verschiedenen Geweben führt. Um bei den beiden Patientinnen mit MLS und *de novo* Punktmutation im *HCCS*-Gen das X-Inaktivierungsmuster zu bestimmen, führte ich an genomischer DNA der beiden Patientinnen

und ihrer Eltern einen Methylierungstest am hochpolymorphen Androgen-Rezeptor-Lokus (*AR*-Lokus) in Xq12 durch. Das Prinzip dieser Analyse ist in Abbildung 5 verdeutlicht.

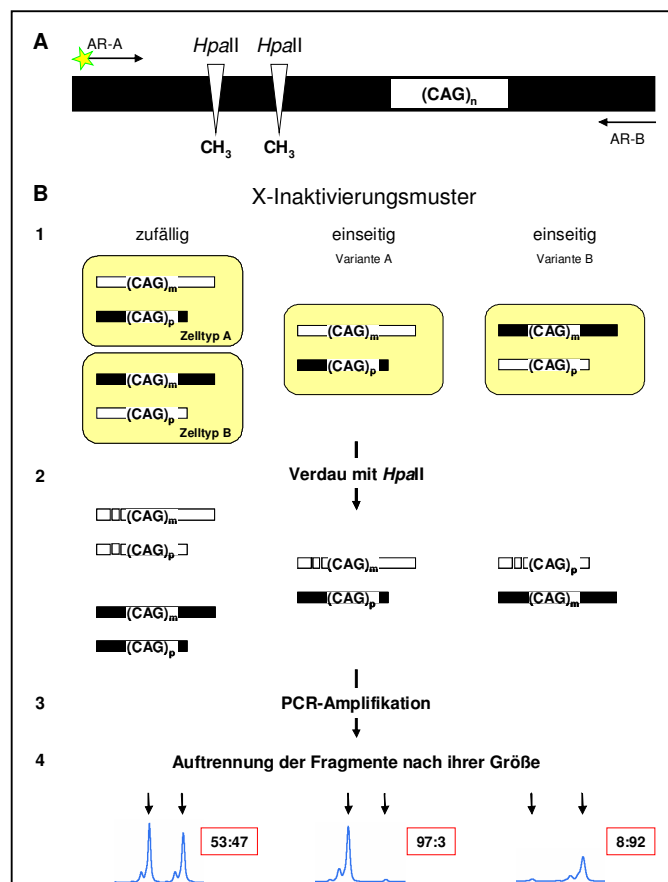


Abb. 5: Schematische Darstellung des Methylierungstests zur Analyse des X-Inaktivierungsmusters

A, Der dicke schwarze Balken stellt einen Teil des Exons 1 des humanen *Androgen-Rezeptor-Lokus* (*AR*-Lokus) in Xq12 dar. Die darin enthaltenen *HpaII*-Schnittstellen sind durch weiße Dreiecke gekennzeichnet und beschriftet. Da die Methylierung der CpG-Dinukleotide dieser Restriktionsenzym-Schnittstellen mit der X-Inaktivierung korreliert, sind diese Dinukleotide auf dem inaktiven X-Chromosom stets methyliert (CH₃). Das mit „(CAG)_n“ beschriftete weiße Rechteck symbolisiert einen polymorphen CAG-Repeat. Die Primer AR-A und AR-B sind durch aufeinander zugerichtete Pfeile dargestellt. Das Sternchen kennzeichnet die Fluoreszenzmarkierung des Primers. **B**, (1) Die drei möglichen Konstellationen für das X-Inaktivierungsmuster sind gezeigt. Die sich in einem Gewebe befindende Zellpopulation wird durch gelbe Felder repräsentiert. Der DNA-Abschnitt auf dem aktiven X-Chromosom, der das in A dargestellte Exon 1 des *AR*-Lokus beinhaltet, ist als weißer Balken dargestellt, der entsprechende DNA-Abschnitt auf dem inaktiven X-Chromosom als schwarzer Balken dargestellt. CAG-Allele auf dem maternalen bzw. paternalen X-Chromosom sind mit (CAG)_m bzw. (CAG)_p gekennzeichnet. (2) Durch das methylierungssensitive Enzym *HpaII* wird die DNA des aktiven X-Chromosoms (weißer Balken) gespalten, da die *HpaII*-Schnittstellen dort nicht methyliert sind. Somit stehen nur nicht geschnittene DNA-Abschnitte für die nachfolgende PCR-Amplifikation zur Verfügung. (3) Durch die PCR-Amplifikation mit den Primern AR-A und AR-B werden fluoreszenzmarkierte PCR-Produkte generiert. (4) Die Auftrennung der fluoreszenzmarkierten Fragmente nach ihrer Größe erfolgt durch den „ABI Prism 310 Genetic

Analyzer“. Mithilfe der GENESCAN-Software werden die Fragmente quantifiziert und als Kurven (blau) in unterschiedlicher Höhe dargestellt. Die schwarzen Pfeile zeigen auf die beiden Allele. Das Mengenverhältnis des kleineren zum größeren Allel ist angegeben (roter Kasten).

Diese Untersuchung war aussagekräftig, da sowohl die Patientinnen MS1 und MS2 als auch ihre Mütter am *AR*-Lokus heterozygot und somit informativ sind. Die Patientinnen weisen ein X-Inaktivierungsverhältnis von 100/0 (MS1) bzw. 85/15 (MS2), also im Gegensatz zu ihren gesunden Müttern ein deutlich verschobenes X-Inaktivierungsmuster in peripheren Blutzellen auf (Abb. 6A, B; Wimplinger et al. 2006). Außerdem standen mir für diese Untersuchung Wangenschleimhautzellen der Patientin MS1 zur Verfügung, aus denen ich genomische DNA isolierte, und nachfolgend eine X-Inaktivierungsanalyse durchführte. Auch in diesem Gewebe zeigte sich eine Verschiebung des X-Inaktivierungsmusters (88/12). Durch den Vergleich der Allelgrößen des betroffenen Kindes mit denen seiner Eltern konnte ich zeigen, dass es sich bei dem im Blut inaktiven X-Chromosom bei den Patientinnen MS1 und MS2 jeweils um das paternale X-Chromosom handelt.

In Übereinstimmung zu meinen Ergebnissen konnte auch die italienische Arbeitsgruppe zeigen, dass das X-Inaktivierungsmuster der Patientin BA912, das ihrer betroffenen

Schwester und ihrer asymptomatischen Mutter im Gegensatz zu dem ihrer gesunden Schwester in peripheren Blutzellen deutlich verschoben ist (100/0) (Abb. 6C; Wimplinger et al. 2006). Zusätzlich war in Fibroblasten der Patientin BA912 ebenfalls ein verschobenes X-Inaktivierungsmuster nachgewiesen worden. Da bei beiden betroffenen Schwestern stets das maternale X-Chromosom als das inaktive nachgewiesen wurde und bei der Mutter das X-Chromosom inaktiviert vorliegt, welches sie an ihre erkrankten Töchter vererbt hatte, wurde vermutet, dass bei den drei Probandinnen das die Mikrodeletion tragende X-Chromosom inaktiviert vorliegt.

Bei den Patientinnen MS1 und MS2 ließ sich aus den Daten des Methylierungstests nicht schlussfolgern, ob das Wildtyp-X- oder das die Punktmutation tragende X-Chromosom das aktive in Blutzellen ist. Da mir eine lymphoblastoide Zelllinie der Patientin MS1 zur Verfügung stand, isolierte ich hieraus RNA und führte eine reverse Transkription durch. Mithilfe von Primern, die die mutierte Position 589 der *HCCS*-Kodierregion flankieren, generierte ich ein Amplikon, das ich sequenzierte. Es zeigte sich, dass an der Position, an der die Patientin MS1 in der genomischen DNA heterozygot ist, an der entsprechenden Stelle der cDNA nur das Wildtyp-Allel nachweisbar war (Abb. 6D; Wimplinger et al. 2006). Dies stand im Einklang mit dem Ergebnis aus der X-Inaktivierungsanalyse, wonach im Blut der Patientin nur eines der beiden X-Chromosomen in aktiver Form vorliegt. Da aus dem Methylierungstest bekannt war, dass es sich bei dem im Blut inaktiv vorliegendem X-Chromosom um das paternale handelt, schloß ich, dass das aktive, im Blut exprimierte Wildtyp-Allel maternalen Herkunft ist. Somit konnte auch gezeigt werden, dass sich bei der Patientin MS1 die Mutation auf dem paternalen Allel ereignet hatte.

Mit dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die mitochondriale Holocytochrom *c*-Typ-Synthase in die Pathogenese des MLS-Syndroms involviert ist. Es ist anzunehmen, dass die fehlende Hämlyase-Aktivität bei hemizygoten männlichen Individuen ursächlich für das Absterben dieser Feten *in utero* ist. Dies steht im Einklang mit der Letalität von hemi-, homo- und heterozygoten Knockout-Mäusen während der frühen Embryonalentwicklung (Prakash et al. 2002) und deutet darauf hin, dass die Aktivität der Hämlyase für den Organismus eine wesentliche Funktion hat.

Die Rolle des *HCCS*-Genprodukts bei der Cytochrom *c*-Biosynthese an der inneren Mitochondrienmembran wurde bereits in der Abbildung 2 verdeutlicht. Bei dem reifen Holocytochrom *c* bzw. *c₁* handelt es sich um ein lösliches Protein, das unter physiologischen Bedingungen für den Elektronentransfer zwischen den Multienzymkomplexen III und IV der Atmungskette verantwortlich ist und somit eine zentrale Rolle bei der Energiegewinnung durch die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) einnimmt. Die Ergebnisse des Hefekomplementations-Assays lassen vermuten, dass *HCCS*-defiziente Zellen, vermutlich aufgrund fehlender Cytochrom *c*-Biosynthese, eine defekte Atmungskette besitzen. Dieser

Defekt könnte somit an der Ausprägung des MLS-Phänotyps beteiligt sein. Defekte im oxidativen Stoffwechsel, z.B. hervorgerufen durch die herabgesetzte Funktionsfähigkeit eines der Multienzymkomplexe der Atmungskette, führen in der Regel zu Mitochondriopathien, einer heterogenen Gruppe von Erkrankungen, die sich im Allgemeinen in Form von neurologischen und neuromuskulären Störungen sowie Kardiomyopathien manifestieren (Zeviani und Di Donato 2004). Obwohl es innerhalb der Atmungskette auch unter physiologischen Bedingungen zu Elektronenlecks und nachfolgend zur Entstehung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) kommt, gibt es Hinweise auf eine Überproduktion von ROS in Körperzellen von Patienten, die eine mitochondriale Erkrankung haben (Pitkanen und Robinson 1996, Oexle und Zwirner 1997, Robinson 1998, Geromel et al. 2001, Carelli et al. 2004, Mattiazzi et al. 2004). Da in *HCCS*-defizienten Zellen aufgrund von fehlendem Cytochrom *c* der Elektronentransfer innerhalb der Atmungskette vermutlich ebenfalls beeinträchtigt ist und zudem gezeigt werden konnte, dass Cytochrom *c* an der Entgiftung der Zelle von ROS beteiligt ist (Zhao und Xu 2004), ist zu vermuten, dass auch in *HCCS*-defizienten Zellen eine erhöhte ROS-Konzentration vorliegt. Die phänotypische Überlappung zwischen mitochondrialen Erkrankungen und dem MLS-Syndrom, bei dem es sich um eine schwere Entwicklungsstörung mit Mikrophthalmie, Sklerocornea und Dermalaplasie handelt, ist jedoch auffallend gering, wenn man bedenkt, dass die Holocytochrom *c*-Typ-Synthase bzw. das Cytochrom *c* ebenso wie die Enzymkomplexe I bis V in die OXPHOS eingebunden sind. Dies könnte darauf hindeuten, dass der komplexe MLS-Phänotyp nicht alleine durch den Atmungskettendefekt in *HCCS*-defizienten Zellen bedingt ist, sondern dass *HCCS* bzw. das Endprodukt Cytochrom *c* zusätzlich zur Beteiligung an der OXPHOS eine weitere zelluläre Funktion ausübt.

Es ist bekannt, dass das Cytochrom *c* auf einen intrinsischen Apoptose-Stimulus hin, z.B. nach irreparabler DNA-Schädigung, aus dem mitochondrialen Intermembranraum in das Cytoplasma freigesetzt wird (Jiang und Wang 2004). Nach Cytochrom *c*- und ATP-abhängiger Oligomerisierung von APAF-1 („apoptotic protease-activating factor 1“) erfolgt die Bildung des Apoptosom-Komplexes, der die Procaspase-9 rekrutiert. Diese Interaktion führt zur Aktivierung der Procaspase, wobei die aktive Caspase-9, eine Initiator-Caspase, nachfolgend Effektor-Caspasen, wie die Caspase 3, durch Proteolyse aktiviert. Dies führt zur Einleitung apoptotischer Prozesse und damit zum sogenannten Caspase-abhängigen Zelltod, der Apoptose (Riedl und Salvesen 2007). Der intrinsische Signalweg der Apoptose-Induktion ist in der Abbildung 6 zusammengefasst.

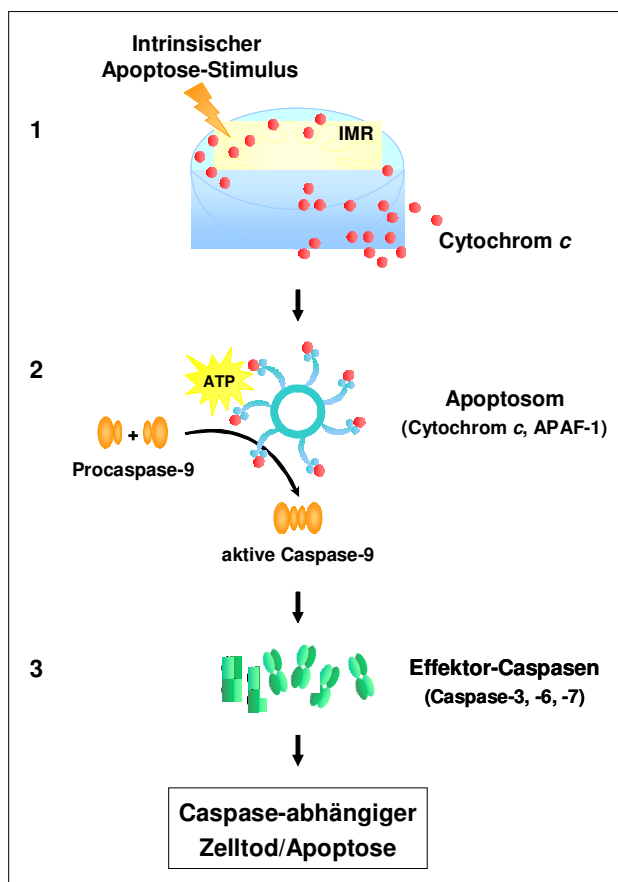


Abb. 6: Schematische Darstellung der zum Caspase-abhängigen Zelltod führenden intrinsischen Apoptosekaskade

(1) Nach einem intrinsischen Apoptose-Stimulus (orange farbiger Blitz) erfolgt die Freisetzung von Cytochrom c (rote Kugeln) vom mitochondrialen Intermembranraum (IMR) in das Zytosol. (2) In Abhängigkeit von ATP wird der Apoptosom-Komplex, bestehend aus Cytochrom c und dem APAF-1-Oligomer (blau dargestellte Struktur), gebildet. Die Rekrutierung der inaktiven Procaspase-9-Monomere (orange farbige, ovale Formen) führt zur Dimerisierung und Aktivierung dieser Initiator-Caspase. (3) Die durch die Caspase-9 proteolytisch gespaltenen Effektor-Caspasen (grün dargestellte Strukturen) sind dann aktiv und können nachfolgend den Zelltod durch Apoptose induzieren.

Das Unvermögen der *HCCS*-defizienten Zellen, Holocytochrom c zu synthetisieren, führt vermutlich dazu, dass das Apoptosom nicht gebildet werden kann. Experimente mit Cytochrom c-defizienten Maus-Zelllinien ergaben, dass hier die Aktivierung der Caspase-3 nach einem intrinsischen apoptotischen Stimulus vermindert ist (Li et al. 2000). Knockin-Mäuse, die ein mutantes Cytochrom c exprimieren, das zwar eine normale Elektronentransportfunktion besitzt, jedoch Apaf-1 nicht aktivieren kann, weisen u.a. ZNS-Defekte auf und versterben perinatal (Hao et al. 2005). Die Ergebnisse aus diesen beiden Arbeiten deuten darauf hin, dass Cytochrom c in die Apoptosom-vermittelte Aktivierung der Caspase-3 und somit in den Ablauf des Caspase-abhängigen Zelltods involviert ist. Dies lässt vermuten, dass auch die bei MLS beobachteten ZNS-Auffälligkeiten (Augenfehlbildungen, epileptische Anfälle) auf eine Störung der Apoptose zurück zu führen sein könnten.

Der genetisch programmierte Zelltod, die Apoptose, spielt während der frühen neuronalen Entwicklung bei Vertebraten eine wichtige Rolle, wie durch den Knockout verschiedener an der Regulation des Caspase-abhängigen Zelltods beteiligter Proteine gezeigt werden konnte (Kuida et al. 1996, Cecconi et al. 1998, Hakem et al. 1998, Zheng und Flavell 2000). Daher wäre es denkbar, dass ein Zusammenhang zwischen der Störung apoptotischer Prozesse und einer Entwicklungsstörung wie MLS besteht, zumal die Apoptose auch für eine normal

ablaufende okuläre Morphogenese in der Maus wesentlich ist (Laemle et al. 1999). Bemerkenswerterweise konnte gezeigt werden, dass Caspase-3-Knockout-Mäuse eine geringgradige Mikrophthalmie, eine peripapilläre Dysplasie der Retina und eine verzögerte Rückbildung der Gefäße im Glaskörper aufweisen und dass bei diesen Mäusen apoptotische Prozesse in der inneren Kernmembran beeinträchtigt sind (Zeiss et al. 2004). Zudem scheint die Entstehung von Katarakten beim Menschen mit einer verminderten Expression von Caspase-3 in der Augenlinse assoziiert zu sein (Andersson et al. 2003). Dies könnte darauf hindeuten, dass auch die bei MLS beobachteten Augenfehlbildungen, wie Mikrophthalmie und Katarakt, auf einer verminderten Aktivierung der Caspase-3 und somit auf einer Beeinträchtigung des Caspase-abhängigen Zelltods beruhen.

Eine fehlende Cytochrom *c*-Freisetzung in *HCCS*-defizienten Zellen alleine würde jedoch nicht dazu führen, dass Effektor-Caspasen, wie die Caspase-3, ausschließlich in inaktiver Form vorliegen, da es auch Apoptosom-unabhängige Signalwege zur Aktivierung dieser Caspasen gibt (Forcet et al. 2001, Sun et al. 2002, Belmokhtar et al. 2003, Zhivotovsky 2003). In einer *HCCS*-defizienten Zelle werden diese alternativen Wege der Caspase-Aktivierung jedoch wahrscheinlich auf oberster Ebene gehemmt, da kürzlich nachgewiesen wurde, dass es sich bei *HCCS* um einen Interaktionspartner des anti-apoptotisch wirksamen Proteins XIAP („X-linked inhibitor of apoptosis protein“) handelt (Kiryu-Seo et al. 2006). Nicht an *HCCS* gebundenes XIAP besitzt die Fähigkeit, die Caspasen-3 und -7 durch Bindung an seine zweite BIR („baculoviral IAP repeat“) – Domäne zu inhibieren (Deveraux et al. 1999). Wird hingegen *HCCS* nach einem intrinsischen Apoptosestimulus aus den Mitochondrien freigesetzt, wirkt es pro-apoptotisch, da es an die gleiche BIR-Domäne von XIAP bindet, die auch zur Hemmung der Caspase-3 bzw. -7 führt (Kiryu-Seo et al. 2006). Durch die Bindung von *HCCS* an XIAP liegt demnach eine größere Anzahl freier Caspase-Moleküle vor, die den Zelltod einleiten können. Umgekehrt bewirkt das Fehlen des Antagonisten *HCCS* wahrscheinlich, dass XIAP vermehrt die Effektor-Caspasen inhibiert, was dem Caspase-abhängigen Zelltod entgegenwirkt. Dieser Mechanismus soll durch die folgende Abbildung verdeutlicht werden.

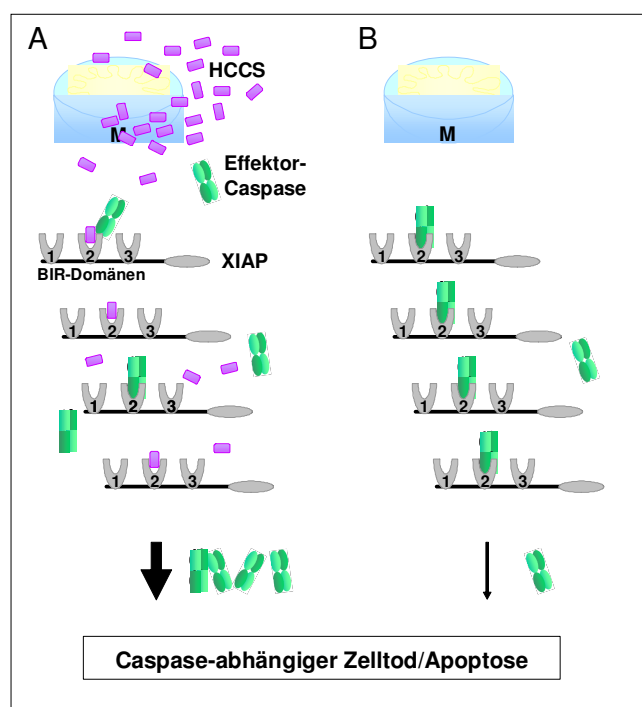


Abb. 7: Schematische Darstellung der pro-apoptischen Wirkungswiese von HCCS durch die Interaktion mit XIAP

(A) HCCS (violette Rechtecke) wird nach einem intrinsischen Apoptose-Stimulus aus den Mitochondrien (M) ins Zytosol freigesetzt. Sowohl HCCS als auch die aktive Caspase (grün dargestellte Strukturen) sind in der Lage, an die zweite BIR-Domäne von XIAP (grau dargestellte Strukturen) zu binden. Da die Interaktion mit XIAP zur Hemmung der Caspase führt, hat die Bindung von HCCS an XIAP eine pro-apoptische Wirkung, da auf diese Weise eine relativ große Anzahl freier Caspase-Moleküle zur Induktion der Apoptose vorliegt. (B) Hier ist die Situation in einer *HCCS*-defizienten Zelle wiedergegeben. Durch Fehlen von HCCS ist eine maximale Hemmung der Caspase durch XIAP möglich, so dass die Apoptose nicht oder nur in geringem Maß induziert werden kann. BIR, „baculoviral IAP repeat“; HCCS, „Holozytochrom *c*-Typ-Synthase; XIAP, „X-linked inhibitor of apoptosis protein“.

Zusammenfassend ist daher zu vermuten, dass der Caspase-abhängige Zelltod in *HCCS*-defizienten Zellen auf verschiedenen Ebenen beeinträchtigt ist, da in dieser Situation weder von der Bildung eines Apoptosoms noch der Möglichkeit einer Interaktion zwischen HCCS und XIAP auszugehen ist.

Aus Experimenten mit Knockout-Mäusen ist bekannt, dass das Fehlen von Schlüsselkomponenten der Apoptose nicht notwendigerweise dazu führt, dass der Zelltod während der Embryonalentwicklung der Mäuse völlig ausfällt, da gezeigt werden konnte, dass die Zellen auch Caspase-unabhängig, u.a. durch nekrotischen Zelltod, sterben können (Chautan et al. 1999, Oppenheim et al. 2001, Zeiss 2003). Bei den Prozessen Apoptose und Nekrose handelt es sich um zwei verschiedene Arten des Zelltods, die sich morphologisch und biochemisch stark unterscheiden. Sie sind auf identische Stimuli hin auslösbar und repräsentieren die Extreme eines breiten Spektrums von miteinander vernetzten Signalwegen (Apoptose-Nekrose-Kontinuum) (Nicotera et al. 1998, Jaattela und Tschopp 2003, Zeiss 2003). Ob eine Zelle durch Apoptose oder Nekrose zugrunde geht, ist dabei überwiegend von der intrazellulären ATP-Konzentration und der Verfügbarkeit von Caspasen abhängig (Leist et al. 1997, Formigli et al. 2000, Kroemer und Martin 2005). Aber auch erhöhter oxidativer Stress in Form von ROS kann zum Zelltod führen, wobei im Allgemeinen die Apoptose durch mäßig und die Nekrose durch stark erhöhte ROS-Spiegel charakterisiert ist (Denecker et al. 2001, Orrenius et al. 2007).

Aufgrund der geschilderten Fakten und unter der Annahme, dass Hämlyasen zellautonom arbeiten, kann für *HCCS*-defiziente Zellen Folgendes angenommen werden: Erstens führt

der Atmungskettendefekt möglicherweise zu einer stark erhöhten ROS-Konzentration in der Zelle. Zweitens kann der Apoptosom-Komplex aufgrund fehlender Cytochrom c-Biosynthese vermutlich nicht konstituiert werden. Und drittens ist anzunehmen, dass eine Interaktion zwischen HCCS und XIAP hier nicht möglich ist. Die beiden zuletzt genannten Faktoren führen dabei wahrscheinlich zu einem geringen Vorkommen von aktiven Caspasen und damit zu einer weitgehenden Inhibition des Caspase-abhängigen Zelltods in *HCCS*-defizienten Zellen. Wie bereits erwähnt, sind sowohl eine erhöhte ROS-Konzentration als auch die verringerte Verfügbarkeit von aktiven Caspasen Merkmale der Nekrose. Diese Überlegungen haben zusammengenommen zu einem Modell geführt, wonach *HCCS*-defiziente Zellen infolge des Atmungskettendefekts und nachfolgender Nekrose zugrunde gehen könnten, nachdem das X-Inaktivierungsmuster bei heterozygoten weiblichen Embryos im Blastozysten-Stadium festgelegt wurde. Zusätzlich muß in Betracht gezogen werden, dass einige der Zellen, die funktionell nullisom für *HCCS* sind, überleben könnten. Dies würde während der späteren Embryonalentwicklung dazu führen, dass an die Stelle des physiologisch ablaufenden, Caspase-abhängigen Zelltods ebenfalls nekrotischer Zelltod tritt. Das Modell hierzu ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

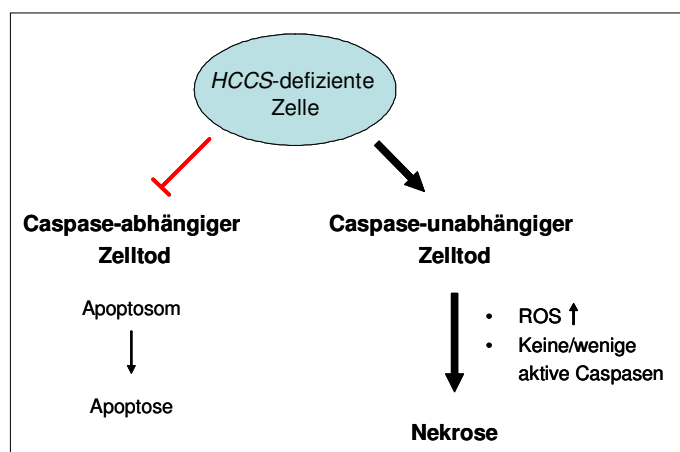


Abb. 8: Modell zur Verschiebung des Gleichgewichts von Apoptose nach Nekrose in *HCCS*-defizienten Zellen

In *HCCS*-defizienten Zellen kann das Apoptosom nicht gebildet werden. Aufgrund einer übermäßigen Hemmung von Caspasen und einer hohen Konzentration von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) könnte es zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Apoptose und Nekrose kommen, so dass *HCCS*-defiziente Zellen überwiegend durch nekrotischen Zelltod zugrunde gehen.

Während beim Zelltod durch Apoptose keine negativen Einflüsse auf benachbarte Zellen ausgeübt werden, können mit der Nekrose inflammatorische Prozesse einhergehen, die zur Schädigung der umliegenden Zellen führen (Denecker et al. 2001, Jaattela und Tschopp 2003). Deshalb kann spekuliert werden, dass die beim MLS-Syndrom beobachteten Symptome auf einer Kombination aus Atmungskettendefekt und Störung des Gleichgewichts zwischen Apoptose und Nekrose beruhen. Der Atmungskettendefekt könnte v.a. für die bei Patienten mit MLS beobachteten Kardiomyopathien ursächlich sein, während die Leitsymptome Mikrophthalmie und lineare Hautdefekte eher im Zusammenhang mit einer Störung des Caspase-abhängigen Zelltods stehen könnten. Somit wäre auch erklärbar, warum sich trotz vorhandener Fehlfunktion eines mitochondrialen Haushaltsenzym der MLS-Phänotyp deutlich von den klassischen Merkmalen der Mitochondriopathien

unterscheidet. Nichtsdestotrotz sind weiterführende Analysen notwendig, um den Einfluss der pathogenen *HCCS*-Mutationen und des individuellen X-Inaktivierungsmusters auf die Entstehung und Entwicklung des MLS-Syndroms genauer zu untersuchen.

2. Isabella Wimplinger, Anita Rauch, Ulrike Orth, Ulrich Schwarzer, Udo Trautmann, Kerstin Kutsche

Mother and daughter with a terminal Xp deletion: Implication of chromosomal mosaicism and X-inactivation in the high clinical variability of the microphthalmia with linear skin defects (MLS) syndrome (2007)

European Journal of Medical Genetics, im Druck

In dieser Arbeit wird ein neugeborenes Mädchen mit den typischen Zeichen eines MLS-Syndroms beschrieben: sie weist eine bilaterale Mikrophthalmie und lineare Hautdefekte im Gesicht und am Hals auf. Ihre Mutter zeigt keinerlei Merkmale dieser X-chromosomal dominant vererbten Erkrankung. Die konventionelle zytogenetische Analyse ergab zunächst überraschenderweise, dass sowohl Mutter als auch Tochter in jeweils 10 untersuchten Metaphasen eine terminale Deletion auf einem ihrer beiden X-Chromosomen mit dem Bruchpunkt in Xp22.2 aufweisen. Mit Hilfe serieller FISH-Analysen wurde bei der betroffenen Tochter der Bruchpunkt in der Nähe bzw. im *MSL3L1*-Gen in Xp22.2 kartiert. Da das *MSL3L1*-Gen proximal zum *HCCS*-Gen liegt, umfasst die Deletion *HCCS* vollständig, wodurch der MLS-Phänotyp der kleinen Patientin erklärt werden kann. Durch eine Zwei-Farben-FISH-Analyse mit einer Zentromersonde sowie einer telomernahen Sonde für das X-Chromosom wurde festgestellt, dass die Mutter ein chromosomales Mosaik aufweist: in 11 von 100 untersuchten Metaphasen war ausschließlich ein X-Chromosom, in diesem Fall ein normales, vorhanden, so dass auf eine 45,X-Zelllinie geschlossen wurde. In den übrigen 89 untersuchten Mitosen war bei der Mutter neben dem Wildtyp- auch das derivative X-Chromosom nachweisbar, so dass der Karyotyp der Mutter zu 45,X[11]46,X,del(X)(p22.2)[89] korrigiert wurde. Bei der Tochter wurde in allen 100 untersuchten Metaphasen neben dem normalen ein die terminale Deletion aufweisendes X-Chromosom beobachtet, womit sich bei ihr kein Anhalt für das Vorliegen eines Mosaiks ergab. Durch Haplotyp-Analysen konnte festgestellt werden, dass das paternale X-Chromosom der Mutter die Deletion trägt. Die Analyse des Methylierungsmusters am *AR*-Lokus ergab für Mutter und Tochter eine vollständig verschobene X-Inaktivierung in peripheren Blutzellen, wobei das derivative X-Chromosom stets inaktiviert vorlag. Wir vermuteten, dass ein chromosomales und/oder funktionelles Mosaik zum Ausbleiben von typischen Zeichen des MLS-Syndroms bei weiblichen Individuen, die für eine mit dem MLS-Syndrom assoziierte Mutation heterozygot sind, führen kann. So könnte die 45,X-Zellpopulation, die sehr wahrscheinlich auch in anderen Geweben der hier beschriebenen asymptotischen Mutter vorliegt, zur normalen Entwicklung dieser Frau wesentlich beigetragen haben. Andererseits ist auch denkbar, dass eine einseitige X-Inaktivierung im

frühen Blastozysten-Stadium, bei der stets das derivative X-Chromosom inaktiviert vorliegt, zum vollständigen Fehlen von Krankheitszeichen bei der Mutter der Patientin geführt hat.

Die in diesem Forschungsprojekt durchgeführte molekularzytogenetische und -genetische Charakterisierung einer Patientin mit MLS-Syndrom und ihrer Mutter basiert auf der Zusammenarbeit zwischen Prof. Dr. Kerstin Kutsche und Isabella Wimplinger (Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) sowie Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik und der Kinder- und Jugendklinik der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg.

Die zum Untersuchungszeitpunkt dreijährige Patientin zeigte bei der Geburt die klassischen Symptome des MLS-Syndroms: eine bilaterale Mikrophthalmie sowie streifige und fleckförmige erythematöse Hautdefekte entlang der Nase, des seitlichen Halses und des Kinns (Abb. 1A; Wimplinger et al. 2007a). Außerdem wurde ein persistierendes Foramen ovale und eine Agenesie des Corpus callosum festgestellt. Desweiteren weist sie am linken Fuß eine kutane Syndaktylie der zweiten und dritten Zehe auf. Die ophthalmologische Untersuchung ergab eine Mikrophthalmie und Sklerocornea des rechten und eine Agenesie des linken Auges. Acht Wochen nach der Geburt waren die Hautläsionen weitgehend verheilt (Abb. 1B; Wimplinger et al. 2007a). Die kleine Patientin zeigte eine normale Sprachentwicklung, demgegenüber war die statomotorische Entwicklung deutlich verzögert. Der Kleinwuchs der Patientin war auch knapp drei Jahre nach der Geburt nachweisbar. Die Patientin ist das dritte Kind nicht verwandter Eltern.

Die Mutter ist mit einer Körpergröße von 165 cm relativ klein, da ihre Eltern und Geschwister alle größer als 185 cm sind. Zudem zeigt sie einen tiefen posterioren Haaransatz (Abb. 1C; Wimplinger et al. 2007a), aber keine phänotypischen Merkmale des MLS-Syndroms (Abb. 1D; Wimplinger et al. 2007a). Das Paar hat noch zwei Söhne, von denen einer eine isolierte Kraniosynostose aufweist. Weiterhin ist bei der klinisch unauffälligen Mutter die Fehlgeburt eines männlichen Feten in der 14. Schwangerschaftswoche bekannt (Abb. 3; Wimplinger et al. 2007a).

Eine bereits pränatal durchgeführte zytogenetische Untersuchung hatte bei der Patientin zunächst einen unauffällig weiblichen Karyotyp ergeben. Da klinisch der Verdacht auf ein MLS-Syndrom vorlag und diese Erkrankung in der Mehrzahl der Fälle mit terminalen Xp-Deletionen einhergeht, wurde postnatal erneut eine Chromosomenanalyse mit höherer Auflösung durchgeführt. Dabei wurde dann auch eine terminale Deletion des kurzen Arms eines der beiden X-Chromosomen detektiert, mit dem Karyotyp 46,X,del(X)(p22.31). Um die Deletion in Xp molekularzytogenetisch zu bestätigen, wurden Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungs (FISH) - Analysen mit Cy3-markierten Sonden durchgeführt. Dabei handelte es sich um eine Subtelomersonde, die telomernahe Xp- und Yp-spezifische Sequenzen

detektiert, sowie um Sonden für das *SHOX*- und das *KAL1*-Gen. *SHOX* befindet sich in der pseudoautosomalen Region 1 (PAR-1) des X- bzw. Y-Chromosoms und kartiert somit in die Region Xp22.33 bzw. Yp11.32, während *KAL1* in Xp22.31 kartiert. Alle genannten Sonden ergaben ausschließlich ein Signal auf dem Wildtyp-X-Chromosom, der Karyotyp lautet somit 46,X,del(X)(p22.31).ish del(X)(p22.3)(PTEL-,SHOX-,KAL-).

Da die Patientin den klassischen MLS-Phänotyp aufweist, vermuteten wir, dass sich der Deletionsbruchpunkt innerhalb oder proximal der kritischen Region für MLS in Xp22.2 befindet. Zur Feinkartierung des Bruchpunkts wählte ich deshalb BAC-Sonden für FISH-Experimente aus, die distal (RP11-121J12), innerhalb (GS1-602M16) und proximal (RP11-299M10, RP11-79711, RP11-1L9) der kritischen Region für MLS kartieren. Ich markierte die DNA-Sonden mit fluoreszierenden Farbstoffen mittels „Nick-Translation“ und hybridisierte sie auf die Metaphase-Chromosomen der Patientin. Die Dokumentierung der Signale erfolgte mit Hilfe der Fluoreszenz-Mikroskopie. Die BAC-Sonden RP11-121J12, GS1-602M16 und RP11-299M10 ergaben jeweils nur ein Signal pro Metaphase, nämlich auf dem Wildtyp-X-Chromosom, und hybridisierten somit distal des Bruchpunkts. Dagegen hybridisierten die Sonden RP11-79711 und RP11-1L9 sowohl auf dem normalen als auch auf dem derivativen X-Chromosom, was bedeutete, dass sie proximal des Bruchpunkts kartieren. Somit gelang mir die Eingrenzung des Deletionsbruchpunkts in Xp22.2 mithilfe der Sonden RP11-299M10 (distal) und RP11-79711 (proximal). Für die Feinkartierung des Bruchpunkts verwendete ich die Fosmid-Klone F-8895D8, F-00757H8, F-4734B1, F-8718D6 und F-7925A4, die einen Contig bilden. Diese waren so ausgewählt worden, dass laut Datenbank das Insert eines Fosmids (F-8895D8) mit dem des distal des Bruchpunkts hybridisierenden BACs RP11-299M10 überlappt, während zwei der Fosmid-Inserts (F-8718D6 und F-7925A4) mit dem des proximal zum Bruchpunkt kartierenden BAC RP11-79711 überlappen (Abb. 2A; Wimplinger et al. 2007a). Nachdem ich die Fosmid-Sonden fluoreszenzmarkiert und auf die Metaphase-Chromosomen der Patientin hybridisiert hatte, konnte ich unter dem Fluoreszenz-Mikroskop erkennen, dass die Fosmide F-8895D8 und F-00757H8 distal und die Fosmide F-8718D6 und F-7925A4 proximal des Bruchpunkts hybridisieren. Dagegen ergab der Klon F-4734B1, der Anteile des *MSL3L1*-Gens enthält, bruchpunktüberlappende Signale: er zeigte ein Signal normaler Intensität auf dem Wildtyp-X- und ein abgeschwächtes Signal auf dem derivativen X-Chromosom (Abb. 2B; Wimplinger et al. 2007a). Durch die FISH-Ergebnisse konnte ich die Größe der terminalen Deletion auf etwa 11,5 Mb bestimmen. Diese Deletion hat u.a. den heterozygoten Verlust der Gene *HCCS*, *ARHGAP6*, *AMELX* zur Folge, wobei mit großer Wahrscheinlichkeit auch einige Exons des *MSL3L1*-Gens in der Region Xp22.2 mit eingeschlossen sind (Abb. 2A; Wimplinger et al. 2007a). Wie im Forschungsbericht 1 dieser Doktorarbeit beschrieben, sind heterozygot vorliegende Punktmutationen in *HCCS* mit dem

MLS-Phänotyp assoziiert (Wimplinger et al. 2006). Daher folgerte ich, dass die heterozygote Deletion des *HCCS*-Gens für das MLS-Syndrom bei dieser Patientin ursächlich ist.

Um festzustellen, ob die bei der Patientin gefundene Deletion in Xp *de novo* vorliegt, wurde eine zytogenetische Untersuchung ihrer Eltern veranlasst. Während für den Vater ein unauffällig männlicher Karyotyp festgestellt wurde, ergab die Analyse der mütterlichen Chromosomen bemerkenswerterweise die gleiche terminale Xp-Deletion wie bei der Tochter. Die zytogenetischen Befunde der mütterlichen Großeltern der Patientin waren dagegen unauffällig.

Um zu untersuchen, ob die Deletionsbruchpunkte bei Mutter und Tochter identisch sind, führte ich serielle FISH-Analysen mit den oben aufgeführten Fosmiden aus der kritischen Region für MLS an den mütterlichen Metaphase-Chromosomen durch. Dabei erhielt ich mit allen Fosmid-Sonden die gleichen Signalkonstellationen, die ich bereits an den Metaphase-Chromosomen der Patientin beobachtet hatte. Somit vermutete ich, dass die terminale Deletion bei der Mutter bezüglich ihres Bruchpunkts und somit ihres Ausmaßes der der Tochter entspricht.

Der Befund, dass Mutter und Tochter eine identische Deletion in Xp aufweisen, führte zu der Frage, warum die Tochter den klassischen MLS-Phänotyp aufweist, während die Mutter klinisch unauffällig ist. Eine Ultraschall-Untersuchung hatte eine Mikrophthalmie bei der Mutter ausgeschlossen und Hautläsionen nach ihrer Geburt waren nicht beobachtet worden. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, war in der Vergangenheit wiederholt darüber spekuliert worden, ob ein gewebespezifisches X-Inaktivierungsmuster den variablen Phänotyp bei MLS bedingt (Lindsay et al. 1994, Franco und Ballabio 2006). Es war jedoch auch vorstellbar, dass die Mutter ein chromosomales Mosaik aufweist, was möglicherweise mit der Nicht-Ausprägung von Merkmalen des MLS-Syndroms assoziiert ist. Um letzteres zu untersuchen, wurde jeweils eine Zwei-Farben-FISH-Analyse mit einer Cy3-markierten Subtelomersonde (rote Fluoreszenz) für Xp und einer FluorX-markierten Zentromersonde (grüne Fluoreszenz) für das X-Chromosom an Metaphasechromosomen von Mutter und Tochter durchgeführt. In allen 100 untersuchten Metaphasen der Tochter waren jeweils zwei Signale für die Zentromersonde und jeweils ein Signal für die Subtelomersonde darstellbar. Dagegen wurde in 11 von 100 mütterlichen Metaphasen jeweils ein Signal für die Zentromersonde und jeweils ein Signal für die Subtelomersonde beobachtet, während 89 Metaphasen das Hybridisierungsmuster aufwiesen, das bei der Tochter in allen Metaphasen beobachtet worden war. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde vermutet, dass bei der Mutter ein chromosomales Mosaik vorliegt, da in 11% ihrer Lymphozyten nur ein Wildtyp-X-Chromosom nachweisbar war, während 89% dieser Zellen neben dem Wildtyp-X-Chromosom das X-Chromosom mit der terminalen Deletion aufwiesen. Somit lautet der korrigierte Karyotyp der Mutter: 45,X[11]/46,X,del(X)(p22.2)[89].

Um die elterliche Herkunft des deletierten X-Chromosoms bei der Mutter der Patientin zu bestimmen, führte ich eine Haplotyp-Analyse an genomischer DNA der Mutter und der mütterlichen Großeltern der Patientin durch. Zuvor hatte ich die Elternschaft für dieses Eltern-Kind-Trio anhand von zehn genomweit verteilten polymorphen Mikrosatellitenmarkern bestätigt. Für die Haplotyp-Analyse wählte ich acht X-chromosomale polymorphe Mikrosatellitenmarker aus. Dabei kartiert der Marker *DXS1060* in die Region Xp22.32, die Marker *CxM29*, *CxM02*, *CxM14*, *CxM23* und *DXS987* in die Bruchpunktregion Xp22.2, *DXS1214* in Xp21.2 und *DXS1227* in Xq27.2. Für die Mikrosatelliten-PCR benutzte ich FAM-markierte Primer für die Marker *DXS987*, *DXS1227* (grüne Fluoreszenz), HEX-markierte für *DXS1214* (rote Fluoreszenz) und TET-markierte für *DXS1060* (gelbe Fluoreszenz), während die Primer für die Marker *CxM29*, *CxM02*, *CxM14* und *CxM23* nicht markiert waren. Die mittels markierter Primer erhaltenen Amplikons wurden von mir am „ABI Prism 310 Genetic Analyzer“ aufgetrennt; die Auswertung führte ich mithilfe der GENESCAN-Software durch. Für die Marker *DXS987*, *DXS1214* und *DXS1227* ist die Mutter der Patientin heterozygot, während bei ihr für den distalen Marker *DXS1060* nur das maternale Allel nachweisbar war. Die Amplikons für die Marker *CxM29*, *CxM02*, *CxM14* und *CxM23* trennte ich auf einem Polyacrylamid-Gel auf, färbte das Gel mit Silbernitrat und wertete das Bandenmuster aus. Für alle *CxM*-Marker ließ sich bei der Mutter der Patientin nur das maternale Allel darstellen (Abb. 9).

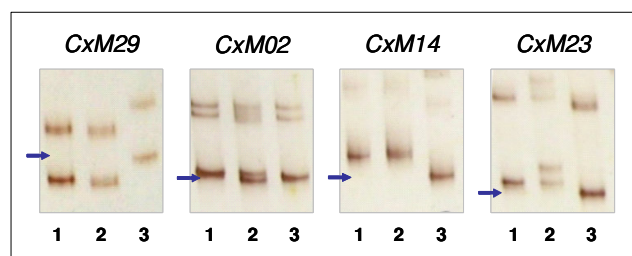


Abb. 9: Ausschnitte eines Polyacrylamidgels mit den *CxM*-Amplikons

Das Bild zeigt Ausschnitte aus einem 8%-igem Polyacrylamidgel, auf welches die Amplikons der Mikrosatelliten-PCR aufgetragen wurden. Die einzelnen Gelabschnitte sind mit dem jeweils analysierten Marker beschriftet. Die einzelnen Spuren sind nummeriert, wodurch die Amplikons der Mutter (1), der Großmutter (2) und des Großvaters (3) mütterlicherseits der Patientin gekennzeichnet sind. Ein blauer Pfeil ist jeweils auf der Höhe eingezeichnet, wo bei der Mutter der Patientin das paternale der beiden Allele zu erwarten gewesen wäre.

Die Ergebnisse der Haplotyp-Analyse sind in der Abbildung 3 der Publikation zusammengefasst (Wimplinger et al. 2007a) und zeigen, dass das paternale X-Chromosom der Mutter die terminale Deletion trägt. Die mittels Haplotyp-Analyse erhobenen Daten standen bezüglich der Xp-Deletionsgröße mit den Ergebnissen der FISH-Experimente in Einklang.

Da bisher bei fast allen Patienten mit MLS-Syndrom ein verschobenes X-Inaktivierungsmuster identifiziert worden war (Ogata et al. 1998 und darin zitierte Referenzen, Anguiano et al. 2003, Wimplinger et al. 2006, Cain et al. 2007, Schluth et al. 2007), untersuchte ich das X-Inaktivierungsmuster bei der Patientin und ihrer Mutter, um diese mit dem der mütterlichen Großmutter der Patientin zu vergleichen. Mithilfe einer methylierungssensitiven PCR am X-chromosomalen *AR*-Lokus (siehe S. 18, Abb. 5) konnte ich bei der Patientin und ihrer Mutter

ein vollständig verschobenes X-Inaktivierungsmuster (0/100) in peripheren Leukozyten nachweisen (Abb. 4; Wimplinger et al. 2007a). Der Methylierungstest zeigte, dass die Patientin das größere ihrer beiden Allele (286 Bp), welches in nahezu allen Zellen inaktiv ist, von der Mutter geerbt hatte. Da das 286 Bp-große Allel bei der Mutter ebenfalls inaktiviert vorliegt, schloß ich, dass das die Deletion aufweisende X-Chromosom bei Mutter und Tochter das Inaktive ist. Dagegen zeigt die Großmutter der Patientin ein zufälliges X-Inaktivierungsmuster (43/57) (Abb. 4; Wimplinger et al. 2007a). Die Tatsache, dass sie kein Allel von 286 Bp aufweist, unterstützt zudem das Ergebnis der Haplotyp-Analyse, wonach sich die Deletion bei der Mutter der Patientin auf dem paternalen X-Chromosom ereignet hat.

Eine Mutter-Tochter-Vererbung des MLS-Syndroms, wie sie auch in dieser Arbeit berichtet wird, wurde zuvor bereits viermal beschrieben (Allanson und Richter 1991, Lindsay et al. 1994, Mücke et al. 1995, Wimplinger et al. 2006). Die hohe intrafamiliäre Variabilität des Phänotyps, die für das MLS-Syndrom so charakteristisch ist, wird dabei durch jedes dieser Mutter-Tochter-Paare auf individuelle Weise reflektiert. In einem Fall zeigten Mutter und Tochter deutliche, jedoch variable Merkmale des MLS-Syndroms (Mücke et al. 1995). Demgegenüber lagen bei den Müttern zweier Patientinnen sehr milde MLS-Manifestationen bzw. keinerlei klinische Auffälligkeiten vor, obwohl sie jeweils die gleiche genetische Veränderung aufwiesen wie ihre schwer von MLS betroffenen Töchter. Einen Hinweis auf ein somatisches Mosaik gab es bei diesen Müttern nicht (Allanson und Richter 1991, Wimplinger et al. 2006). Wird bei einer genetischen Erkrankung ein variabler Phänotyp beobachtet, könnte dies grundsätzlich durch das Vorliegen einer zweiten („gesunden“) Zelllinie erklärt werden. Jedoch wird gerade bei weiblichen Individuen mit einer X-chromosomal dominant vererbten Krankheit die X-Inaktivierung im Zusammenhang mit der variablen Expressivität diskutiert (Lindsay et al. 1994, Van den Veyver 2001, Franco und Ballabio 2006, Happle 2006).

Bei der X-Inaktivierung handelt es sich um einen epigenetischen Mechanismus, der in Säugetierzellen zu einer Dosiskompensation X-chromosomaler Gene führt, indem während des Blastozysten-Stadiums in jeder weiblichen Zelle per Zufall das paternale oder das maternale X-Chromosom transkriptionell inaktiviert wird. Dabei unterliegen jedoch nur ca. 85% der X-chromosomalen Gene der Inaktivierung, während die restlichen 15% der Methylierung überwiegend entgehen und daher autosomalen Genen entsprechend biallelisch exprimiert werden (Carrel und Willard 2005). Experimenten mit somatischen Hybridzelllinien zufolge scheint das *HCCS*-Gen der X-Inaktivierung zu unterliegen (Carrel und Willard 2005). Vorausgesetzt, dass dies tatsächlich die Situation in menschlichen Geweben widerspiegelt, führt dies wahrscheinlich dazu, dass weibliche Embryos, die heterozygot für eine mit dem MLS-Syndrom assoziierte Mutation sind, nach der Festlegung des X-Inaktivierungsmusters in der frühen Blastozyste zwei funktionell unterschiedliche Zelllinien aufweisen. Dabei

handelt es sich zum einen um Zellen mit einem aktiven Wildtyp-X-Chromosom und zum anderen um solche, die für *HCCS* funktionell nullisom sind, da hier das Wildtyp-X-Chromosom inaktiviert vorliegt.

Beim MLS-Syndrom sind im Wesentlichen zwei unterschiedliche aufeinanderfolgende Mechanismen denkbar, die zu einer einseitigen Inaktivierung des mutierten X-Chromosoms in den betroffenen Geweben und somit zu einem milden Phänotyp führen könnten. So werden stochastische Effekte im Zusammenhang mit einem verschobenen X-Inaktivierungsmuster diskutiert (Van den Veyver 2001, Amos-Landgraf et al. 2006, Migeon 2007). Wie bereits erwähnt, erfolgt in der frühen Embryonalentwicklung die Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen in jeder Zelle zufällig und unabhängig. Zum Zeitpunkt der Festlegung des X-Inaktivierungsmusters während des frühen Blastozysten-Stadiums liegen Schätzungen zufolge in der inneren Zellmasse, aus der im Verlauf der weiteren Entwicklung der Embryo entsteht, nur zwischen 8 und 16 Zellen vor (Amos-Landgraf et al. 2006). Da es sich also um eine relativ geringe Anzahl von Vorläuferzellen handelt, ist die Wahrscheinlichkeit, dass per Zufall in jeder Zelle das gleiche X-Chromosom inaktiviert wird, relativ hoch. Zusätzlich würde jeglicher Prozess, der zum Verlust einzelner Vorläuferzellen führt, die Wahrscheinlichkeit für ein verschobenes X-Inaktivierungsmuster im heranwachsenden Embryo erhöhen (Brown und Robinson 2000). Wird also postnatal in einem Gewebe eine einseitige X-Inaktivierung beobachtet, könnte dies auch eine Art Flaschenhals innerhalb des embryonalen Vorläuferzellpools repräsentieren (Brown und Robinson 2000). Einer Studie von Amos-Landgraf und Kollegen (2006) zufolge zeigten 29 (5%) von 590 untersuchten gesunden weiblichen Neugeborenen in Zellen des Nabelschnurbluts ein verschobenes X-Inaktivierungsmuster von >80:20, wobei nur eines (0,2%) davon ein Verhältnis von >95:5 aufwies. Dies deutet darauf hin, dass stochastische Effekte bei der Festlegung des X-Inaktivierungsmusters eine gewisse Rolle spielen könnten.

Stochastische Effekte können somit primär zu einem verschobenen X-Inaktivierungsmuster in embryonalen Geweben führen. Hinzu kommt jedoch, dass nach der Festlegung des individuellen X-Inaktivierungsmusters in der frühen Blastozyste das Fehlen eines zellautonomen Genprodukts, wie z.B. der Holocytochrom *c*-Typ-Synthase, wahrscheinlich einen negativen Selektionsdruck zur Folge hat (Brown und Robinson 2000, Van den Veyver 2001, Migeon 2007), dem *HCCS*-defiziente Zellen aufgrund ihres schweren Atmungskettendefekts ausgesetzt sind. Dieser Selektionsdruck führt im Verlauf der weiteren Entwicklung vermutlich zum Verlust der den Atmungsdefekt aufweisenden Zellpopulation und trägt somit ebenfalls zu einem verschobenen X-Inaktivierungsmuster in unterschiedlichen Organen bei (Van den Veyver 2001, Dobyns 2006). Es kann derzeit nur darüber spekuliert werden, ob das Ausmaß der negativen Selektion in den einzelnen

Gewebe von heterozygoten weiblichen Embryos variiert und somit an der variablen Expressivität des MLS-Syndroms beteiligt ist.

Im Forschungsbericht 1 wurde die Hypothese aufgestellt, dass *HCCS*-defiziente Zellen möglicherweise durch nekrotisches Zellsterben zugrunde gehen und im Zuge dessen gesundes, benachbartes Gewebe durch inflammatorische Prozesse geschädigt wird. Für diese Vermutung sprechen die Hautläsionen entlang der Blaschko-Linien bei vielen Neugeborenen mit MLS. Sie lassen möglicherweise darauf schließen, dass *HCCS*-defiziente Zellen nicht unmittelbar nach der Festlegung des X-Inaktivierungsmusters sterben, sondern im Laufe der Embryonalentwicklung länger überleben können und ihr Zelltod somit erst später Schaden anrichtet. Im Gegensatz dazu weisen alle Frauen, die für eine mit MLS assoziierte Mutation heterozygot sind, unabhängig von der Schwere des Phänotyps, ein verschobenes X-Inaktivierungsmuster in Blutzellen auf (Ogata et al. 1998 und darin zitierte Referenzen, Anguiano et al. 2003, Wimplinger et al. 2006, Cain et al. 2007, Schluth et al. 2007). Dies deutet darauf hin, dass der Selektionsdruck und somit die Lebensdauer von *HCCS*-defizienten Zellen vom Gewebetyp abhängig sein könnte (Lindsay et al. 1994, Franco und Ballabio 2006). Tatsächlich scheinen gewebsspezifische und auf bestimmte Entwicklungsstadien begrenzte Zellselektionsmechanismen bei weiblichen Mäusen, die eine heterozygote Deletion im *Atrx*-Gen aufweisen, zu einem einseitigen X-Inaktivierungsmuster zu führen (Muers et al. 2007). Mutationen in dem humanen Ortholog *ATRX* sind mit einer syndromischen Form der X-chromosomalen mentalen Retardierung (ATR-X-Syndrom) assoziiert (Gibbons et al. 1995). Es ist daher vorstellbar, dass auch die Selektion *ATRX*-defizienter Zellen beim Menschen nicht kontinuierlich und unterschiedslos in den verschiedenen Gewebstypen erfolgt. Allerdings ist derzeit unklar, inwieweit diese Beobachtung auf *HCCS*-defiziente Zellen in den unterschiedlichen Gewebeverbänden übertragbar ist.

Neben stochastischen Effekten bei der X-Inaktivierung und den das X-Inaktivierungsmuster beeinflussenden Zellselektionsmechanismen könnte auch das Vorhandensein eines Mosaiks für eine milde bzw. Nichtausprägung des MLS-Syndroms verantwortlich sein. So weist die hier beschriebene Mutter, im Gegensatz zu ihrer schwer von MLS betroffenen Tochter, den Karyotyp 45,X[11]/46,X,del(X)(p22.2)[89] und somit ein chromosomales Mosaik auf. Damit zeigt dieser Fall Parallelen zu der von Lindsay und Kollegen (1994) beschriebenen Patientin 2, bei der ebenfalls ein 45,X/46,X,del(X)(p22.2)-Karyotyp identifiziert wurde, wobei bei ihr ca. 20% der analysierten Metaphasen den Karyotyp 45,X aufwiesen. Phänotypisch waren auch bei der Patientin 2 dezente Zeichen eines Turner-Syndroms, wie Kleinwuchs, zu beobachten. Sehr wahrscheinlich ist der Kleinwuchs beider Frauen auf die in beiden Zelllinien vorliegende Haploinsuffizienz des *SHOX*-Gens zurück zu führen (Rao et al. 1997). Als einziges Zeichen eines MLS-Syndroms wies die Patientin 2 nuchale retikuläre Vernar-

bungen auf, die seit der Geburt bestanden. Die Augen waren bis auf eine angedeutete, klinisch irrelevante Y-förmige Katarakt der Linse unauffällig. Da die Patientin 2 und die hier beschriebene Mutter einen vergleichbaren Karyotyp und Phänotyp zeigen, ist grundsätzlich vorstellbar, dass das - vermutlich postzygotische - Auftreten einer 45,X-Zelllinie bei ihnen zu einem milden bzw. fehlenden MLS-Phänotyp beigetragen haben könnte. Dennoch muß festgehalten werden, dass das Vorhandensein einer zweiten Zelllinie für die Entstehung eines milden MLS-Phänotyps offensichtlich nicht zwingend ist, da zwei Frauen, die eine mit MLS assoziierte Mutation konstitutionell aufwiesen, ebenfalls phänotypisch unauffällig waren (Allanson und Richter 1991, Wimplinger et al. 2006). Hinzu kommt die Beschreibung einer weiteren Patientin, die den Karyotyp 45,X[18]/46,X,r(X)(p22q21)[24]/46,X,del(X)(p22)[58] bei Vorliegen des klassischen MLS-Phänotyps aufwies (Ogata et al. 1998). Auch wenn der anhand von kultivierten Lymphozyten bestimmte Anteil der 45,X-Zelllinie nicht unbedingt der Situation *in vivo* entspricht, deutet dies darauf hin, dass die Anwesenheit einer 45,X-Zelllinie nicht in allen Fällen zu einem milden Phänotyp führt. Wahrscheinlich ist dabei sowohl der Zeitpunkt, zu dem das Mosaik entsteht, als auch der Zelltyp, in welchem sich der Verlust des derivativen X-Chromosoms ereignet, für die Ausprägung des Phänotyps entscheidend.

Zusammenfassend sind daher mindestens drei Mechanismen denkbar, die zu einer variablen Ausprägung des MLS-Phänotyps führen. So könnte der Phänotyp erstens durch stochastische Effekte während der Festlegung des X-Inaktivierungsmusters in der weiblichen Blastozyste beeinflusst werden. Zweitens könnten Unterschiede in gewebsspezifischen Zellselektionsmechanismen den Phänotyp ebenfalls modulieren. Schließlich könnte auch das Vorliegen einer weiteren Zelllinie eine Erklärung für die variable Expressivität des MLS-Syndroms sein. Inwieweit diese Mechanismen Einfluss auf den MLS-Phänotyp ausüben bzw. in welchem Ausmaß sich die Wirkungen dieser Mechanismen addieren, wird in Zukunft gezeigt werden müssen.

3. Isabella Wimplinger, Gary M. Shaw, Kerstin Kutsche

***HCCS* loss-of-function missense mutation in a female with bilateral microphthalmia and sclerocornea: a novel gene for severe ocular malformations? (2007)**

Molecular Vision 13: 1475-82

Nachdem Mutationen in *HCCS* bei Patientinnen mit MLS und einem breiten phänotypischen Spektrum nachgewiesen worden waren, stellten wir die Hypothese auf, dass Mutationen in diesem Gen auch bei Patientinnen mit Augenfehlbildungen vorkommen könnten, die keine Hautdefekte zeigen. Aus diesem Grund wurde eine Mutationsanalyse des *HCCS*-Gens bei Patienten aus einem Kollektiv, bestehend aus 27 weiblichen Neugeborenen mit bilateraler Mikrophthalmie bzw. Anophthalmie, durchgeführt. Wir detektierten eine heterozygote Missense-Mutation, p.E159K, bei einer Patientin mit bilateraler Mikrophthalmie und Sklerocornea. Diese Mutation wurde in mehr als 200 weiblichen Kontrollpersonen nicht gefunden. In den peripheren Blutzellen der Patientin fand sich ein verschobenes X-Inaktivierungsmuster. Um zu analysieren, wie sich die p.E159K-Mutation auf die subzelluläre Lokalisation des *HCCS*-Proteins auswirkt, wurde das mit einem HA-Epitop versehene mutante *HCCS*-Protein in CHO-K1-Zellen exprimiert. Dabei ergab sich sowohl für das mutante wie auch für das *HCCS*-Wildtyp-Protein eine mitochondriale Lokalisation. Im Hefekomplementations-Assay zeigte sich jedoch, dass das die p.E159K-Mutation tragende *HCCS*-Protein nicht in der Lage war, die gestörte Atmungskettenfunktion des *CYC3*-defizienten Hefestammes zu komplementieren. Die Identifizierung dieser mit hoher Wahrscheinlichkeit pathogenen Missense-Mutation in *HCCS* bei einem Mädchen mit Mikrophthalmie und Sklerocornea lässt also vermuten, dass *HCCS* ein Kandidatengen für schwere isolierte okuläre Fehlbildungen sein könnte.

Die in diesem Forschungsprojekt durchgeführte molekulargenetische Charakterisierung einer Patientin mit isolierten Augenfehlbildungen basiert auf einer wissenschaftlichen Zusammenarbeit zwischen Prof. Dr. Kerstin Kutsche und Isabella Wimplinger (Institut für Humangenetik, Hamburg-Eppendorf) sowie Dr. Gary M. Shaw (California Birth Defects Monitoring Program, Berkeley, California, USA). Dr. Shaw wählte die DNAs aus seinem Patientenkollektiv aus und stellte sie für die hier beschriebenen Untersuchungen zur Verfügung.

Für die Entwicklung des Auges ist die Expression so genannter Master-Kontrollgene, wie *PAX6*, *SOX2*, *RX* und *OTX2*, von zentraler Bedeutung. Diese Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren, die in ein regulatorisches und sehr komplexes genetisches Netzwerk eingebunden sind (Graw 2003, Hever et al. 2006). Mutationen in diesen Genen können zu schweren Augenfehlbildungen, wie Aniridie, Kolobom und Mikrophthalmie, führen (Graw

2003, Hever et al. 2006). Patienten mit dem MLS-Syndrom weisen häufig ebenfalls okuläre Fehlbildungen auf, zu denen die Mikrophthalmie, aber auch die Sklerocornea und die Katarakt zählen (Van den Veyver 2002). Aufgrund der erheblichen Variabilität des MLS-Phänotyps ist grundsätzlich nicht auszuschließen, dass Patienten lediglich Augenfehlbildungen und keine Hautsymptomatik zeigen. Daher stellten wir die Hypothese auf, dass Mutationen im *HCCS*-Gen nicht nur mit einer syndromischen, sondern auch mit isoliert vorliegenden Augenfehlbildungen assoziiert sein könnten.

Für die Mutationsanalyse des *HCCS*-Gens standen mir Blutproben in Form von Guthrie-Kärtchen zur Verfügung, die im Rahmen einer Reihenuntersuchung auf angeborene Fehlbildungen, darunter auch Anophthalmie und bilaterale Mikrophthalmie, abgenommen worden waren. Die Studie erfasste die von 1988 bis 1997 in Kalifornien lebend oder tot geborenen Kinder, die nach der 19. Schwangerschaftswoche zur Welt gekommen waren, wobei in diesem Untersuchungszeitraum mehr als 2,5 Millionen Geburten in Kalifornien erfasst worden waren. Unter diesen fanden sich 100 männliche und weibliche Neugeborene mit einer Anophthalmie (n = 45) bzw. einer bilateralen Mikrophthalmie (n = 55). In der genannten Studie wurde ausschließlich über Individuen mit unauffälligem Karyotyp berichtet. Die ophthalmologische Untersuchung beinhaltete die Untersuchung mit einer Spaltlampe, die Messung des Augeninnendrucks (IOP) durch Applanations-Tonometrie, die Gonioskopie des vorderen Kammerwinkels und die Gesichtsfeldmessung durch Verwendung eines automatischen Sehfeldanalyse-Geräts (Shaw et al. 2005).

Für die durchzuführende Mutationsanalyse in *HCCS* wurden 27 Patientinnen aus diesem Kollektiv ausgewählt. Bei neun dieser Patientinnen lagen isolierte Augenfehlbildungen vor, während 18 Patientinnen eine syndromische Form einer Augenfehlbildung aufwiesen. Weitere phänotypische Einzelheiten sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Patientinnen mit bilateraler Mikrophthalmie bzw. Anophthalmie		
A	Isolierte Form (mit evtl. zusätzlichen Augenfehlbildungen)	n
	Katarakt	1
	Aplasie des Nervus opticus	1
	Sklerocornea	2
	Keine weiteren Augenfehlbildungen	5
	Gesamtzahl	9
B	Syndromische Form (zusätzliche Organfehlbildungen)	n
	Agenesie des Corpus callosum	3
	Herzfehler	5
	Herz- und Gehirnefehlbildung	8
	Andere Fehlbildungen	2
	Gesamtzahl	18

Tab. 1: Übersicht über zusätzlich vorliegende phänotypische Merkmale bei den 27 ausgewählten Patientinnen mit bilateraler Mikrophthalmie bzw. Anophthalmie

In **(A)** sind die zusätzlichen Augenfehlbildungen bei Patientinnen mit einer isolierten Form der Mikrophthalmie bzw. Anophthalmie zusammengefasst. In **(B)** sind zusätzlich vorliegende Organmanifestationen bei Patientinnen mit einer Mikrophthalmie bzw. Anophthalmie aufgelistet. Die Anzahl (n) der Patientinnen, die ein bestimmtes Merkmal aufweisen, ist in der Tabelle ebenfalls angegeben.

Es lagen mir von allen Patientinnen (BE-1 bis BE-27) Guthrie-Kärtchen vor, aus denen ich DNA isolierte. Da sich herausstellte, dass diese DNAs für PCR-Reaktionen zu niedrig konzentriert waren, vermehrte ich sie mithilfe der Phi-Polymerase. Mit den auf diese Weise erhaltenen DNAs als Matrize amplifizierte ich zunächst außer der Kodierregion des *HCCS*-Gens (Exons 2 bis 7) auch angrenzende intronische Sequenzen durch PCR und führte nachfolgend eine Sequenzierung der erhaltenen Amplikons durch. Bei der Auswertung der Sequenzen konnte ich bei der Patientin BE-18 im Exon 5 des *HCCS*-Gens, an der Position 475 der Kodierregion, einen heterozygoten Austausch von Guanin nach Adenin identifizieren (c.475G>A). Für diese Mutation wird an der Position 159 der *HCCS*-Aminosäurekette die Substitution von Glutamat nach Lysin (p.E159K) vorhergesagt, weshalb es sich bei dem gefundenen Austausch vermutlich um eine Missense-Mutation handelt (Abb. 1A; Wimplinger et al. 2007b). Bei der Patientin BE-18 lagen eine bilaterale Mikrophthalmie und Sklerocornea vor, die bei ihr im Alter von einer Woche diagnostiziert worden waren. Fehlbildungen anderer Organsysteme wurden bei der Patientin zu diesem Zeitpunkt nicht festgestellt.

Da es sich bei dem gefundenen Austausch um einen SNP handeln könnte, recherchierte ich in den Datenbanken von NCBI und ENSEMBL, wobei sich herausstellte, dass dieser Austausch nicht verzeichnet war. Um zu analysieren, ob die genetische Veränderung der Patientin BE-18 bei Kontrollpersonen vorkommt, untersuchte ich 234 weibliche DNAs auf das Vorliegen des c.475G>A-Austauschs. Dazu amplifizierte ich das *HCCS*-Exon 5 aus den genomischen DNAs und unterzog die PCR-Produkte einer SSCP-Analyse, wobei ich die Veränderung bei keiner Kontrollperson nachweisen konnte. Dies führte mich zu der Annahme, dass die gefundene Missense-Mutation mit den Augenfehlbildungen der Patientin BE-18 assoziiert sein könnte. Da mir DNA-Proben der Eltern der Patientin BE-18 nicht zur Verfügung standen, war es nicht möglich zu bestimmen, ob der c.475G>A-Austausch bei der Patientin *de novo* vorlag.

Bei fast allen beschriebenen Patientinnen mit MLS, die eine partielle Monosomie in Xp22.2 oder eine Mutation in *HCCS* aufweisen, wurde ein verschobenes X-Inaktivierungsmuster in peripheren Blutzellen nachgewiesen. Um das X-Inaktivierungsmuster bei der Patientin BE-18 zu bestimmen, führte ich eine methylierungssensitive PCR am X-chromosomalen *AR*-Lokus durch (siehe S. 18, Abb. 5), wobei ich die Original-DNA einsetzte. Auf diese Weise konnte ich bei der Patientin BE-18 ein verschobenes X-Inaktivierungsmuster (8/92) in peripheren Leukozyten nachweisen (Abb. 1B; Wimplinger et al. 2007b).

Der nächste Schritt bestand darin, die Auswirkungen der Missense-Mutation auf die Enzymaktivität von *HCCS* durch funktionelle Studien zu überprüfen. Wie bereits erwähnt, weist das *HCCS*-Protein von Aminosäureposition 151 bis 169 und 190 bis 216 zwei interne „targeting“-Motive auf, die für den mitochondrialen Transport von *HCCS* essentiell sind (Diekert et al. 1999). Die Missense-Mutation c.475G>A betrifft den in der Evolution

hochkonservierten Glutamat-Rest an der Position 159 der HCCS-Aminosäuresequenz, welcher innerhalb des ersten „targeting“-Motivs lokalisiert ist (Abb. 1C; Wimplinger et al. 2007b). Um zu untersuchen, ob der Transport des mutanten Proteins ins Mitochondrium beeinträchtigt ist, führte ich Immunfluoreszenz-Experimente durch, mithilfe derer ich die subzelluläre Lokalisation des mutanten HCCS-Proteins mit der des Wildtyp-Proteins verglich. Dazu klonierte ich, wie im Forschungsbericht 1 beschrieben, die Kodierregion *HCCS-E159K* in den eukaryotischen Expressionsvektor pMT2SM-HA-DEST. Das *HCCS-WT*-Konstrukt lag mir bereits vor (siehe S. 16). Auch hier wurden durch die Gateway-Technologie noch weitere *HCCS-E159K*-Konstrukte erzeugt, mithilfe derer HCCS-Fusionsproteine exprimiert werden können, die eine N- oder C-terminale EGFP-Markierung bzw. ein C-terminales V5-Epitop aufweisen. Alle Konstrukte wurden von mir durch Sequenzierung überprüft und nachfolgend in CHO-K1-Zellen transfiziert. Wie bereits im Forschungsbericht 1 beschrieben, inkubierte ich die Zellen mit „MitoTracker“ und fixierte sie nachfolgend. Ich detektierte die HA-markierten HCCS-Fusionsproteine mit einem gegen HA gerichteten Fluorescein-gekoppelten Antikörper und wertete die Zellpräparate anschließend unter dem Konfokalmikroskop aus. Wie das HCCS-Wildtyp-Protein (Abb. 2A-C; Wimplinger et al. 2007b) war auch das mutante HCCS-Protein in den Mitochondrien lokalisiert (Abb. 2D-F; Wimplinger et al. 2007b). Diese Beobachtung machte ich unabhängig davon, welches Epitop jeweils an das mutierte HCCS-Protein angefügt worden war. Aus diesen Ergebnissen folgerte ich, dass der nicht-konservative Aminosäureaustausch an der Position 159 des HCCS-Proteins von Glutamat nach Lysin zu keiner veränderten subzellulären Lokalisation des Proteins führt. Dies erschien zunächst unerwartet, denn während das saure Glutamat negativ geladen ist, handelt es sich bei Lysin um eine basische, also positiv geladene Aminosäure. Die „targeting“-Sequenzen der Holocytochrom *c*-Typ-Synthase sind sehr hydrophil, da sie zu etwa 30% aus geladenen Aminosäureresten bestehen. Positiv und negativ geladene Aminosäurereste sind dabei zu etwa gleichen Anteilen vertreten. Da aber sowohl Glutamat als auch Lysin zu den stark polaren Aminosäuren zählen, könnte dies eine Erklärung dafür sein, dass das mutante HCCS-Protein sein Zielkompartiment, den mitochondrialen Intermembranraum, erreicht. Dies legt nahe, dass eher die Gesamtzahl der polaren Aminosäuren innerhalb der „targeting“-Sequenz für die korrekte Lokalisation des HCCS-Proteins wesentlich ist als die physikochemischen Eigenschaften einzelner Aminosäuren.

Um den Einfluss der Missense-Mutation p.E159K auf die enzymatische Aktivität der Hämlyase zu untersuchen, benutzte ich den bereits beschriebenen Hefekomplementations-Assay (siehe S. 15 und Abb. 4). Dazu klonierte ich, wie bereits beschrieben, die Kodierregion *HCCS-E159K* in den Hefeexpressionsvektor pYEX4Tps. Das *HCCS-WT*- und das *CYC3*-Konstrukt lagen mir bereits vor (siehe S. 16). Nachdem ich das *HCCS-E159K*-Konstrukt durch Sequenzierung überprüft hatte, transformierte ich es in den Hefestamm B-8025. Von

Hefezellen, die das HCCS-Wildtyp- bzw. das Cyc3p-Protein exprimierten, besaß ich bereits archiviertes Ausgangsmaterial, das ich erneut kultivierte. Die Hefen wurden von mir in Glucose-haltigem Selektionsmedium angezüchtet, wobei ich einen Teil der Flüssigkultur dazu verwendete, um Proteinlysate herzustellen. Diese benötigte ich, um die Expression der GST-Fusionsproteine mithilfe eines gegen GST gerichteten, HRP-gekoppelten Antikörpers zu überprüfen. In einer nachfolgenden Western-Blot-Analyse konnte ich die Expression aller GST-Fusionsproteine (HCCS-E159K, HCCS-WT und Cyc3p) nachweisen (Abb. 3B; Wimplinger et al. 2007b). Die restliche Kultur benutzte ich dazu, um die Wachstumseigenschaften der verschiedenen Transformanden auf Glycerol-haltigem Agar zu testen. Nach einigen Tagen der Bebrütung der Platten bei 30°C stellte ich fest, dass Hefen, die Cyc3p bzw. humanes HCCS-Wildtyp-Protein exprimierten, erwartungsgemäß Kolonien bildeten. Demgegenüber bildeten Hefen, die das HCCS-E159K-Protein exprimierten, auf Glycerol-haltigem Agar keine Kolonien (Abb. 3A; Wimplinger et al. 2007b). Da das HCCS-E159K-Protein den Hämlyase-Enzymdefekt des *CYC3*-defizienten Hefestamms nicht komplementieren konnte, schloß ich, dass dieses mutierte *HCCS*-Genprodukt seine Funktion innerhalb der Cytochrom *c*-Biosynthese wahrscheinlich nicht mehr ausüben kann. Daher ist die Missense-Mutation p.E159K sehr wahrscheinlich mit den schweren Augenfehlbildungen der Patientin BE-18 assoziiert.

Der Befund, dass die beschriebene Patientin BE-18 eine angeborene bilaterale Mikrophthalmie und Sklerocornea und somit isolierte Augenfehlbildungen (siehe S. 36; Tab. 1A) aufwies, deutet darauf hin, dass Mutationen in *HCCS* nicht immer zum klassischen MLS-Phänotyp führen. Allerdings muss angemerkt werden, dass die kalifornische Studie die Anamnesen der Kinder nur bis zum ersten Lebensjahr erfasste (Shaw et al. 2005). Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Patientin BE-18, ähnlich der zuvor beschriebenen Patientin MS2 (siehe S. 13), zu einem späteren Zeitpunkt zusätzliche fakultative Symptome des MLS-Syndroms (wie z.B. eine Kardiomyopathie oder epileptische Anfälle) entwickelt hat. Es wurden bereits Patientinnen beschrieben, die bei Vorliegen einer mit MLS assoziierten Mutation ausschließlich Augenfehlbildungen aufwiesen. So berichteten Cape und Kollegen (2004) von einer Neugeborenen mit dem Karyotyp 46,X,der(X)t(X;Y)(p22.3;q11.2), die eine bilaterale Sklerocornea sowie eine partielle Aniridie des linken Auges zeigte. Im Forschungsbericht 1 wurden zwei Schwestern mit einer Teile des *HCCS*-Gens umfassenden heterozygoten Mikrodeletion und variablem MLS-Phänotyp beschrieben (siehe S. 10), wobei das ältere der Geschwister lediglich auf dem linken Auge eine Trübung der Hornhaut, ein angeborenes Glaukom mit vollständiger vorderer Synechie sowie eine vordere Katarakt aufwies. Insgesamt stützt die hier durchgeführte Mutationsanalyse die Vermutung, dass Punktmutationen im *HCCS*-Gen auch mit isolierten Augenfehlbildungen assoziiert sein können. Allerdings muss angemerkt werden, dass die

hier untersuchten Patientinnen so ausgewählt waren, dass sie phänotypisch ins MLS-Spektrum passten (siehe S. 36; Tab. 1), wobei jedoch keine der Patientinnen eine dermale Aplasie zeigte. Weshalb lediglich bei einer der Patientinnen eine Mutation im *HCCS*-Gen nachgewiesen werden konnte, kann mehrere Gründe haben.

Zunächst wird für die isolierte Form der Mikrophthalmie eine ausgeprägte Lokus-Heterogenität beobachtet. So können Mutationen im *CRYBA4*-Gen, das für eines der β -Crystalline kodiert, zu Mikrophthalmie und Katarakt führen (Billingsley et al. 2006). Mutationen in *MFRP* sind mit Mikrophthalmie, Retinitis pigmentosa, Foveoschisis und Papillendrusen assoziiert (Ayala-Ramirez et al. 2006). Wie bereits erwähnt, wurden auch in Genen, die für Transkriptionsfaktoren kodieren, wie *CHX10*, *OTX2* und *PAX6*, Mutationen bei Patienten nachgewiesen, die ausschließlich Augenfehlbildungen wie Mikrophthalmie, Katarakt und Sklerocornea aufwiesen (Ferda Percin et al. 2000, Ragge et al. 2005a, Dansault et al. 2007). Es ist deshalb denkbar, dass die hier untersuchten Patientinnen mit isolierten Augenfehlbildungen (siehe S. 36; Tab. 1A), bei denen keine Mutation in *HCCS* detektiert werden konnte, eine Mutation in einem der oben genannten Gene haben.

Wie im Forschungsbericht 1 ausführlich dargestellt wurde, ist das durch HCCS synthetisierte Cytochrom *c* an der oxidativen Phosphorylierung und an apoptotischen Prozessen beteiligt. HCCS selbst wirkt als Interaktionspartner von XIAP pro-apoptotisch und ist somit in völlig andere zelluläre Funktionen involviert als alle anderen Genprodukte, die im Zusammenhang mit isolierten und/oder syndromalen Formen der Mikrophthalmie stehen (Tabelle 2).

Gen	Proteinfunktion	Phänotyp	OMIM	Referenz
<i>BCOR</i>	Repressor der Transkription	OFCD-Syndrom (MCOPS-2) Lenz-Mikrophthalmie-Syndrom (MCOPS-1)	300166 309800	Ng et al. 2004
<i>CHX10</i>	Transkriptionsfaktor	MCOPCB-3 MCOP-2	610092 610093	Ferda Percin et al. 2000 Bar-Yosef et al. 2004
<i>CRYBA4</i>	Strukturprotein der Linse (β -Crystallin)	MCOPCT-4	610426	Billingsley et al. 2006
<i>HCCS</i>	Cytochrom c-Biosynthese, pro-apoptotische Wirkung	MLS-Syndrom (MCOPS-7)	309801	Wimplinger et al. 2006
<i>MFRP</i>	Transmembranprotein	Mikrophthalmie, Retinitis pigmentosa, Foveoschisis, Papillendrusen	611040	Ayala-Ramirez et al. 2006
<i>NHS</i>	Ausbildung von Zell-Zell-Verbindungen zwischen Epithelzellen („tight junctions“)	Nance-Horan-Syndrom	302350	Burdon et al. 2003
<i>PAX6</i>	Transkriptionsfaktor	Aniridie Typ II Mikrophthalmie	106210 -	Ton et al. 1991 Dansault et al. 2007
<i>PORCN</i>	Sekretion von Wnt-Proteinen	Goltz-Gorlin-Syndrom	305600	Wang et al. 2007, Grzeschik et al. 2007
<i>OTX2</i>	Transkriptionsfaktor	MCOPS-5	610125	Ragge et al. 2005a
<i>SOX2</i>	Transkriptionsfaktor	Mikrophthalmie, Kolobom AEG-Syndrom (MCOPS-3)	- 209600	Fantes et al. 2003, Ragge et al. 2005b Williamson et al. 2006, Kelberman et al. 2006
<i>STRA6</i>	Zelluläre Vitamin A-Aufnahme	Matthew-Wood-Syndrom (MCOPS-9)	601186	Pasutto et al. 2007, Golzio et al. 2007

Tab. 2: Übersicht über die zellulären Funktionen von Genprodukten, die an der Entstehung von syndromalen und isolierten Formen der Mikrophthalmie beteiligt sind

Die unterschiedlichen Formen der syndromalen Mikrophthalmie sind entweder durch Nummerierung gekennzeichnet oder mit einem individuellen Namen bezeichnet. Bei einigen Formen der isolierten Mikrophthalmie sind anstelle der nummerierten Bezeichnung derzeit lediglich die phänotypischen Merkmale, die mit Mutationen in den entsprechenden Genen assoziiert sind, in der Datenbank von NCBI angegeben. AEG-Syndrom, Anophthalmie-ösophageales-genitales-Syndrom; MCOP, „microphthalmia, isolated“ (isolierte Form der Mikrophthalmie); MCOPCB, „microphthalmia, isolated, with coloboma“ (isolierte Mikrophthalmie mit Kolobom); MCOPCT, „microphthalmia, isolated with cataract“ (isolierte Mikrophthalmie mit Katarakt); MCOPS, „microphthalmia, syndromic“ (syndromale Form der Mikrophthalmie); OFCD-Syndrom, okuläres-faziales-kardiales-dentales-Syndrom.

Dies lässt vermuten, dass strukturelle Augenfehlbildungen auf die Störung unterschiedlicher zellulärer Prozesse zurückzuführen sind. Wie auch aus der Tabelle 2 hervorgeht, kodiert der Großteil der bislang bekannten Gene, in denen Mutationen zu einer isolierten oder syndromalen Mikrophthalmie führen, für an der Transkriptionsregulation beteiligte Proteine. HCCS stellt somit das einzige, bislang bekannte mitochondriale Haushaltsenzym dar, bei dem Funktionsverlust-Mutationen mit einer Augenfehlbildung assoziiert sind.

Neben der Lokus-Heterogenität gibt es weitere Gründe, die eine Erklärung dafür darstellen könnten, dass in der Mehrzahl der hier untersuchten DNA-Proben keine Mutation in *HCCS* identifiziert werden konnte. So wurden für die Mutationsanalyse nur die Kodierregion des *HCCS*-Gens (Exons 2 bis 7) und angrenzende intronische Sequenzen durch PCR amplifiziert und sequenziert. Auf diese Weise können jedoch nicht alle *HCCS*-Mutationen ausgeschlossen werden, da es z.B. vorstellbar ist, dass Patientinnen des hier untersuchten Kollektivs Exon-übergreifende Duplikationen, Deletionen, das Spleißen verändernde Intron-Mutationen oder Inversionen des *HCCS*-Gens aufweisen. Auch eine Mutation in einem

regulatorischen Element, das für die korrekte zeitliche und örtliche Expression des *HCCS*-Gens notwendig ist, wäre vorstellbar.

Es ist allerdings auch durchaus möglich, dass in dem untersuchten Kollektiv ausschließlich die Patientin BE-18 eine Mutation im *HCCS*-Gen aufweist, da Mutationen in diesem Gen mit einer hohen Letalität *in utero* verbunden und daher vermutlich selten sind. Generell wird für Frauen mit einer heterozygot vorliegenden Mutation, die zu einer X-chromosomalen Erkrankung führt, eine erhöhte Abortrate beschrieben (Van den Veyver 2001). Tatsächlich waren bei zwei zuvor beschriebenen Frauen, die heterozygot für eine mit MLS-assoziierte Mutation sind, mehrere Fehlgeburten bekannt (Wimplinger et al. 2006, Wimplinger et al. 2007a). Man nimmt an, dass hemizygot männliche Embryos, die eine mit MLS-assoziierte Mutation aufweisen, *in utero* absterben. Aber auch weibliche Neugeborene mit einer heterozygoten *HCCS*-Mutation werden nur sehr selten beobachtet, was nahe legt, dass auch solche Embryos u.U. vorgeburtlich versterben. Diese Vermutungen stehen in Einklang mit Erkenntnissen zum bereits erwähnten Mausmodell, wonach eine hemizygot vorliegende Deletion des murinen *Hccs*-Gens bei männlichen Embryos in allen Fällen zur Letalität *in utero* führt, aber auch heterozygote weibliche Tiere sind in der Mehrzahl der Fälle nicht lebensfähig (Prakash et al. 2002, Van den Veyver 2002).

Zusammenfassend ist anzunehmen, dass Mutationen in *HCCS*, insbesondere aufgrund der mit ihnen einhergehenden hohen Letalität *in utero*, aber auch aufgrund der Lokus-Heterogenität für die Mikrophthalmie, eher selten ursächlich für Augenfehlbildungen bei weiblichen Patientinnen sind. Für zukünftige Mutationsanalysen erscheint es daher sinnvoll, das X-Inaktivierungsmuster der Patienten in Blutzellen im Voraus zu bestimmen, da nach gegenwärtigem Kenntnisstand bei einer DNA-Probe, die ein zufälliges X-Inaktivierungsmuster zeigt, das Vorliegen einer pathogenen *HCCS*-Mutation nicht zu erwarten ist. Nichtsdestotrotz deutet das breite phänotypische Spektrum an Augenfehlbildungen bei den wenigen Patientinnen mit nachgewiesener *HCCS*-Mutation darauf hin (Wimplinger et al. 2006 und diese Arbeit), dass *HCCS* ein Kandidatengen für verschiedene okuläre Fehlbildungen ist.

LITERATURVERZEICHNIS

Al-Gazali LI, Mueller RF, Caine A, Dennis N, Antoniou A, Fitchett M, Insley J und Goodfellow PG (1988). An XX male and two t(X;Y) females with linear skin defects and congenital microphthalmia: a new syndrome at Xp22.3. *J Med Genet* 25:

Al-Gazali LI, Mueller RF, Caine A, Antoniou A, McCartney A, Fitchett M und Dennis NR (1990). Two 46,XX,t(X;Y) females with linear skin defects and congenital microphthalmia: a new syndrome at Xp22.3. *J Med Genet* 27:59-63

Allanson J und Richter S (1991). Linear skin defects and congenital microphthalmia: a new syndrome at Xp22.2. *J Med Genet* 28:143-4

Amos-Landgraf JM, Cottle A, Plenge RM, Friez M, Schwartz CE, Longshore J und Willard HF (2006). X chromosome-inactivation patterns of 1,005 phenotypically unaffected females. *Am J Hum Genet* 79:493-9

Andersson M, Honarvar A, Sjostrand J, Peterson A und Karlsson JO (2003). Decreased caspase-3 activity in human lens epithelium from posterior subcapsular cataracts. *Exp Eye Res* 76:175-82

Anguiano A, Yang X, Felix JK und Hoo JJ (2003). Twin brothers with MIDAS syndrome and XX karyotype. *Am J Med Genet A* 119:47-9

Ayala-Ramirez R, Graue-Wiechers F, Robredo V, Amato-Almanza M, Horta-Diez I und Zenteno JC (2006). A new autosomal recessive syndrome consisting of posterior microphthalmos, retinitis pigmentosa, foveoschisis, and optic disc drusen is caused by a MFRP gene mutation. *Mol Vis* 12:1483-9

Ballabio A (1995). MLS, Aicardi and Goltz syndromes: how many genes involved? *Am J Med Genet* 59:100

Bar-Yosef U, Abuellaish I, Harel T, Hendler N, Ofir R und Birk OS (2004). CHX10 mutations cause non-syndromic microphthalmia/ anophthalmia in Arab and Jewish kindreds. *Hum Genet* 115:302-9

Belmokhtar CA, Hillion J, Dudognon C, Fiorentino S, Flexor M, Lanotte M und Segal-Bendirdjian E (2003). Apoptosome-independent pathway for apoptosis. Biochemical analysis of APAF-1 defects and biological outcomes. *J Biol Chem* 278:29571-80

Billingsley G, Santhiya ST, Paterson AD, Ogata K, Wodak S, Hosseini SM, Manisastry SM, Vijayalakshmi P, Gopinath PM, Graw J und Heon E (2006). CRYBA4, a novel human cataract gene, is also involved in microphthalmia. *Am J Hum Genet* 79:702-9

Bird LM, Krous HF, Eichenfield LF, Swalwell CI und Jones MC (1994). Female infant with oncocyctic cardiomyopathy and microphthalmia with linear skin defects (MLS): a clue to the pathogenesis of oncocyctic cardiomyopathy? *Am J Med Genet* 53:141-8

Brown CJ und Robinson WP (2000). The causes and consequences of random and non-random X chromosome inactivation in humans. *Clin Genet* 58:353-63

Burdon KP, McKay JD, Sale MM, Russell-Eggitt IM, Mackey DA, Wirth MG, Elder JE, Nicoll A, Clarke MP, FitzGerald LM, Stankovich JM, Shaw MA, Sharma S, Gajovic S, Gruss P, Ross S, Thomas P, Voss AK, Thomas T, Gecz J und Craig JE (2003). Mutations in a novel gene, NHS, cause the pleiotropic effects of Nance-Horan syndrome, including severe congenital cataract, dental anomalies, and mental retardation. *Am J Hum Genet* 73:1120-30

Cain CC, Saul D, Attanasio L, Oehler E, Hamosh A, Blakemore K und Stetten G (2007). Microphthalmia with linear skin defects (MLS) syndrome evaluated by prenatal karyotyping, FISH and array comparative genomic hybridization. *Prenat Diagn* 27:373-9

Carelli V, Rugolo M, Sgarbi G, Ghelli A, Zanna C, Baracca A, Lenaz G, Napoli E, Martinuzzi A und Solaini G (2004). Bioenergetics shapes cellular death pathways in Leber's hereditary optic neuropathy: a model of mitochondrial neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta* 1658:172-9

Carrel L und Willard HF (2005). X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature* 434:400-4

Cecconi F, Alvarez-Bolado G, Meyer BI, Roth KA und Gruss P (1998). Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. *Cell* 94:727-37

Chautan M, Chazal G, Cecconi F, Gruss P und Golstein P (1999). Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway. *Curr Biol* 9:967-70

Cox TC, Cox LL und Ballabio A (1998). A very high density microsatellite map (1 STR/41 kb) of 1.7 Mb on Xp22 spanning the microphthalmia with linear skin defects (MLS) syndrome critical region. *Eur J Hum Genet* 6:406-12

Dansault A, David G, Schwartz C, Jaliffa C, Vieira V, de la Houssaye G, Bigot K, Catin F, Tattu L, Chopin C, Halimi P, Roche O, Van Regemorter N, Munier F, Schorderet D, Dufier JL, Marsac C, Ricquier D, Menasche M, Penfornis A und Abitbol M (2007). Three new PAX6 mutations including one causing an unusual ophthalmic phenotype associated with neurodevelopmental abnormalities. *Mol Vis* 13:511-23

De Falco F, Cainarca S, Andolfi G, Ferrentino R, Berti C, Rodriguez Criado G, Rittinger O, Dennis N, Odent S, Rastogi A, Liebelt J, Chitayat D, Winter R, Jawanda H, Ballabio A, Franco B und Meroni G (2003). X-linked Opitz syndrome: novel mutations in the MID1 gene and redefinition of the clinical spectrum. *Am J Med Genet A* 120:222-8

Denecker G, Vercammen D, Declercq W und Vandenaabeele P (2001). Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. *Cell Mol Life Sci* 58:356-70

Deveraux QL, Leo E, Stennicke HR, Welsh K, Salvesen GS und Reed JC (1999). Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *Embo J* 18:5242-51

Diekert K, Kispal G, Guiard B und Lill R (1999). An internal targeting signal directing proteins into the mitochondrial intermembrane space. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11752-7

Dobyns WB (2006). The pattern of inheritance of X-linked traits is not dominant or recessive, just X-linked. *Acta Paediatr Suppl* 95:11-5

Fantes J, Ragge NK, Lynch SA, McGill NI, Collin JR, Howard-Peebles PN, Hayward C, Vivian AJ, Williamson K, van Heyningen V und FitzPatrick DR (2003). Mutations in SOX2 cause anophthalmia. *Nat Genet* 33:461-3

Ferda Percin E, Ploder LA, Yu JJ, Arici K, Horsford DJ, Rutherford A, Bapat B, Cox DW, Duncan AM, Kalnins VI, Kocak-Altintas A, Sowden JC, Traboulsi E, Sarfarazi M und McInnes RR (2000). Human microphthalmia associated with mutations in the retinal homeobox gene CHX10. *Nat Genet* 25:397-401

Forcet C, Ye X, Granger L, Corset V, Shin H, Bredesen DE und Mehlen P (2001). The dependence receptor DCC (deleted in colorectal cancer) defines an alternative mechanism for caspase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3416-21

Formigli L, Papucci L, Tani A, Schiavone N, Tempestini A, Orlandini GE, Capaccioli S und Orlandini SZ (2000). Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J Cell Physiol* 182:41-9

Franco B und Ballabio A (2006). X-inactivation and human disease: X-linked dominant male-lethal disorders. *Curr Opin Genet Dev* 16:254-9

Geromel V, Kadhom N, Cebalos-Picot I, Ouari O, Polidori A, Munnich A, Rotig A und Rustin P (2001). Superoxide-induced massive apoptosis in cultured skin fibroblasts harboring the neurogenic ataxia retinitis pigmentosa (NARP) mutation in the ATPase-6 gene of the mitochondrial DNA. *Hum Mol Genet* 10:1221-8

Gibbons RJ, Picketts DJ, Villard L und Higgs DR (1995). Mutations in a putative global transcriptional regulator cause X-linked mental retardation with alpha-thalassemia (ATR-X syndrome). *Cell* 80:837-45

Golzio C, Martinovic-Bouriel J, Thomas S, Mougou-Zrelli S, Grattagliano-Bessieres B, Bonniere M, Delahaye S, Munnich A, Encha-Razavi F, Lyonnet S, Vekemans M, Attie-Bitach T und Etchevers HC (2007). Matthew-Wood syndrome is caused by truncating mutations in the retinol-binding protein receptor gene STRA6. *Am J Hum Genet* 80:1179-87

Graw J (2003). The genetic and molecular basis of congenital eye defects. *Nat Rev Genet* 4:876-88

Grzeschik KH, Bornholdt D, Oeffner F, Konig A, del Carmen Boente M, Enders H, Fritz B, Hertl M, Grasshoff U, Hofling K, Oji V, Paradisi M, Schuchardt C, Szalai Z, Tadini G, Traupe H und Happel R (2007). Deficiency of PORCN, a regulator of Wnt signaling, is associated with focal dermal hypoplasia. *Nat Genet* 39:833-5

Hakem R, Hakem A, Duncan GS, Henderson JT, Woo M, Soengas MS, Elia A, de la Pompa JL, Kagi D, Khoo W, Potter J, Yoshida R, Kaufman SA, Lowe SW, Penninger JM und Mak TW (1998). Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell* 94:339-52

Hao Z, Duncan GS, Chang CC, Elia A, Fang M, Wakeham A, Okada H, Calzascia T, Jang Y, You-Ten A, Yeh WC, Ohashi P, Wang X und Mak TW (2005). Specific ablation of the apoptotic functions of cytochrome C reveals a differential requirement for cytochrome C and Apaf-1 in apoptosis. *Cell* 121:579-91

Happle R, Daniels O und Koopman RJ (1993). MIDAS syndrome (microphthalmia, dermal aplasia, and sclerocornea): an X-linked phenotype distinct from Goltz syndrome. *Am J Med Genet* 47:710-3

Happle R (2006). X-chromosome inactivation: role in skin disease expression. *Acta Paediatr Suppl* 95:16-23

Hatefi Y (1985). The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu Rev Biochem* 54:1015-69

Hever AM, Williamson KA und van Heyningen V (2006). Developmental malformations of the eye: the role of PAX6, SOX2 and OTX2. *Clin Genet* 69:459-70

Hoag HM, Taylor SA, Duncan AM und Khalifa MM (1997). Evidence that skewed X inactivation is not needed for the phenotypic expression of Aicardi syndrome. *Hum Genet* 100:459-64

Jaattela M und Tschopp J (2003). Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Nat Immunol* 4:416-23

Jiang X und Wang X (2004). Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem* 73:87-106

Kayserili H, Cox TC, Cox LL, Basaran S, Kilic G, Ballabio A und Yuksel-Apak M (2001). Molecular characterisation of a new case of microphthalmia with linear skin defects (MLS). *J Med Genet* 38:411-7

Kelberman D, Rizzoti K, Avilion A, Bitner-Glindzicz M, Cianfarani S, Collins J, Chong WK, Kirk JM, Achermann JC, Ross R, Carmignac D, Lovell-Badge R, Robinson IC und Dattani MT (2006). Mutations within Sox2/SOX2 are associated with abnormalities in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in mice and humans. *J Clin Invest* 116:2442-55

Kherbaoui-Redouani L, Eschard C, Bednarek N und Morville P (2003). [Cutaneous aplasia, non compaction of the left ventricle and severe cardiac arrhythmia: a new case of MLS syndrome (microphthalmia with linear skin defects)]. *Arch Pediatr* 10:224-6

Kiryu-Seo S, Gamo K, Tachibana T, Tanaka K und Kiyama H (2006). Unique anti-apoptotic activity of EAAC1 in injured motor neurons. *Embo J* 25:3411-21

Kroemer G und Martin SJ (2005). Caspase-independent cell death. *Nat Med* 11:725-30

Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan C, Yang D, Karasuyama H, Rakic P und Flavell RA (1996). Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature* 384:368-72

Laemle LK, Puzkarczuk M und Feinberg RN (1999). Apoptosis in early ocular morphogenesis in the mouse. *Brain Res Dev Brain Res* 112:129-33

Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S und Nicotera P (1997). Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 185:1481-6

Li K, Li Y, Shelton JM, Richardson JA, Spencer E, Chen ZJ, Wang X und Williams RS (2000). Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis. *Cell* 101:389-99

Lindsay EA, Grillo A, Ferrero GB, Roth EJ, Magenis E, Grompe M, Hulten M, Gould C, Baldini A, Zoghbi HY und et al. (1994). Microphthalmia with linear skin defects (MLS) syndrome: clinical, cytogenetic, and molecular characterization. *Am J Med Genet* 49:229-34

Mattiazzi M, Vijayvergiya C, Gajewski CD, DeVivo DC, Lenaz G, Wiedmann M und Manfredi G (2004). The mtDNA T8993G (NARP) mutation results in an impairment of oxidative phosphorylation that can be improved by antioxidants. *Hum Mol Genet* 13:869-79

Mayer A, Neupert W und Lill R (1995). Translocation of apocytochrome c across the outer membrane of mitochondria. *J Biol Chem* 270:12390-7

Migeon BR (2007). Why females are mosaics, X-chromosome inactivation, and sex differences in disease. *Gend Med* 4:97-105

Morleo M, Pramparo T, Perone L, Gregato G, Le Caignec C, Mueller RF, Ogata T, Raas-Rothschild A, de Blois MC, Wilson LC, Zaidman G, Zuffardi O, Ballabio A und Franco B (2005). Microphthalmia with linear skin defects (MLS) syndrome: clinical, cytogenetic, and molecular characterization of 11 cases. *Am J Med Genet A* 137:190-8

Mücke J, Happle R und Theile H (1995). MIDAS syndrome respectively MLS syndrome: a separate entity rather than a particular lyonization pattern of the gene causing Goltz syndrome. *Am J Med Genet* 57:117-8

Muers MR, Sharpe JA, Garrick D, Sloane-Stanley J, Nolan PM, Hacker T, Wood WG, Higgs DR und Gibbons RJ (2007). Defining the cause of skewed X-chromosome inactivation in X-linked mental retardation by use of a mouse model. *Am J Hum Genet* 80:1138-49

Nagy E und Maquat LE (1998). A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends Biochem Sci* 23:198-9

Ng D, Thakker N, Corcoran CM, Donnai D, Perveen R, Schneider A, Hadley DW, Tiffit C, Zhang L, Wilkie AO, van der Smagt JJ, Gorlin RJ, Burgess SM, Bardwell VJ, Black GC und Biesecker LG (2004). Oculofaciocardiodental and Lenz microphthalmia syndromes result from distinct classes of mutations in BCOR. *Nat Genet* 36:411-6

Nicotera P, Leist M und Ferrando-May E (1998). Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Toxicol Lett* 102-103:139-42

Oexle K und Zwirner A (1997). Advanced telomere shortening in respiratory chain disorders. *Hum Mol Genet* 6:905-8

Ogata T, Wakui K, Muroya K, Ohashi H, Matsuo N, Brown DM, Ishii T und Fukushima Y (1998). Microphthalmia with linear skin defects syndrome in a mosaic female infant with monosomy for the Xp22 region: molecular analysis of the Xp22 breakpoint and the X-inactivation pattern. *Hum Genet* 103:51-6

Oppenheim RW, Flavell RA, Vinsant S, Prevet D, Kuan CY und Rakic P (2001). Programmed cell death of developing mammalian neurons after genetic deletion of caspases. *J Neurosci* 21:4752-60

Orrenius S, Gogvadze V und Zhivotovsky B (2007). Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47:143-83

Pasutto F, Sticht H, Hammersen G, Gillissen-Kaesbach G, Fitzpatrick DR, Nurnberg G, Brasch F, Schirmer-Zimmermann H, Tolmie JL, Chitayat D, Houge G, Fernandez-Martinez L, Keating S, Mortier G, Hennekam RC, von der Wense A, Slavotinek A, Meinecke P, Bitoun P, Becker C, Nurnberg P, Reis A und Rauch A (2007). Mutations in STRA6 cause a broad spectrum of malformations including anophthalmia, congenital heart defects, diaphragmatic hernia, alveolar capillary dysplasia, lung hypoplasia, and mental retardation. *Am J Hum Genet* 80:550-60

Paulger BR, Kraus EW, Pulitzer DR und Moore CM (1997). Xp microdeletion syndrome characterized by pathognomonic linear skin defects on the head and neck. *Pediatr Dermatol* 14:26-30

Pitkanen S und Robinson BH (1996). Mitochondrial complex I deficiency leads to increased production of superoxide radicals and induction of superoxide dismutase. *J Clin Invest* 98:345-51

Prakash SK, Paylor R, Jenna S, Lamarche-Vane N, Armstrong DL, Xu B, Mancini MA und Zoghbi HY (2000). Functional analysis of ARHGAP6, a novel GTPase-activating protein for RhoA. *Hum Mol Genet* 9:477-88

Prakash SK, Cormier TA, McCall AE, Garcia JJ, Sierra R, Haupt B, Zoghbi HY und Van Den Veyver IB (2002). Loss of holocytochrome c-type synthetase causes the male lethality of X-linked dominant microphthalmia with linear skin defects (MLS) syndrome. *Hum Mol Genet* 11:3237-48

Quaderi NA, Schweiger S, Gaudenz K, Franco B, Rugarli EI, Berger W, Feldman GJ, Volta M, Andolfi G, Gilgenkrantz S, Marion RW, Hennekam RC, Opitz JM, Muenke M, Ropers HH und Ballabio A (1997). Opitz G/BBB syndrome, a defect of midline development, is due to mutations in a new RING finger gene on Xp22. *Nat Genet* 17:285-91

Ragge NK, Brown AG, Poloschek CM, Lorenz B, Henderson RA, Clarke MP, Russell-Eggitt I, Fielder A, Gerrelli D, Martinez-Barbera JP, Ruddle P, Hurst J, Collin JR, Salt A, Cooper ST, Thompson PJ, Sisodiya SM, Williamson KA, Fitzpatrick DR, van Heyningen V und Hanson IM (2005a). Heterozygous mutations of OTX2 cause severe ocular malformations. *Am J Hum Genet* 76:1008-22

Ragge NK, Lorenz B, Schneider A, Bushby K, de Sanctis L, de Sanctis U, Salt A, Collin JR, Vivian AJ, Free SL, Thompson P, Williamson KA, Sisodiya SM, van Heyningen V und Fitzpatrick DR (2005b). SOX2 anophthalmia syndrome. *Am J Med Genet A* 135:1-7; discussion 8

Rao E, Weiss B, Fukami M, Rump A, Niesler B, Mertz A, Muroya K, Binder G, Kirsch S, Winkelmann M, Nordsiek G, Heinrich U, Breuning MH, Ranke MB, Rosenthal A, Ogata T und Rappold GA (1997). Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nat Genet* 16:54-63

Riedl SJ und Salvesen GS (2007). The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:405-13

Robinson BH (1998). Human complex I deficiency: clinical spectrum and involvement of oxygen free radicals in the pathogenicity of the defect. *Biochim Biophys Acta* 1364:271-86

Schaefer L, Ballabio A und Zoghbi HY (1996). Cloning and characterization of a putative human holocytochrome c-type synthetase gene (HCCS) isolated from the critical region for microphthalmia with linear skin defects (MLS). *Genomics* 34:166-72

Schaefer L, Prakash S und Zoghbi HY (1997). Cloning and characterization of a novel rho-type GTPase-activating protein gene (ARHGAP6) from the critical region for microphthalmia with linear skin defects. *Genomics* 46:268-77

Schluth C, Cossee M, Girard-Lemaire F, Carelle N, Dollfus H, Jeandidier E und Flori E (2007). Phenotype in X chromosome rearrangements: pitfalls of X inactivation study. *Pathol Biol (Paris)* 55:29-36

Schwarz QP und Cox TC (2002). Complementation of a yeast CYC3 deficiency identifies an X-linked mammalian activator of apocytochrome c. *Genomics* 79:51-7

Shaw GM, Carmichael SL, Yang W, Harris JA, Finnell RH und Lammer EJ (2005). Epidemiologic characteristics of anophthalmia and bilateral microphthalmia among 2.5 million births in California, 1989-1997. *Am J Med Genet A* 137:36-40

Spranger S, Stute H, Blankenagel A, Jauch A, Hager D und Tariverdian G (1998). MIDAS-Syndrom - Eine X-chromosomale Erkrankung. *Monatsschr Kinderheilkd* 146:

Steiner H, Kispal G, Zollner A, Haid A, Neupert W und Lill R (1996). Heme binding to a conserved Cys-Pro-Val motif is crucial for the catalytic function of mitochondrial heme lyases. *J Biol Chem* 271:32605-11

Stratton RF, Walter CA, Paulgar BR, Price ME und Moore CM (1998). Second 46,XX male with MLS syndrome. *Am J Med Genet* 76:37-41

Sun XM, Bratton SB, Butterworth M, MacFarlane M und Cohen GM (2002). Bcl-2 and Bcl-xL inhibit CD95-mediated apoptosis by preventing mitochondrial release of Smac/DIABLO and subsequent inactivation of X-linked inhibitor-of-apoptosis protein. *J Biol Chem* 277:11345-51

Temple IK, Hurst JA, Hing S, Butler L und Baraitser M (1990). De novo deletion of Xp22.2-pter in a female with linear skin lesions of the face and neck, microphthalmia, and anterior chamber eye anomalies. *J Med Genet* 27:56-8

Ton CC, Hirvonen H, Miwa H, Weil MM, Monaghan P, Jordan T, van Heyningen V, Hastie ND, Meijers-Heijboer H, Drechsler M und et al. (1991). Positional cloning and

characterization of a paired box- and homeobox-containing gene from the aniridia region. *Cell* 67:1059-74

Van den Veyver IB (2001). Skewed X inactivation in X-linked disorders. *Semin Reprod Med* 19:183-91

Van den Veyver IB (2002). Microphthalmia with linear skin defects (MLS), Aicardi, and Goltz syndromes: are they related X-linked dominant male-lethal disorders? *Cytogenet Genome Res* 99:289-96

Wang X, Reid Sutton V, Omar Peraza-Llanes J, Yu Z, Rosetta R, Kou YC, Eble TN, Patel A, Thaller C, Fang P und Van den Veyver IB (2007). Mutations in X-linked PORCN, a putative regulator of Wnt signaling, cause focal dermal hypoplasia. *Nat Genet* 39:836-8

Wapenaar MC, Bassi MT, Schaefer L, Grillo A, Ferrero GB, Chinault AC, Ballabio A und Zoghbi HY (1993). The genes for X-linked ocular albinism (OA1) and microphthalmia with linear skin defects (MLS): cloning and characterization of the critical regions. *Hum Mol Genet* 2:947-52

Wapenaar MC, Schiaffino MV, Bassi MT, Schaefer L, Chinault AC, Zoghbi HY und Ballabio A (1994). A YAC-based binning strategy facilitating the rapid assembly of cosmid contigs: 1.6 Mb of overlapping cosmids in Xp22. *Hum Mol Genet* 3:1155-61

Williamson KA, Hever AM, Rainger J, Rogers RC, Magee A, Fiedler Z, Keng WT, Sharkey FH, McGill N, Hill CJ, Schneider A, Messina M, Turnpenny PD, Fantès JA, van Heyningen V und FitzPatrick DR (2006). Mutations in SOX2 cause anophthalmia-esophageal-genital (AEG) syndrome. *Hum Mol Genet* 15:1413-22

Wimplinger I, Morleo M, Rosenberger G, Iaconis D, Orth U, Meinecke P, Lerer I, Ballabio A, Gal A, Franco B und Kutsche K (2006). Mutations of the mitochondrial holocytochrome c-type synthase in X-linked dominant microphthalmia with linear skin defects syndrome. *Am J Hum Genet* 79:878-89

Wimplinger I, Rauch A, Orth U, Schwarzer U, Trautmann U und Kutsche K (2007a). Mother and daughter with a terminal Xp deletion: Implication of chromosomal mosaicism and X-inactivation in the high clinical variability of the microphthalmia with linear skin defects (MLS) syndrome. *Eur J Med Genet*

Wimplinger I, Shaw GM und Kutsche K (2007b). HCCS loss-of-function missense mutation in a female with bilateral microphthalmia and sclerocornea: a novel gene for severe ocular malformations? *Mol Vis* 13:1475-1482

Zeiss CJ (2003). The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet Pathol* 40:481-95

Zeiss CJ, Neal J und Johnson EA (2004). Caspase-3 in postnatal retinal development and degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:964-70

Zeviani M und Di Donato S (2004). Mitochondrial disorders. *Brain* 127:2153-72

Zhao Y und Xu JX (2004). The operation of the alternative electron-leak pathways mediated by cytochrome c in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 317:980-7

Zheng TS und Flavell RA (2000). Divinations and surprises: genetic analysis of caspase function in mice. *Exp Cell Res* 256:67-73

Zhivotovsky B (2003). Caspases: the enzymes of death. *Essays Biochem* 39:25-40

Zvulunov A, Kachko L, Manor E, Shinwell E und Carmi R (1998). Reticulolinear aplasia cutis congenita of the face and neck: a distinctive cutaneous manifestation in several syndromes linked to Xp22. *Br J Dermatol* 138:1046-52

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, anderen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Weiter versichere ich, dass ich mich zu keiner Zeit anderweitig um Erlangung des Doktorgrades beworben habe

Hamburg, den 17. September 2007

Isabella Wimplinger

DANKSAGUNG

Ich möchte besonders Frau Prof. Dr. Kerstin Kutsche für die fachkundige und engagierte Betreuung dieser Arbeit, ihre Unterstützung und ihre konstruktiven Anregungen, die Korrektur dieses Manuskripts sowie die erfolgreiche Zusammenarbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt ebenfalls Herrn Institutsdirektor Prof. Dr. Andreas Gal, der die Durchführung meiner Doktorarbeit am Institut für Humangenetik stets durch gute Ratschläge hilfreich unterstützt hat und sich freundlicherweise als mein Disputationsgutachter zur Verfügung gestellt hat.

Bei Herrn Prof. Dr. Alexander Rodewald bedanke ich mich für das Interesse an dieser Arbeit und die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens.

Ulrike Orth danke ich für ihre Mitarbeit am MLS-Projekt und dafür, dass sie mir alles über die X-Inaktivierungsanalyse beigebracht hat. Ganz besonders möchte ich mich für Deine Unterstützung und Dein stets offenes Ohr bedanken, das hat mir so oft geholfen!!!

Ich danke Inka Jantke für ihre Hilfsbereitschaft und die Unterstützung bei der SSCP-Analyse.

Dr. Georg Rosenberger danke ich für seine Hilfsbereitschaft und die Beantwortung meiner vielen Fragen, vor allem rund um das Gateway-System.

Cordula Steglich danke ich für ihre Hilfsbereitschaft beim zunächst komplizierten Umgang mit dem ABI Prism 310 Genetic Analyzer (☺).

Karin Ziegler danke ich für die Herstellung der exzellenten Lymphozyten-Präparate.

Ingo Kurth danke ich für seine Freundlichkeit und seine Hilfsbereitschaft.

Ich möchte mich bei Köms, Ben, Jule und Steffi sowie bei allen weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Kutsche für die gute Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft bedanken. Für die gute Zusammenarbeit danke ich allen Mitarbeitern/innen des Instituts für Humangenetik.

Ich danke besonders meinem Freund Tom für die gelungenen Aufnahmen am Konfokalmikroskop sowie die Dokumentation der Hefe-Assays. Ich danke Dir von ganzem Herzen für Deine liebevolle Unterstützung, Deine Ermutigungen und guten Ratschläge im rechten Moment, ich weiß nicht ob und wie ich das ohne Dich geschafft hätte.

Zum Schluß möchte ich besonders herzlich den kleinen Patientinnen und ihren Eltern danken, ohne deren Einwilligung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

ANHANG: Publikationen

Mutations of the Mitochondrial Holocytochrome *c*-Type Synthase in X-Linked Dominant Microphthalmia with Linear Skin Defects Syndrome

Isabella Wimplinger,* Manuela Morleo,* Georg Rosenberger, Daniela Iaconis, Ulrike Orth, Peter Meinecke, Israella Lerer, Andrea Ballabio, Andreas Gal, Brunella Franco, and Kerstin Kutsche

The microphthalmia with linear skin defects syndrome (MLS, or MIDAS) is an X-linked dominant male-lethal disorder almost invariably associated with segmental monosomy of the Xp22 region. In two female patients, from two families, with MLS and a normal karyotype, we identified heterozygous de novo point mutations—a missense mutation (p.R217C) and a nonsense mutation (p.R197X)—in the *HCCS* gene. *HCCS* encodes the mitochondrial holocytochrome *c*-type synthase that functions as heme lyase by covalently adding the prosthetic heme group to both apocytochrome *c* and *c*₁. We investigated a third family, displaying phenotypic variability, in which the mother and two of her daughters carry an 8.6-kb submicroscopic deletion encompassing part of the *HCCS* gene. Functional analysis demonstrates that both mutant proteins (R217C and Δ197–268) were unable to complement a *Saccharomyces cerevisiae* mutant deficient for the *HCCS* orthologue *Cyc3p*, in contrast to wild-type *HCCS*. Moreover, ectopically expressed *HCCS* wild-type and the R217C mutant protein are targeted to mitochondria in CHO-K1 cells, whereas the C-terminal-truncated Δ197–268 mutant failed to be sorted to mitochondria. Cytochrome *c*, the final product of holocytochrome *c*-type synthase activity, is implicated in both oxidative phosphorylation (OXPHOS) and apoptosis. We hypothesize that the inability of *HCCS*-deficient cells to undergo cytochrome *c*-mediated apoptosis may push cell death toward necrosis that gives rise to severe deterioration of the affected tissues. In summary, we suggest that disturbance of both OXPHOS and the balance between apoptosis and necrosis, as well as the X-inactivation pattern, may contribute to the variable phenotype observed in patients with MLS.

Microphthalmia with linear skin defects syndrome (MLS [MIM #309801]), also known as “MIDAS” (microphthalmia, dermal aplasia, and sclerocornea), is a rare X-linked dominant condition characterized by unilateral or bilateral microphthalmia and linear skin defects—which are limited to the face and neck, consisting of areas of aplastic skin that heal with age to form hyperpigmented areas—in affected females and in utero lethality for males. Additional features in female patients include agenesis of the corpus callosum, sclerocornea, chorioretinal abnormalities, infantile seizures, congenital heart defect, mental retardation, and diaphragmatic hernia.¹ In the majority of cases, patients carry a chromosomal aberration that results in segmental monosomy of the Xp22 chromosomal region (>11 Mb). To date, eight patients with an apparently normal female karyotype have been described.^{2–6} The MLS minimal critical region has been delineated to 610 kb in Xp22.2, through breakpoint mapping of two X;Y translocations of patients not affected with MLS and of the smallest deletion characterized in a female with the typical MLS phenotype.⁷ Three genes are located in the critical interval, including *MID1*, *HCCS*, and *ARHGAP6*⁷ (fig. 1A). *MID1* is mutated in Opitz G/BBB syndrome,⁸ whereas no disease-

associated mutations have yet been described for *HCCS* and *ARHGAP6*. The *ARHGAP6* gene codes for a Rho GTPase-activating protein (Rho GAP) that functions as a GAP for the small GTPase RhoA, as well as a protein implicated in reorganization of the actin cytoskeleton.^{9,10} *HCCS* encodes a mitochondrial holocytochrome *c*-type synthase, also known as “heme lyase,” composed of 268 aa.^{11,12} It catalyzes the covalent attachment of heme to both apocytochrome *c* and *c*₁, the precursor forms, thereby leading to the mature forms, holocytochrome *c* and *c*₁, which are necessary for proper functioning of the mitochondrial respiratory chain.^{13,14} In addition to the well-known role of cytochrome *c* in oxidative phosphorylation (OXPHOS), cytochrome *c* is released from mitochondria in response to a variety of intrinsic death-promoting stimuli that, in turn, result in caspase-dependent cell death, namely “apoptosis.”¹⁵

The majority of patients display the classic phenotypic features of MLS; however, a high intra- as well as inter-familial clinical variability that is not correlated with the extent of the chromosomal deletion has been reported. For example, a few patients show the typical skin defects but no ocular manifestation,^{2,16–18} whereas others present

From the Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (I.W.; G.R.; U.O.; A.G.; K.K.), and Abteilung für Medizinische Genetik, Altonaer Kinderkrankenhaus (P.M.), Hamburg; Telethon Institute of Genetics and Medicine (M.M.; D.I.; A.B.; B.F.) and Medical Genetics, Department of Pediatrics, Federico II University (A.B.; B.F.), Naples, Italy; and Department of Human Genetics, Hadassah Hebrew University Hospital, Jerusalem (I.L.)

Received July 24, 2006; accepted for publication August 15, 2006; electronically published September 6, 2006.
Address for correspondence and reprints: Dr. Kerstin Kutsche, Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Butenfeld 42, D-22529 Hamburg, Germany. E-mail: kkutsche@uke.uni-hamburg.de

* These two authors contributed equally to this work.

Am. J. Hum. Genet. 2006;79:878–889. © 2006 by The American Society of Human Genetics. All rights reserved. 0002-9297/2006/7905-0010\$15.00

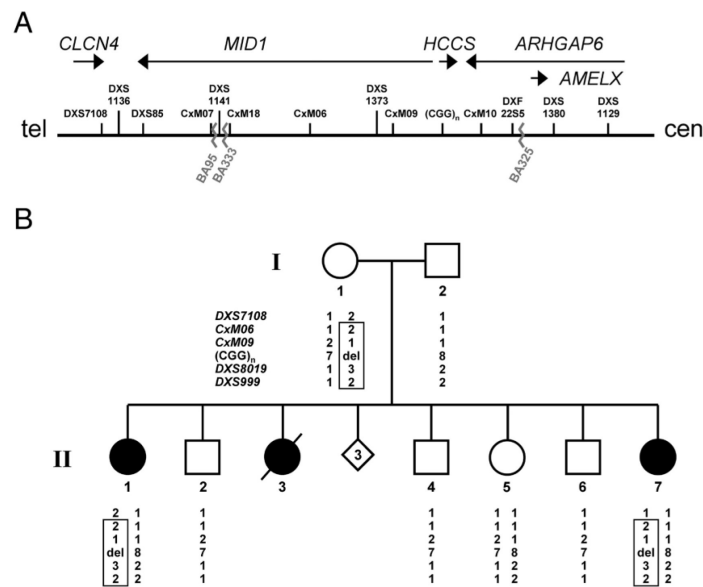


Figure 1. Minimal MLS critical region and haplotype analysis of the family of patient II.7. *A*, Schematic representation of the minimal MLS critical region (610 kb) in Xp22.2, defined by the breakpoints of patients BA333 and BA325 (*jagged lines*). The figure is not drawn to scale. The uppermost arrows show the orientation of genes within the critical region. The position of DNA marker loci previously mapped in this region is shown. *B*, Haplotype analysis of six representative polymorphic markers in Xp22.2-p22.13 in the family of patient II.7. Whereas markers *DXS7108*, *CxM06*, *CxM09*, and SNP *rs5901444*—(*CGG*)_n—are positioned in the MLS critical region and indicated in panel *A*, loci *DXS8019* and *DXS999* are located centromeric to the critical region. The polymorphic (*CGG*)_n repeat is located in the *HCCS* 5' UTR, and the respective repeat length is given. Alleles are shown below the pedigree symbols. del = Deletion of one allele. The haplotype shared by the affected sisters (II.1 and II.7) and their mother (I.1) is boxed. Both patients II.7 and II.1 carry only the paternal allele, with eight *CGG* repeats, whereas the unaffected sister (II.5) is heterozygous for the trinucleotide repeat. Segregation analysis showed that the three brothers (II.2, II.4, and II.6) and the unaffected sister (II.5) carry a different maternal haplotype than do II.1 and II.7.

with only eye abnormalities, and dermal lesions are absent.^{19–21} It has been suggested that the pattern of X inactivation may play a role in the development of the various symptoms seen in patients with MLS.^{22,23}

The identification of the genetic defect for MLS has been hampered by the absence of patients with a full-blown MLS phenotype and a normal karyotype. In 2005, Morleo and colleagues⁵ undertook the first attempt at a detailed characterization of four patients with MLS and no obvious chromosomal rearrangements. With use of FISH with genomic clones spanning the MLS critical region and a genome-wide analysis with BAC microarrays, no microdeletion or duplication could be detected in these patients. Similarly, direct sequencing of coding regions and exon-intron boundaries of *MID1*, *HCCS*, and *ARHGAP6* revealed no pathogenic sequence alteration or small rearrangement that would suggest that these patients carry cryptic rearrangements that had been missed by the techniques applied.⁵

Material and Methods

Patients

We examined the family of proband II.7. She is the youngest daughter of healthy and unrelated parents. There is no maternal history of skin defect or any other pathology, nor is there any family history of genetic disease or malformations. The couple has three healthy sons and one healthy daughter. Three pregnancies ended with spontaneous abortions early in the first trimester (fig. 1*B*). The proband was born with a left anophthalmia, sclerocornea, and lateral skin defect on her cheek. At age 6 mo, she presented with junctional ectopic tachycardia, which was successfully treated by catheter ablation. At age 3 years, she had normal psychomotor development.

Her eldest sister (II.1) was born with the following manifestations: a left opaque cornea, congenital glaucoma with total anterior synechia, and a white anterior cataract. On the right side, she presented with corneal leukoma, which has resolved with time. She showed no other malformations, and her psychomotor development is normal. The couple had another baby girl, with bilateral anophthalmia, who died at age 6 h from complications

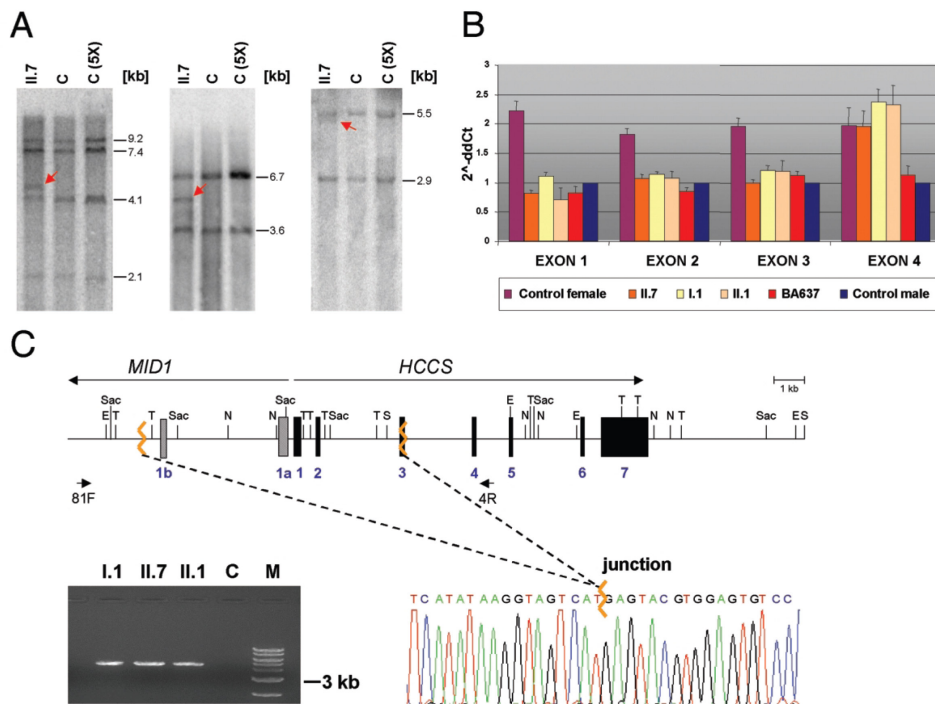


Figure 2. A submicroscopic deletion encompassing part of the *HCCS* gene is present in three members of the family of patient II.7. *A*, Southern blot hybridized with a probe covering the *HCCS* 5' UTR and coding region. Genomic DNA samples of patient II.7 and controls were digested with *SpeI* and *EcoRV* (left), *NdeI* and *SacI* (middle), and *TaqI* (right). C = female control; C (5X) = human cell line with five X chromosomes. Various fragments of altered sizes (red arrows) were observed in II.7. *B*, Relative quantification of copy numbers of *HCCS* exons 1–4, by real-time PCR on genomic DNA of individuals I.1, II.1, and II.7. BA637 has MLS and displays monosomy of the Xp22 region.⁵ Values of *HCCS* exons 1–3 in II.7, II.1, and I.1 are comparable to that of a haploid sample. *C*, Schematic representation of part of the MLS critical region (top). *MID1* and *HCCS* genes are indicated by long arrows, and primers used for junction fragment amplification are indicated by short arrows. Exons 1a and 1b of *MID1* are represented by bars, exons of *HCCS* by black boxes. Jagged orange lines indicate deletion breakpoints. E = *EcoRV*; N = *NdeI*; S = *SpeI*; Sac = *SacI*; T = *TaqI*. Bottom left panel, Amplification of a junction fragment from genomic DNA of I.1, II.1, and II.7 but not from a control (C). M = DNA marker. Bottom right panel, Part of the DNA sequence electropherogram of the rearrangement-specific junction fragment. The deletion breakpoint is indicated by a jagged orange line. The 8.6-kb deletion encompasses *HCCS* exons 1–2, part of exon 3, and exons 1a and 1b of *MID1*.

of a left diaphragmatic hernia. High-resolution karyotype of both affected sisters was normal.

Patient MS1, a 5-year-old girl, is the first child of healthy parents. Pregnancy was uneventful, and delivery was without any complication; birth measurements were in the upper-normal range. The newborn showed bilateral microphthalmia (more severe on the right), with bilateral cloudy and vascular cornea. In addition, linear and patchy erythrodermia of the patient's cheeks and right lateral neck was noticed immediately after birth. At age 3 mo, complete sclerocornea was noticed; however, erythrodermia had faded gradually. Reexamination at age 6 mo revealed poor vision but only very mild facial erythrodermia and only mild developmental delay. Cranial magnetic-resonance-imaging studies at age 1 year demonstrated hypoplasia of the corpus callosum, lack of the septum pellucidum, and slightly dilated third ventricle. The patient's further development was characterized by normal growth, mild-to-moderate developmental delay, and very se-

vere visual impairment. The happy-natured girl is now able to speak short sentences.

Patient MS2, a 9-year-old girl, was born to healthy unrelated parents after an uneventful pregnancy. Birth measurements were within the normal range. After birth, she presented with bilateral microphthalmia and sclerocornea. A small mandible, a single palmar crease, and a sandal gap but no erythematous skin lesions were noticed. At the end of her 1st year of life, she developed idiopathic ventricular tachycardia, which was converted to normal sinus rhythm by amiodaron and ajmalin. After extubation and end of sedation, she suffered an occlusion of her right arteria cerebri media and subsequently developed hemiparesis on the left side. Neurologic symptoms declined after physiotherapy. At age 8 years, she suffered a sole tonic-clonic seizure.

Our ethics committees approved this study, and written informed consent was obtained from all participants or their legal guardians.

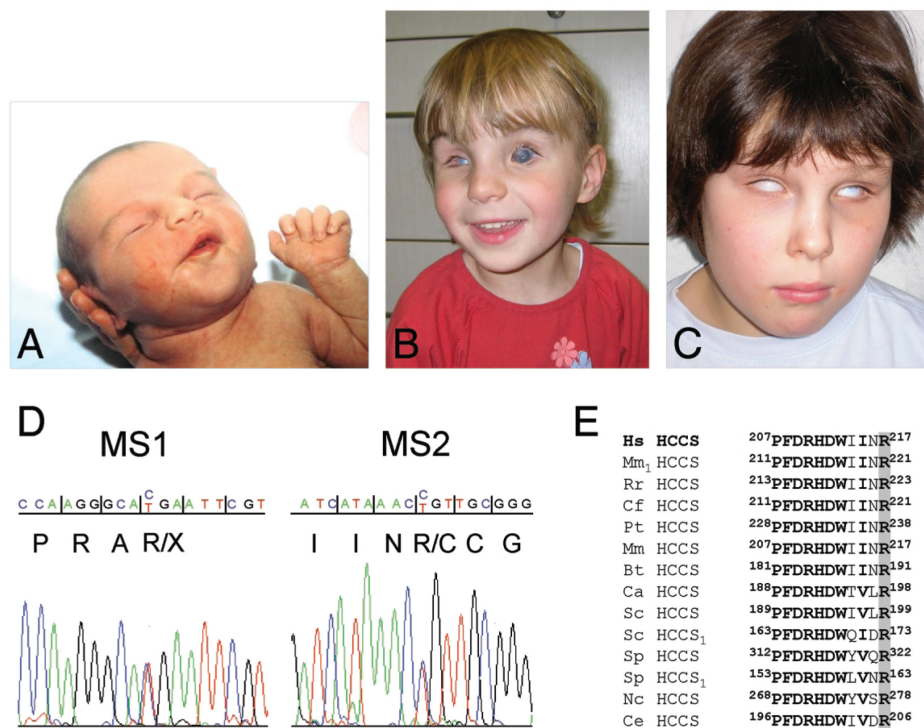


Figure 3. Point mutations in *HCCS* in two patients with MLS. *A–C*, Photographs of patients MS1 and MS2. *A*, Linear skin defects located on the face and neck of patient MS1 at birth. *B*, Microphthalmia of the right eye and bilateral sclerocornea of patient MS1 at age 4 years. Linear skin defects have completely disappeared. *C*, Patient MS2, at age 8 years, with bilateral microphthalmia and sclerocornea. No linear skin defects were noted at birth. *D*, Sequence electropherograms of part of *HCCS* exons from genomic DNA of patients MS1 and MS2. Nucleotide triplets and encoded amino acids are indicated. Patient MS1 is heterozygous for the c.589C→T mutation (p.R197X) (left panel) in exon 6, whereas the heterozygous mutation c.649C→T (p.R217C) (right panel) in exon 7 was found in patient MS2. *E*, Partial amino acid–sequence alignment of heme lyases from various species. The position of amino acids is given. Evolutionarily conserved residues are shown in bold. The invariant arginine at position 217, which is altered to cysteine in patient MS2, is shaded in gray. HCCS₁ indicates specificity of the heme lyase for cytochrome *c*₁. Hs = *Homo sapiens*; Mm₁ = *Mus musculus*; Rr = *Rattus norvegicus*; Cf = *Canis familiaris*; Pt = *Pan troglodytes*; Mm = *Macaca mulatta*; Bt = *Bos taurus*; Ca = *Candida albicans*; Sc = *S. cerevisiae*; Sp = *Schizosaccharomyces pombe*; Nc = *Neurospora crassa*; Ce = *Caenorhabditis elegans*.

Mutation Analysis, X-Inactivation Assay, and Real-Time PCR

Genomic DNA was isolated by standard procedures. We amplified the coding region (exons 2–7) of *HCCS* (GenBank accession number NM_005333), including the flanking intronic sequences, from genomic DNA. Primer sequences and PCR conditions are available on request. PCR products were directly sequenced with the Big Dye Terminator ready reaction kit (PE Applied Biosystems) on an ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems).

Examination of the methylation pattern at the androgen receptor (*AR*) locus was performed according to the procedures of Allen et al.,²⁴ with minor modifications. For each DNA sample, two reactions were prepared: in the first, 400 ng of DNA was digested with 8 U *HpaII* in a total volume of 10 μ l, for 30 min at 37°C; in the second, 400 ng DNA was incubated with the enzyme reaction buffer, but without enzyme. To confirm complete di-

gestion, DNA samples from a male and from a female with unilateral X inactivation were included as controls. Subsequent PCR amplification of the *AR* locus with primers AR-A_FAM (5'-CTTTCAGAAATCTGTCCAG-3'; labeled with 5' FAM) and AR-B (5'-AAG-GTTGCTGTTCCTCATC-3') was performed in a 25- μ l reaction volume for 40 ng of the undigested DNA and in a total of 50 μ l volume for 250 ng of *HpaII*-cleaved DNA. The PCR contained both oligonucleotide primers at a concentration of 0.4 μ M each, 0.2 mM dinucleotide triphosphates (dNTPs), and 0.5 U *Taq* polymerase (QIAGEN). Samples were denatured, with use of a PTC thermocycler (MJ Research), at 95°C for 3 min, followed by 35 cycles at 95°C for 1 min, at 55°C for 1 min, and at 72°C for 1 min, followed by a final incubation at 72°C for 10 min. A quantity of 0.4–0.8 μ l of the amplicons was mixed with 20 μ l deionized formamide and 0.4 μ l TAMRA (red fluorescent dye) Size Standard (PE Applied Biosystems) and was denatured at 95°C for 5 min.

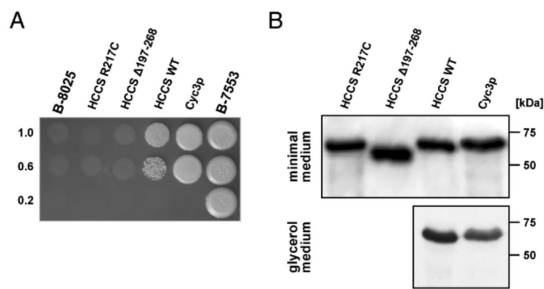


Figure 4. HCCS mutant proteins are not able to complement *S. cerevisiae* *CYC3* deficiency. *A*, Functional complementation of the *S. cerevisiae* strain B-8025. B-8025 was transformed with human wild-type HCCS (HCCS WT), the mutants $\Delta 197-268$ and R217C, or yeast *CYC3* (*Cyc3p*) expression constructs and was grown on minimal medium. Transformants were grown in liquid minimal medium, and aliquots of 5 μ l of saturated and diluted cultures were spotted on glycerol medium containing copper (to induce expression of GST-fusion proteins) and were incubated for 5 d at 30°C. The top row shows spots of saturated cultures, and the middle and bottom rows show spots of dilutions; dilution rates are indicated to the left of the figure. Note partial restoration of growth by *Cyc3p* and wild-type HCCS, whereas no growth was observed for the untransformed strain or that expressing HCCS $\Delta 197-268$ or HCCS R217C. In parallel, all strains were also spotted on plates with glucose-containing minimal medium and showed normal growth (data not shown). Strain B-7553 served as wild-type growth control. *B*, Expression of GST-HCCS-fusion proteins determined by western blotting. Expression of GST-HCCS R217C-, $\Delta 197-268$ -, wild-type-, and GST-*Cyc3p*-fusion proteins in yeast strain B-8025, grown in minimal medium with copper, was demonstrated by immunoblotting (*top panel*), whereas, in strain B-8025 grown in glycerol-containing medium, only GST-HCCS wild-type- and GST-*Cyc3p*-fusion proteins were expressed (*lower panel*). B-8025 transformed with the GST-HCCS $\Delta 197-268$ or GST-HCCS R217C construct did not grow under this condition.

PCR products were analyzed on an ABI Prism 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems). Data were taken as a ratio of peak areas of the shorter-to-longer alleles.

Real-time quantitative PCR on genomic DNA was performed using an ABI Prism 7000 (PE Applied Biosystems) in a 96-well optical plate, with a final reaction of 20 μ l. All reactions were prepared with 10 μ l of 2 \times SYBR green I fluorescent dye PCR Master Mix and 400 nM forward and reverse primers. Primers for real-time experiments were designed using the Primer Express software, in accordance with the PE Applied Biosystems guidelines; primers sequences are available on request. The *RPP30* gene (GenBank accession number NM_006413) coding for a ribonuclease P was used as an internal reference. A total of 100 ng of DNA was used as a template for each sample; each was analyzed in quadruplicate. Thermal cycling conditions included a prerun of 2 min at 50°C and of 10 min at 95°C. Cycle conditions were 40 cycles at 95°C for 15 s and at 60°C for 1 min, in accordance with the PCR protocol (PE Applied Biosystems). Relative quantification of exon-copy numbers on genomic DNA was performed using the comparative threshold cycle (ddCt) method: the start-

ing copy number of exons in patients was determined in comparison with the known copy number of the calibrator sample (healthy male control), with use of the formula

$$\begin{aligned} \text{ddCt} &= \text{dCt HCCS (patient with MLS)} \\ &\quad - \text{dCt RPP30 (patient with MLS)} \\ &\quad - \text{dCt HCCS (healthy male)} \\ &\quad - \text{dCt RPP30 (healthy male)} \end{aligned}$$

The relative exon-copy number was calculated by the expression $2^{-(\text{ddCt} \pm \text{SE})}$ that is of ~ 2 for a diploid sample and ~ 1 for a haploid sample.

Haplotype and SNP Analysis

Haplotype analysis of family members of patient II.7 was performed using five polymorphic microsatellite markers (tel-DXS7108-CxM06-CxM09-DXS8019-DXS999-cen) in the Xp22.2-p22.13 region, which contains the *HCCS* gene. PCR products were amplified using FAM (blue fluorescent)-labeled primers, following standard methods, and were electrophoresed on an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer. Results were processed by GENESCAN software (PE Applied Biosystems).

For analysis of polymorphism *rs5901444*, exon 1 containing the trinucleotide CGG repeat was amplified using forward (5'-CCTGCCACCGCCACATTTTG-3') and reverse (5'-ATGAATAGGA-ATTGGAAGAACGAAGG-3') primers. The PCR contained both primers, each at a concentration of 0.2 μ M, 0.2 mM dNTPs, and 1 U AmpliTaq Gold (PE Applied Biosystems), in a total volume of 30 μ l. Samples were amplified using a GeneAmp PCR System 9700 thermocycler (PE Applied Biosystems), with an initial denaturation at 95°C for 7 min and 35 cycles at 98°C for 1 min, at 58°C for 1 min, and at 72°C for 1 min.

RT-PCR

Total RNA was extracted from Epstein Barr virus-transformed lymphoblastoid cells of patient MS1 with the RNeasy kit (QIAGEN), according to the manufacturer's instructions. For first-strand cDNA synthesis, 1 μ g of total RNA was reverse transcribed by using the Omniscript RT Kit (QIAGEN) and random hexamers, according to the protocol provided. Of each first-strand reaction, 1 μ l cDNA was taken as template in PCRs, with use of Advantage cDNA-Polymerase Mix (BD Biosciences Clontech) and primers HCCS_RT_4F (5'-ATATCATTAGAATTCACAATCAG-3') and HCCS_RT_3R (5'-AAACTGCAAGGTACAACACAAGTC-3'). The PCR condition was as follows: 35 cycles, each comprising 15 s at 95°C, 10 s at 58°C, and 40 s at 72°C, with an initial denaturation at 95°C for 3 min.

Southern-Blot Analysis

For Southern-blot analysis, 10 μ g of genomic DNA was digested with the appropriate restriction enzymes: *SpeI* and *EcoRV* (double digestion), *NdeI* and *SacI* (double digestion), and *TaqI*. DNA was separated by electrophoresis in 0.8% agarose gel, was transferred to Hybond-N (Amersham), and was hybridized to a probe covering the coding and the 5' UTR regions of the *HCCS* transcript. This probe was generated by RT-PCR on cDNA obtained from lymphoblastoid cell lines, with use of primers RTF1 (5'-CGTGAA-

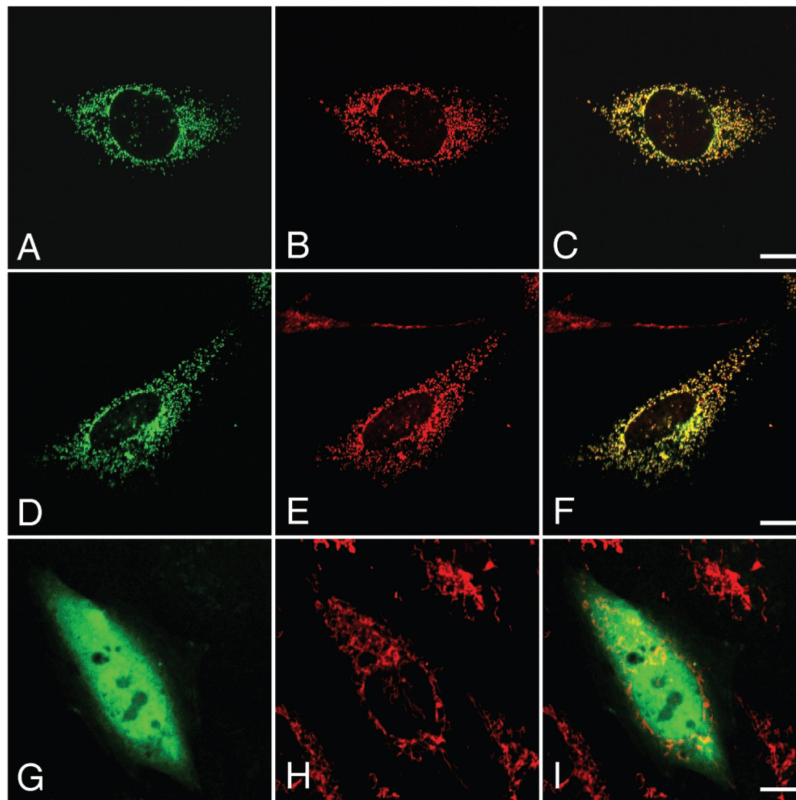


Figure 5. Targeting of ectopically expressed HCCS wild-type and mutant proteins to mitochondria. Subcellular localization of different N-terminally HA-tagged HCCS proteins ectopically expressed in CHO-K1 cells (A, D, and G) and staining of endogenous mitochondria by MitoTracker (B, E, and H) are shown. HA-tagged HCCS wild-type protein (A [green]) is targeted to mitochondria (B [red]), as shown by colocalization with the MitoTracker (C [yellow]). Similarly, HA-tagged HCCS R217C mutant protein (D [green]) shows a mitochondrial (E [red]) distribution (F [yellow]). In contrast, the truncated HCCS Δ 197–268 protein is diffusively dispersed in the cell (G), and the two fluorescence patterns (G and H) show no overlap (I). The scale bars represent 10 μ m.

GTCACCTGCTGCTCTG-3) and RTR1 (5'-TCTGAAACAGTGCTTT-ACGAGGTC-3).

Generation of N- and C-Terminal-Tagged HCCS Constructs

HCCS cDNA clone DKFZp77911858 (GenBank accession number CR749578) was provided by the RZPD German Resource Center for Genome Research (Berlin). The DNA insert of this cDNA clone was sequenced by SP6 and T7 primers and primer walking (primer sequences are available on request). Wild-type HCCS and HCCS (Δ 197–268) cDNA inserts were generated using specific PCR primers and the DKFZp77911858 clone as template. The HCCS (R217C) insert was established by PCR-mediated mutagenesis.²⁵ Purified PCR products were cloned into pENTR/b-TOPO (Invitrogen) according to the protocol provided. Constructs were sequenced for integrity and then were used for cloning the HCCS-coding region into plasmids pcDNA-DEST53 (N-terminal EGFP epitope [Invitrogen]), pcDNA-DEST47 (C-terminal EGFP epitope [Invitrogen]), pMT2SM-HA-DEST (N-terminal HA epitope), and pcDNA3.2/V5-

DEST (C-terminal V5 epitope [Invitrogen]) via left-right reaction, following the manufacturer's instructions. Plasmid pMT2SM-HA-DEST was generated by blunt-end ligation of the GATEWAY Cloning Reading Frame Cassette C (Invitrogen) into the multiple cloning site of vector pMT2SM-HA.

Generation of Yeast-Expression Constructs

All yeast-expression constructs were generated in pYEX4Tps, which drives expression of the glutathione-S-transferase (GST)-fusion proteins from the *Saccharomyces cerevisiae* CUP1 promoter and carries the selectable markers *leu2-d*, *URA3*, and *Amp^r*. To generate pYEX4Tps-HCCS wild type and pYEX4Tps-HCCS Δ 197–268, PCR products were amplified by using specific PCR primers and the DKFZp77911858 clone as template. pYEX4Tps-HCCS-R217C was established by PCR-mediated mutagenesis.²⁵ After purification of PCR products, each amplicon was restricted with *Bam*HI and *Not*I and was cloned unidirectionally into pYEX4Tps. To establish the control construct pYEX4Tps-CYC3, a PCR product was amplified

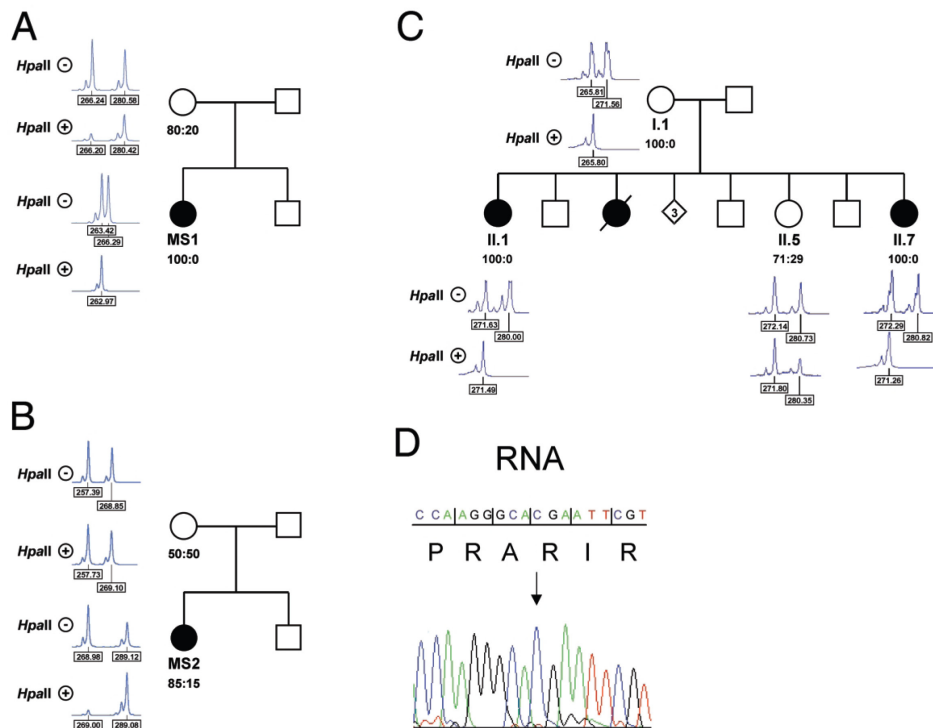


Figure 6. Skewed X inactivation in females with an *HCCS* mutation. X-chromosome inactivation determined by amplification of an *AR*-sequence polymorphism and digestion of genomic DNA isolated from lymphocytes with *Hpa*II (indicated with plus [+] and minus [-] signs, respectively). The ratio of the X-inactivation pattern is given below the respective pedigree symbol. All females carrying an *HCCS* mutation show nonrandom or extremely skewed X inactivation (patient MS1 in panel A; patient MS2 in panel B; and II.1, II.7, and their mother [I.1] in panel C). *D*, Part of the DNA sequence electropherogram of *HCCS* exon 6, obtained from an RT-PCR amplicon of patient MS1. Only the wild-type allele (c.589C) (arrow) is expressed in her lymphoblastoid cells.

by using specific primers and pAB256 carrying yeast *CYC3* as template. Subsequently, the amplicon was cloned as *Bam*HI-*Not*I fragment into pYEX4Tps. Primer sequences and PCR conditions are available on request. All constructs were sequenced for integrity, and large and pure amounts of plasmid DNA were prepared by using a plasmid maxikit (QIAGEN).

Immunofluorescence

CHO-K1 cells were cultured on fibronectin-coated (10 μ g/ml) coverslips in F12-Ham's Nutrient Mixture supplemented with 10% fetal calf serum, 1% l-glutamine, and penicillin-streptomycin, at 37°C in 5% CO₂. Cells were transfected with pcDNA-DEST53-HCCS wild type, pcDNA-DEST53-HCCS R217C, pcDNA-DEST53-HCCS Δ 197-268, pcDNA-DEST47-HCCS wild type, pcDNA-DEST47-HCCS R217C, pcDNA-DEST47-HCCS Δ 197-268, pMT2SM-HA-DEST-HCCS wild type, pMT2SM-HA-DEST-HCCS R217C, pMT2SM-HA-DEST-HCCS Δ 197-268, pcDNA3.2/V5-DEST-HCCS wild type, pcDNA3.2/V5-DEST-HCCS R217C, and pcDNA3.2/V5-DEST-HCCS Δ 197-268 (each with 1 μ g of DNA), with use of Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol, and were incubated overnight. The next day, cells were incubated in

normal growth medium supplemented with 50 nM MitoTracker Red CMXRos (Invitrogen) for 20 min at 37°C, were rinsed in PBS, and were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS. After washing three times with PBS, EGFP-transfected cells on coverslips were directly mounted in glycerol gelatin (Sigma). Cells transfected with HA- or V5-tagged *HCCS* constructs were incubated in permeabilization/blocking solution (2% BSA, 3% goat serum, and 0.5% Nonidet P-40 in PBS) for 60 min. Subsequently, HA- and V5-tagged *HCCS* proteins were detected with rat monoclonal anti-HA-Fluorescein antibody (1.25 μ g/ml) (Roche) and mouse monoclonal anti-V5-FITC antibody (2.0 μ g/ml) (Invitrogen), respectively, both diluted in antibody solution (3% goat serum and 0.1% Nonidet P-40 in 1 \times PBS). After extensive washing with PBS, cells were mounted in glycerol gelatin on microscopic slides. Images were acquired with use of a Zeiss Axiovert 200 M confocal microscope equipped with a 63 \times Planapochromat/1.4 DIC lens.

Yeast-Complementation Studies

For complementation studies, we used *S. cerevisiae* strain B-8025 (MAT α *can1-100 CYC1 cyc3- Δ cyc7- Δ ::CYH2 cyh2 his3- Δ 1 leu2-3,112 trp1-289*), which carries a deletion of *CYC3*,²⁶ as well as B-

7553 (MAT α *can1-100 CYC1 cyc7::CYH2 cyh2 his3- Δ 1 leu2-3,112 trp1-289*) as a growth control.²⁷ Both B-8025 and B-7553 carry a deletion of *CYC7*, which encodes cytochrome *c*, one of the two yeast cytochrome *c* proteins. Strains lacking *CYC3* but still harboring *CYC7* may still show residual respiratory growth due to conversion of apocytochrome *c*₁ to its holoform by the second yeast heme lyase Cyt2p. Thus, the *CYC3*⁻ mutant strain lacking *CYC7* is not able to grow at all on nonfermentable carbon sources and needs complementation to show respiratory growth.

Yeast cells were maintained in complete medium (YPD). Transformation of cells was done by the standard lithium-acetate method. Positive transformants were selected by growth in minimal medium, supplemented with 2% glucose but lacking leucine. Colonies that showed growth under this condition were grown in liquid minimal medium until saturation and subsequently were tested for growth on nonfermentable carbon sources (YPG medium containing 3% glycerol, 2% peptone, 1% yeast extract, 2% agar, and 0.2 mM CuSO₄). Therefore, we generated two dilutions (0.6-fold and 0.2-fold) from a saturated culture of each strain and spotted 5 μ l of these cultures on YPG plates and in parallel, as growth control, on plates containing minimal medium with glucose. Plates were incubated for 5 d at 30°C.

Immunoblotting

Expression of various GST-HCCS and GST-CYC3–fusion proteins was confirmed by immunoblotting of lysates from saturated yeast cultures (grown in minimal medium or YPG medium with copper) with use of horseradish peroxidase–conjugated goat polyclonal anti-GST antibody (0.3 μ g/ml) (Amersham Pharmacia Biotech).

Results

We examined a family in which the youngest daughter (II.7) shows the classic MLS phenotype and a normal karyotype. However, a pathogenic mutation in *MIDI*, *ARHGAP6*, and *HCCS* in patient II.7 has not yet been identified.⁵ The older sister (II.1) presents a milder phenotype, a third affected daughter (II.3) died at age 6 h, and three spontaneous abortions were also reported (fig. 1B). The mother has no obvious signs of MLS, although we cannot exclude the presence of skin lesions early in infancy that disappeared over time; the examination with a UV light was not possible. In an attempt to find a microdeletion within the MLS critical region, we performed segregation analysis using polymorphic markers within the *HCCS* gene (CGG repeat of SNP *rs5901444*) and from regions nearby (*DXS7108*, *CxM06*, *CxM09*, *DXS8019*, and *DXS999*). For SNP *rs5901444*, which is located in the 5' UTR of *HCCS*, the mother carries seven CGG repeats, whereas the father has eight (fig. 1B). Remarkably, both patients (II.7 and II.1) carry only the paternal allele with eight CGG repeats, which suggests that the mother is hemizygous rather than homozygous for this repeat (fig. 1B). Segregation analysis showed that the two affected individuals carry a different maternal haplotype than do their four unaffected siblings (fig. 1B). To identify a submicroscopic deletion, we performed Southern-blot analysis with cDNA probes complementary to the *HCCS* 5' UTR and coding region, using genomic DNA of patient II.7

digested with various enzymes. In addition to the expected pattern, we identified aberrant bands in the patient compared with control samples, which suggests the presence of a heterozygous cryptic rearrangement involving the *HCCS* gene (fig. 2A). We used real-time PCR for comparative quantification of copy numbers of *HCCS* exon 1–7 amplicons on genomic DNA of patient II.7, her sister (II.1), and the asymptomatic mother (I.1). The relative copy number of *HCCS* exons 1–3 was comparable to a haploid sample, whereas that of exons 4–7 was comparable to a diploid sample in the three females (fig. 2B). We subsequently amplified a 4,764-bp breakpoint-spanning PCR product from the DNA of patients II.1 and II.7 and their mother (fig. 2C). Direct sequencing of the junction fragment revealed the presence of an 8.6-kb deletion comprising *HCCS* exons 1 and 2, the first 83 bp of exon 3, the 5' untranslated exons 1a and 1b of *MIDI*, as well as the respective intronic sequences in I.1, II.1, and II.7 (fig. 2C). This deletion was absent in the three males (II.2, II.4, and II.6) and in the unaffected female sibling (II.5) of the proband (data not shown). In summary, we found no evidence of the presence of a mosaicism in the mother as explanation of her phenotype.

The identification of a microdeletion makes *HCCS* a strong candidate gene for MLS. Therefore, we studied two previously unreported female patients with MLS: 5-year-old patient MS1 and 9-year-old patient MS2 (fig. 3A–3C), who both carry an apparently normal female karyotype. By sequence analysis of the coding regions and exon-intron boundaries of *HCCS*, we identified a heterozygous c.589C→T (p.R197X) mutation in exon 6 of patient MS1, as well as a heterozygous c.649C→T (p.R217C) mutation in exon 7 of patient MS2 (fig. 3D). The mutations were found neither in the parents (paternity confirmed) nor in 50 (for c.589C→T) or 110 (for c.649C→T) female controls (data not shown). The ethnicity of the controls matched that of the patients. The mutation found in patient MS2 affects the arginine residue at position 217 of the HCCS protein, which is highly conserved across evolution in all heme lyases,²⁸ suggesting an important function of this amino acid (fig. 3E). In contrast, the sequence change in patient MS1 causes a premature stop located 21 nt upstream of the last splicing-generated exon-exon junction, which may define either a functional null allele due to nonsense-mediated mRNA decay (NMD) or an HCCS protein lacking 72 C-terminal amino acids (Δ 197–268). The latter assumption is more likely, since mRNAs with premature termination codons located <50–55 nt upstream of the most 3' exon-exon junction are generally not targeted for NMD.²⁹

The *S. cerevisiae* strain B-8025 shows a severely depleted respiratory function and is unable to grow on nonfermentable carbon sources because of deletion of *CYC3*, which encodes the yeast orthologue of the cytochrome *c* heme lyase (Cyc3p).³⁰ This deficiency has been shown to be complemented by ectopically expressed human HCCS protein.¹² We expressed various human HCCS and yeast

Cyc3 proteins as GST-fusion proteins in yeast strain B-8025 and analyzed their capacity to compensate for respiratory deficiency. As expected, wild-type human HCCS and yeast Cyc3 proteins were able to restore growth on glycerol-containing medium. Notably, complementation by yeast Cyc3p is only partial; that is probably because of expression of a GST-fused protein. In contrast, expression of either the C-terminally truncated HCCS protein ($\Delta 197$ –268) or HCCS carrying the missense mutation p.R217C does not restore growth (fig. 4A). By western-blot analysis of protein extracts from the transformed B-8025 strains grown in minimal medium, we confirmed expression of the four GST-fusion proteins: human wild-type HCCS, $\Delta 197$ –268, R217C, and yeast Cyc3p (fig. 4B).

To investigate whether the mutated HCCS proteins are still directed to mitochondria, we compared subcellular localization of ectopically expressed wild-type HCCS with mutated HCCS proteins. Indeed, we observed that N-terminally HA-tagged wild-type HCCS protein is localized to mitochondria in CHO-K1 cells (fig. 5A–5C). Similarly, ectopically expressed HCCS with cysteine-217 (HCCS R217C) is also targeted to mitochondria (fig. 5D–5F), whereas the HCCS mutant protein $\Delta 197$ –268 was dispersed in the cytoplasm and nucleus (fig. 5G–5I). We obtained similar results with wild-type HCCS proteins and the two mutants carrying an N- or C-terminal EGFP tag or a C-terminal V5 tag (data not shown).

The HCCS gene product is supposed to act in a cell-autonomous manner; therefore, functional nullisomy should result in selective cell loss and consequent non-random X inactivation in various tissues of heterozygous females. We used the methylation-specific PCR at the polymorphic human AR locus to study the X-inactivation pattern in all females carrying an HCCS mutation. In patients MS1, MS2, II.7, the sister of II.7 (II.2), and the mother of II.7 and II.2 (I.1), a skewed X chromosome-inactivation pattern (85%–100%) in peripheral-blood cells was found (fig. 6A–6C). Consistently, a skewed X inactivation was also observed in buccal mucosa cells of patient MS1, as well as in fibroblasts of patient II.7 (data not shown). Results from the X-inactivation studies for patients II.1 and II.7 suggest that there is a selective disadvantage for cells carrying the active maternal X chromosome (fig. 6C). Moreover, in both MS1 and MS2, the paternal X chromosome was found to be preferentially inactivated (fig. 6A and 6B). Accordingly, by RT-PCR analysis, we showed that only HCCS mRNA transcribed from the wild-type allele is detected in lymphoblastoid cells of patient MS1 (carrying p.R197X), suggesting that the nonsense mutation occurred on the paternal allele (fig. 6D).

Discussion

The findings that (1) HCCS maps within the smallest MLS critical region—that is, HCCS is deleted in all patients carrying chromosomal abnormalities, (2) HCCS is partially deleted in two sisters with MLS and their asymp-

tomatic mother, and (3) loss-of-function point mutations occurred de novo in two patients with MLS provide strong evidence of the involvement of the holocytochrome *c*-type synthase in the pathogenesis of this syndrome. Thus, absence of heme-lyase activity in hemizygous human males is most likely the cause of their in utero lethality. Similarly, in vivo-generated deletions involving the equivalent critical MLS region in the mouse (MLS^d), encompassing *Hccs* as well as parts of *Mid1* and *Arhgap6*, lead to lethality of hemizygous, homozygous, and heterozygous embryos early in development. This lethality can be rescued by overexpression of the human HCCS gene from a BAC clone, providing proof that lethality is indeed due to loss of HCCS.³¹ Clearly, MLS belongs to the group of X-linked dominant male-lethal disorders, including, for example, incontinentia pigmenti and chondrodysplasia punctata 2.²²

Functional analysis of both the nonsense (p.R197X) and the missense (p.R217C) mutations revealed that (1) the 72 C-terminal amino acids are required for mitochondrial targeting and (2) arginine-217 seems to be necessary for proper function of HCCS. Consistently, an evolutionarily conserved motif located within residues 190–216 of human HCCS was shown to be important for sorting of heme lyases to the intermembrane space of mitochondria.²⁸ The arginine residue at position 217 is an invariant amino acid in all HCCS proteins and is located next to one of the two internal targeting signals (aa 190–216),²⁸ which suggests an important role of this residue for the integrity of the holocytochrome *c*-type synthase.

Dysfunction of assembly factors of the mitochondrial respiratory chain, such as the holocytochrome *c*-type synthase, are known to cause various conditions with typical symptoms of mitochondrial diseases, including myopathy, encephalomyopathy, or cardiomyopathy, with a variable age at disease onset.^{32,33} However, the data presented here show, for the first time (to our knowledge), that deficiency of a mitochondrial housekeeping enzyme implicated in OXPHOS may also cause a severe developmental disorder with microphthalmia, sclerocornea, and areas of aplastic skin. Thus, the complex phenotype of females with MLS raises the question of a possible second function of HCCS or its final product that is not directly related to OXPHOS.

The holocytochrome *c*-type synthase or heme lyase is located at the outer surface of the inner mitochondrial membrane and catalyzes the covalent attachment of heme to apocytochrome *c* (and *c*₁), which leads to the mature holocytochrome *c*.^{30,34} In *S. cerevisiae*, two heme lyases exist, the cytochrome *c*- (Cyc3p) and the cytochrome *c*₁-specific heme lyase (Cyt2p), whereas only a single heme lyase is required for maturation of both cytochrome *c* and *c*₁ in higher eukaryotes.^{11,13} Defects in either of the yeast heme lyases result in loss of respiratory growth of the respective strain.^{30,34}

Cytochrome *c* is released from mitochondria in response to a variety of intrinsic death-promoting stimuli, thereby

leading to caspase-dependent death or apoptosis.¹⁵ Subsequent binding of cytochrome *c* to the apoptotic protease-activating factor 1 (APAF-1) and the recruitment and activation of procaspase-9 cleaves other caspases to execute apoptosis.³⁵ Mice deficient for cytochrome *c* as well as knock-in mice expressing a mutant cytochrome *c*, which retains its normal electron transfer function but is unable to activate APAF-1, die perinatally because of severe developmental defects. Cells derived from both mice show defects in apoptosis, because they are unable to form the active apoptosome.^{36,37} Apoptosis is important for proper neuronal development—for example, normal eye and brain development and impaired programmed cell death can lead to severe developmental defects in human and/or mouse.^{38–42} In the same line, a mutant strain of *S. cerevisiae* lacking the cytochrome *c*-specific heme lyase Cyc3p is more resistant to death than the wild type,⁴³ which suggests that the mature form of cytochrome *c* is required for programmed cell death in yeast. Indeed, accumulation of apocytochrome *c* in the cytosol eukaryotic cells has been shown to cause inhibition of caspase-mediated apoptosis.⁴⁴ Together, these data suggest that the release of mature cytochrome *c* is important for programmed cell death, both in eukaryotic cells and in yeast. Accordingly, loss-of-function mutations of *HCCS* in human are not only supposed to give rise to severe functional deficits in OXPHOS in cells and tissues that rely mainly on mitochondrial energy supply, but they may also cause severe constraints in the process of apoptosis. However, elimination of key components of the intrinsic apoptotic cascade will not prevent cell death, since caspase-independent or nonapoptotic death—namely apoptosis-like death, autophagic cell death, or necrosis—can still occur.⁴⁵ Thus, absence of components forming the apoptosome, such as cytochrome *c*, will possibly result in a switch from apoptosis to selective cell loss with a necrotic morphology.⁴⁶ This type of caspase-independent cell death is characterized by loss of the mitochondrial transmembrane potential, low intracellular ATP concentrations, and generation of reactive oxygen species that occurred on disruption of the mitochondrial electron-transport chain.^{47–50} Remarkably, necrosis has even been found to substitute for caspase-dependent apoptosis during embryonic development.^{51,52} Thus, we speculate that the majority of cells lacking a functional copy of *HCCS* in heterozygous females will die because of severe defects in OXPHOS. Nonetheless, mitochondrial dysfunction and the resulting ATP depletion, along with lack of holocytochrome *c*, which is required to form the apoptosome, may push *HCCS*-deficient cells toward necrosis. It is of note that cell demise by necrosis bears the danger of provoking a chronic chain reaction of inflammation, with substantial damage to neighboring cells.^{53,54}

In conclusion, our data show, for the first time, that mutations in *HCCS* are associated with the MLS phenotype. Implication of cytochrome *c*—the final *HCCS* product—in both OXPHOS and caspase-dependent apoptosis

suggests that disturbance of the balance between necrosis and apoptosis may be a key element in the development of MLS symptoms in affected females. Further studies are required for better understanding of the contribution of pathogenic *HCCS* mutations and the individual pattern of X inactivation in the development of MLS.

Acknowledgments

We are grateful to the patients and their parents. We thank Cordula Steglich and Karin Ziegler, for skillful technical assistance; Thomas Rau, for help with confocal microscopy; Birgit Wilttschi (MPI Biochemie, Martinsried, Germany), for kindly providing plasmid pYEX4Tps; and Jaclyn Renfrow and Fred Sherman (both from Department of Biochemistry and Biophysics, University of Rochester Medical School, Rochester, NY), for yeast strains B-8025 and B-7553, as well as plasmids pAB268, pAB256, and pAB790. We also thank Annick Raas-Rothschild (Department of Human Genetics, Hadassah University Hospital, Jerusalem) for the characterization of patient II.7 and helpful discussion. This work was supported by grants from the Wilhelm-Sander-Stiftung (2003.160.1) (to K.K.) and the Telethon Foundation (to B.F.).

Web Resources

Accession numbers and URLs for data presented herein are as follows:

GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/> (for *HCCS* [accession number NM_005333], *RPP30* [accession number NM_006413], and *HCCS* cDNA clone DKFZp779I1858 [accession number CR749578])

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/> (for MLS phenotypes)

RZPD German Resource Center for Genome Research, <http://www.rzpd.de/>

References

1. Van den Veyver IB (2002) Microphthalmia with linear skin defects (MLS), Aicardi, and Goltz syndromes: are they related X-linked dominant male-lethal disorders? *Cytogenet Genome Res* 99:289–296
2. Bird LM, Krous HF, Eichenfield LF, Swalwell CI, Jones MC (1994) Female infant with oncocyctic cardiomyopathy and microphthalmia with linear skin defects (MLS): a clue to the pathogenesis of oncocyctic cardiomyopathy? *Am J Med Genet* 53: 141–148
3. Happle R, Daniels O, Koopman RJ (1993) MIDAS syndrome (microphthalmia, dermal aplasia, and sclerocornea): an X-linked phenotype distinct from Goltz syndrome. *Am J Med Genet* 47:710–713
4. Kherbaoui-Redouani L, Eschard C, Bednarek N, Morville P (2003) [Cutaneous aplasia, non compaction of the left ventricle and severe cardiac arrhythmia: a new case of MLS syndrome (microphthalmia with linear skin defects)]. *Arch Pediatr* 10:224–226
5. Morleo M, Pramparo T, Perone L, Gregato G, Le Caignec C, Mueller RE, Ogata T, Raas-Rothschild A, de Blois MC, Wilson LC, Zaidman G, Zuffardi O, Ballabio A, Franco B (2005) Microphthalmia with linear skin defects (MLS) syndrome: clin-

- ical, cytogenetic, and molecular characterization of 11 cases. *Am J Med Genet A* 137:190–198
6. Zvulunov A, Kachko L, Manor E, Shinwell E, Carmi R (1998) Reticulolinear aplasia cutis congenita of the face and neck: a distinctive cutaneous manifestation in several syndromes linked to Xp22. *Br J Dermatol* 138:1046–1052
 7. Wapenaar MC, Schiaffino MV, Bassi MT, Schaefer L, Chinault AC, Zoghbi HY, Ballabio A (1994) A YAC-based binning strategy facilitating the rapid assembly of cosmid contigs: 1.6 Mb of overlapping cosmids in Xp22. *Hum Mol Genet* 3:1155–1161
 8. Quaderi NA, Schweiger S, Gaudenz K, Franco B, Rugarli EL, Berger W, Feldman GJ, Volta M, Andolfi G, Gilgenkrantz S, Marion RW, Hennekam RC, Opitz JM, Muenke M, Ropers HH, Ballabio A (1997) Opitz G/BBB syndrome, a defect of midline development, is due to mutations in a new RING finger gene on Xp22. *Nat Genet* 17:285–291
 9. Schaefer L, Prakash S, Zoghbi HY (1997) Cloning and characterization of a novel rho-type GTPase-activating protein gene (*ARHGAP6*) from the critical region for microphthalmia with linear skin defects. *Genomics* 46:268–277
 10. Prakash SK, Paylor R, Jenna S, Lamarche-Vane N, Armstrong DL, Xu B, Mancini MA, Zoghbi HY (2000) Functional analysis of ARHGAP6, a novel GTPase-activating protein for RhoA. *Hum Mol Genet* 9:477–488
 11. Schaefer L, Ballabio A, Zoghbi HY (1996) Cloning and characterization of a putative human holocytochrome c-type synthetase gene (*HCCS*) isolated from the critical region for microphthalmia with linear skin defects (MLS). *Genomics* 34:166–172
 12. Schwarz QP, Cox TC (2002) Complementation of a yeast *CYC3* deficiency identifies an X-linked mammalian activator of apocytochrome c. *Genomics* 79:51–57
 13. Bernard DG, Gabilly ST, Dujardin G, Merchant S, Hamel PP (2003) Overlapping specificities of the mitochondrial cytochrome c and c₁ heme lyases. *J Biol Chem* 278:49732–49742
 14. Moraes CT, Diaz F, Barrientos A (2004) Defects in the biosynthesis of mitochondrial heme c and heme a in yeast and mammals. *Biochim Biophys Acta* 1659:153–159
 15. Jiang X, Wang X (2004) Cytochrome c-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem* 73:87–106
 16. Allanson J, Richter S (1991) Linear skin defects and congenital microphthalmia: a new syndrome at Xp22.2. *J Med Genet* 28:143–144
 17. Kutsche K, Werner W, Bartsch O, von der Wense A, Meinecke P, Gal A (2002) Microphthalmia with linear skin defects syndrome (MLS): a male with a mosaic paracentric inversion of Xp. *Cytogenet Genome Res* 99:297–302
 18. Lindsay EA, Grillo A, Ferrero GB, Roth EJ, Magenis E, Grompe M, Hulten M, Gould C, Baldini A, Zoghbi HY, Ballabio A (1994) Microphthalmia with linear skin defects (MLS) syndrome: clinical, cytogenetic, and molecular characterization. *Am J Med Genet* 49:229–234
 19. Cape CJ, Zaidman GW, Beck AD, Kaufman AH (2004) Phenotypic variation in ophthalmic manifestations of MIDAS syndrome (microphthalmia, dermal aplasia, and sclerocornea). *Arch Ophthalmol* 122:1070–1074
 20. Kobayashi M, Kiyosawa M, Toyoura T, Tokoro T (1998) An XX male with microphthalmos and sclerocornea. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 35:122–124
 21. Kono T, Migita T, Koyama S, Seki I (1999) Another observation of microphthalmia in an XX male: microphthalmia with linear skin defects syndrome without linear skin lesions. *J Hum Genet* 44:63–68
 22. Franco B, Ballabio A (2006) X-inactivation and human disease: X-linked dominant male-lethal disorders. *Curr Opin Genet Dev* 16:254–259
 23. Van den Veyver IB (2001) Skewed X inactivation in X-linked disorders. *Semin Reprod Med* 19:183–191
 24. 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* 51:1229–1239
 25. Ito W, Ishiguro H, Kurosawa Y (1991) A general method for introducing a series of mutations into cloned DNA using the polymerase chain reaction. *Gene* 102:67–70
 26. Tong J, Margoliash E (1998) Cytochrome c heme lyase activity of yeast mitochondria. *J Biol Chem* 273:25695–25702
 27. Dumont ME, Schlichter JB, Cardillo TS, Hayes MK, Bethlenny G, Sherman F (1993) *CYC2* encodes a factor involved in mitochondrial import of yeast cytochrome c. *Mol Cell Biol* 13:6442–6451
 28. Diekert K, Kispal G, Guiard B, Lill R (1999) An internal targeting signal directing proteins into the mitochondrial intermembrane space. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:11752–11757
 29. Nagy E, Maquat LE (1998) A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends Biochem Sci* 23:198–199
 30. Dumont ME, Ernst JF, Hampsey DM, Sherman F (1987) Identification and sequence of the gene encoding cytochrome c heme lyase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 6:235–241
 31. Prakash SK, Cormier TA, McCall AE, Garcia JJ, Sierra R, Haupt B, Zoghbi HY, Van Den Veyver IB (2002) Loss of holocytochrome c-type synthetase causes the male lethality of X-linked dominant microphthalmia with linear skin defects (MLS) syndrome. *Hum Mol Genet* 11:3237–3248
 32. Shoubridge EA (2001) Nuclear genetic defects of oxidative phosphorylation. *Hum Mol Genet* 10:2277–2284
 33. Zeviani M, Di Donato S (2004) Mitochondrial disorders. *Brain* 127:2153–2172
 34. Dumont ME, Cardillo TS, Hayes MK, Sherman F (1991) Role of cytochrome c heme lyase in mitochondrial import and accumulation of cytochrome c in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 11:5487–5496
 35. Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407:770–776
 36. Hao Z, Duncan GS, Chang CC, Elia A, Fang M, Wakeham A, Okada H, Calzascia T, Jang Y, You-Ten A, Yeh WC, Ohashi P, Wang X, Mak TW (2005) Specific ablation of the apoptotic functions of cytochrome c reveals a differential requirement for cytochrome c and Apaf-1 in apoptosis. *Cell* 121:579–591
 37. Li K, Li Y, Shelton JM, Richardson JA, Spencer E, Chen ZJ, Wang X, Williams RS (2000) Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis. *Cell* 101:389–399
 38. Boya P, de la Rosa EJ (2005) Cell death in early neural life. *Birth Defects Res C Embryo Today* 75:281–293
 39. de la Rosa EJ, de Pablo F (2000) Cell death in early neural development: beyond the neurotrophic theory. *Trends Neurosci* 23:454–458
 40. Laemle LK, Puzkarczuk M, Feinberg RN (1999) Apoptosis in

- early ocular morphogenesis in the mouse. *Brain Res Dev Brain Res* 112:129–133
41. Schafer ZT, Kornbluth S (2006) The apoptosome: physiological, developmental, and pathological modes of regulation. *Dev Cell* 10:549–561
 42. Zeiss CJ (2003) The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet Pathol* 40:481–495
 43. Ludovico P, Rodrigues F, Almeida A, Silva MT, Barrientos A, Corte-Real M (2002) Cytochrome *c* release and mitochondria involvement in programmed cell death induced by acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 13:2598–2606
 44. Martin AG, Fearnhead HO (2002) Apocytocrome *c* blocks caspase-9 activation and Bax-induced apoptosis. *J Biol Chem* 277:50834–50841
 45. Kroemer G, Martin SJ (2005) Caspase-independent cell death. *Nat Med* 11:725–730
 46. Leist M, Jaattela M (2001) Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 589–598
 47. Bras M, Queenan B, Susin SA (2005) Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry (Mosc)* 70:231–239
 48. Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S, Nicotera P (1997) Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 185:1481–1486
 49. Nicotera P (2002) Apoptosis and age-related disorders: role of caspase-dependent and caspase-independent pathways. *Toxicol Lett* 127:189–195
 50. Nicotera P, Melino G (2004) Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene* 23:2757–2765
 51. Chautan M, Chazal G, Cecconi F, Gruss P, Golstein P (1999) Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway. *Curr Biol* 9:967–970
 52. Oppenheim RW, Flavell RA, Vinsant S, Prevette D, Kuan CY, Rakic P (2001) Programmed cell death of developing mammalian neurons after genetic deletion of caspases. *J Neurosci* 21:4752–4760
 53. Majno G, Joris I (1995) Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146:3–15
 54. Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL (2003) Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res* 283:1–16

Available online at www.sciencedirect.comEUROPEAN JOURNAL
OF
MEDICAL GENETICS

European Journal of Medical Genetics xx (2007) 1–11

<http://www.elsevier.com/locate/ejmg>

Original article

Mother and daughter with a terminal Xp deletion: Implication of chromosomal mosaicism and X-inactivation in the high clinical variability of the microphthalmia with linear skin defects (MLS) syndrome

Isabella Wimplinger^a, Anita Rauch^b, Ulrike Orth^a,
Ulrich Schwarzer^c, Udo Trautmann^b, Kerstin Kutsche^{a,*}

^a *Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Campus Forschung, Gebäude 146,
Martinistrasse 52, D-20246 Hamburg, Germany*

^b *Institute of Human Genetics, University Hospital Erlangen, Friedrich-Alexander University,
Erlangen-Nuremberg, Erlangen, Germany*

^c *Pediatric Department of the Hospital Nuremberg, Nuremberg, Germany*

Received 22 May 2007; accepted 9 July 2007

Abstract

The microphthalmia with linear skin defects (MLS or MIDAS) syndrome is a rare X-linked dominant inherited disorder with male lethality, associated with segmental aneuploidy of the Xp22.2 region in most of the cases. However, we recently described heterozygous sequence alterations in a single gene, *HCCS*, in females with MLS. Beside the classical MLS phenotype, occasional features such as sclerocornea, agenesis of the corpus callosum, and congenital heart defects can occur. Although the majority of cases are sporadic, mother-to-daughter transmission has been observed and a high intra- and interfamilial phenotypic variability exists. We describe an asymptomatic mother and her daughter presenting with the typical features of MLS syndrome. By cytogenetic analysis both females were found to have a terminal Xp deletion with the breakpoint in Xp22.2, mapping near to or within the *MSL3LI* gene which is located centromeric to *HCCS*. FISH analysis revealed that the mother is a mosaic with 45,X[11]/46,X,del(X)(p22.2)[89], while in all cells of the MLS-affected daughter a hybridization pattern consistent

* Corresponding author: Tel.: +49 40 42803 4597; fax: +49 40 42803 5138.

E-mail address: kkutsche@uke.uni-hamburg.de (K. Kutsche).

with a 46,X,del(X)(p22.2) karyotype was detected. By haplotype analysis we identified the paternal X chromosome of the mother to carry the terminal Xp deletion. X-inactivation studies showed a completely skewed pattern in mother and daughter with the deleted X chromosome to be preferentially inactivated in their peripheral blood cells. We suggest that both chromosomal mosaicism as well as functional X chromosome mosaicism could contribute to the lack of any typical MLS feature in individuals with a heterozygous MLS-associated mutation. The 45,X cell population, that most likely is also present in other tissues of the mother, might have protected her from developing MLS. Nonetheless, a non-random X-inactivation pattern in favor of activity of the wild-type X chromosome in the early blastocyte could also account for the apparent lack of any disease sign in this female.

© 2007 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: MIDAS; Xp deletion; X-inactivation; Chromosomal mosaicism; Phenotypic variability

1. Introduction

The *Microphthalmia with Linear Skin defects syndrome* (MLS; OMIM #309801), also known as MIDAS (*Microphthalmia, Dermal Aplasia, Sclerocornea*) syndrome, is an X-linked dominant disease with *in utero* male lethality. This neurocutaneous disorder is characterized by unilateral or bilateral microphthalmia and linear skin defects limited to the face and neck. Aplastic skin defects heal after birth, frequently to form hyperpigmented areas. Additional more variable features include sclerocornea, agenesis of the corpus callosum, chorioretinal abnormalities, infantile seizures, congenital heart defects, mental retardation, and diaphragmatic hernia [26].

Conventional and molecular cytogenetic studies of the majority of patients with MLS revealed an XX complement with a variety of X-chromosomal aberrations resulting in segmental monosomy of the Xpter → p22 chromosomal region [1–3,11,14,17,20,24,25]. The MLS critical region has been delineated to 610 kb in Xp22.2 [28,29] and includes the three genes *MIDI*, *HCCS*, and *ARHGAP6*. Recently, we reported heterozygous *de novo* point mutations in *HCCS*, encoding the mitochondrial holocytochrome *c*-type synthase, as well as a microdeletion encompassing part of *HCCS* to be associated with MLS [30].

Most of the patients with MLS display the classical phenotypic features; however, a high intra- and interfamilial clinical variability exists [2,14,17,30]. While some patients presented with the typical skin defects and did not show any ocular manifestation [5,13,14,31], other individuals showed microphthalmia but no aplastic skin areas [7,11,12]. It has been suggested that the pattern of X-inactivation may play a role in the development of the various symptoms seen in patients with MLS [8,27]. Skewed X-inactivation has been detected in 15 out of 16 MLS-affected patients analyzed to date ([20] and references therein; [3,6,22,30]). A single female patient with MLS showed a random X-inactivation pattern (patient 2 in [19]). She presented with bilateral microphthalmia, cloudy corneae, and patchy linear dermal hypoplasia with teleangiectases. Cytogenetic analysis revealed an XX complement with an Xpter-p22.3 deletion. In this patient, replication studies have been performed to determine the X-inactivation pattern; nonetheless, distinguishing between the wild-type and the derivative X chromosome can be difficult when using this technique [19].

In 1991 Allanson and Richter reported the first two cases with MLS and a high intrafamilial phenotypic variability. A female newborn with classical MLS symptoms, including

Please cite this article in press as: I. Wimplinger et al., Mother and daughter with a terminal Xp deletion: Implication of chromosomal mosaicism and X-inactivation in the high clinical variability of the microphthalmia with linear skin defects (MLS) syndrome, Eur. J. Med. Genet. (2007), doi:10.1016/j.ejmg.2007.07.004

microphthalmia, corneal opacities, and linear skin defects, was born to a healthy mother who only had a small area of patchy depigmented skin over one of her shoulders. Cytogenetic analysis revealed a terminal Xp deletion in both females [2]. In 1995, Mücke and colleagues described a girl and her mother, both with a 46,XX,t(X;Y)(p22.3;p11.2) karyotype, presenting with microphthalmia and dermal aplasia; however, additional clinical features greatly varied. While the mother had short stature and hypodontia, the daughter showed sclerocornea, a fore-brain defect with agenesis of the corpus callosum, craniofacial anomalies, and intersexual genitalia [17]. Recently, we reported a family with a mother and two of her daughters carrying an 8.6-kb deletion involving part of the *HCCS* gene [30]. The youngest daughter showed the classical MLS phenotype, whereas her elder sister only presented eye manifestations with a left opaque cornea, congenital glaucoma with total anterior synechia, and a white anterior cataract. On the right side she had a corneal leukoma. Another sister, who died from complications of a left diaphragmatic hernia after birth, had bilateral anophthalmia. In marked contrast, their mother showed no obvious sign of MLS and evidence for mosaicism could not be found [30]. Indeed, somatic mosaicism might be a possible explanation for a mild MLS phenotype or even the absence of any feature. For example, Lindsay and colleagues [14] described a mildly affected female with short stature and reticuloliner scar lesions on her neck. Routine chromosome analysis identified a 45,X/46,X,del(X)(p22.2) mosaic with 30% of cells harboring 45,X. This MLS-affected female had had an induced abortion of a female anencephalic fetus at 15 weeks of gestation with a 46,X,del(X)(p22.2) karyotype [14]. Nonetheless, in a female infant with the typical clinical manifestations of MLS and short stature a *de novo* mosaic with a 45,X[18]/46,X,r(X)(p22;q21)[24]/46,X,del(X)(p22)[58] karyotype was detected [20], suggesting that chromosomal mosaicism does not necessarily protect from a severe phenotype.

Here, we describe a 3-year-old girl with the typical signs and symptoms of MLS associated with a 46,X,del(X)(p22.2) karyotype, whereas her mother is a mosaic and does not show any apparent feature of MLS.

2. Material and methods

2.1. Case report

The female patient affected by MLS (Fig. 1A,B) is the offspring of a non-consanguineous couple aged 31 (mother) and 35 (father) years at delivery. Due to enlarged ventricles, revealed by first trimester ultrasound screening, karyotyping from a chorionic villi biopsy was performed and a normal female karyotype was initially reported. Delivery was induced 37 weeks of gestation because of suspected hydrocephaly. The proposita's birth weight was 2465 g (10th centile), her body length 44 cm (<3rd centile), and she had an OFC of 33 cm (25th centile). The newborn female showed bilateral microphthalmia, with the left eye more severely affected, persistent foramen ovale and agenesis of corpus callosum with enlarged occipital horn on MRI scan and left-sided mild cutaneous syndactyly of second and third toes. Ophthalmological examination revealed microphthalmia with sclerocornea of the right eye and agenesis of the left eye with cystic remnant (2–3 mm). In addition, a linear and patchy erythematous skin defect was noticed along her nose and right lateral neck and chin immediately after birth (Fig. 1A). These characteristic signs led to the clinical diagnosis of MLS syndrome. At the age of 8 weeks, the erythematous skin lesion had faded gradually (Fig. 1B). Developmental testing at the age of 23 months revealed normal speech development, but retarded statomotoric

Please cite this article in press as: I. Wimplinger et al., Mother and daughter with a terminal Xp deletion: Implication of chromosomal mosaicism and X-inactivation in the high clinical variability of the microphthalmia with linear skin defects (MLS) syndrome, Eur. J. Med. Genet. (2007), doi:10.1016/j.ejmg.2007.07.004



Fig. 1. Facial appearance of the patient with MLS having an Xp deletion and her unaffected mother with mosaic 45,X/46,X,del(X)(p22.2). (A) Note linear skin defects located on the face and neck of the patient after birth. (B) Appearance of the patient at the age of 8 weeks showing significant fading of the linear skin defects. Note bilateral microphthalmia with the left eye being more severely affected, while the right eye shows cloudy cornea (sclerocornea). (C, D) The patient's mother has normal eyes and skin but shows a low posterior hairline.

development as commonly seen in blind children. Short stature was still present at the age of 2 years 7 months (height 80 cm, <3rd centile; weight 11.4 kg, 10th centile).

The mother's height of 165 cm was relatively short in comparison with other relatives (both parents were 187 cm and her two brothers 187 cm and 198 cm). She also had a low posterior hairline (Fig. 1C), but showed no signs of microphthalmia or scars on her face and neck (Fig. 1D). The couple had two sons, one of whom suffered from isolated craniosynostosis. A third pregnancy resulted in a missed abortion of a male fetus at 14 weeks of gestation. The pedigree of the family is shown in Fig. 3.

2.2. Cytogenetic and molecular cytogenetic studies

Chromosome analysis was performed from peripheral blood lymphocytes after GTG-banding at a 500-band level according to standard techniques. Initial FISH experiments for detecting a terminal Xp deletion were performed using cosmid clones cos34F5 and 15D10 [23] (kindly provided by Peter Scambler, Molecular Medicine Unit, Institute of Child Health, London, UK), the subtelomeric probe GS-98-C4 (XYp) [10] (a gift from S.J. Knight, Wellcome Trust Centre for Human Genetics, Churchill Hospital, Headington, Oxford, UK), and the *KAL1* probe (Vysis, Abbott Diagnostika, Wiesbaden, Germany). Further delineation of the breakpoint was done by FISH using BAC clones RP11-121J12, RP11-299M10, RP11-797I1, and RP11-1L9 obtained from the Resource Center of the German Human Genome Project at the Max-Planck-Institute for Molecular Genetics, Berlin, Germany, whereas BAC clone GS1-602M16, from the Genome Systems Human BAC Library 1, was kindly provided by Ralf Sudbrak (Max-Planck Institute for Molecular Genetics, Berlin, Germany). Fosmid clones F-8895D8, F-00757H8, F-4734B1, F-8718D6, and F-7925A4 were received from the BACPAC Resource Center, Children's Hospital Oakland, CA, USA. BAC, cosmid and fosmid DNA was prepared using a Midiprep kit (QIAGEN, Hilden, Germany). DNA was labeled by nick translation using the CGH* Nick Translation Kit and Spectrum Green-dUTP (Vysis, Downers Grove, IL, USA) according to the protocol provided. Chromosomes were counterstained using diamidinophenylindole (Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Germany) and mounted in antifading solution (Vector Labs, Burlingame, CA, USA). Slides were analyzed with a Leica Axioscope fluorescence microscope. Images were merged using a cooled CCD camera (Pieper, Schwerte, Germany) and Cyto Vision software (Applied Imaging, San Jose, CA, USA).

Please cite this article in press as: I. Wimplinger et al., Mother and daughter with a terminal Xp deletion: Implication of chromosomal mosaicism and X-inactivation in the high clinical variability of the microphthalmia with linear skin defects (MLS) syndrome, *Eur. J. Med. Genet.* (2007), doi:10.1016/j.ejmg.2007.07.004

2.3. Microsatellite analysis

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes of the patient's mother and her maternal grandparents by standard procedures. Haplotype analysis was performed using eight polymorphic microsatellite markers (*DXS1060* in Xp22.32, tel-*CxM29-CxM02-CxM14-CxM23-DXS987-DXS1214*-cen in the Xp22.2-p21.2 region and *DXS1227* in Xq27.2). PCR products were amplified using fluorescent-labeled primers (FAM: *DXS987* and *DXS1227*; HEX: *DXS1214*; TET: *DXS1060*) following standard methods and electrophoresed on an ABI Prism 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). Results were processed by the Genescan software (PE Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). For markers *CxM29*, *CxM02*, *CxM14*, and *CxM23* amplicons were electrophoresed on an 8% polyacrylamide gel at 400 V for ~2 h. Bands were detected by silver staining. PCR conditions and primer sequences are available on request.

2.4. X-inactivation assay

Examination of the methylation pattern at the *AR* locus was performed as previously described [30].

3. Results and discussion

By conventional chromosome analysis we detected a terminal Xp deletion in the 3-year-old female patient with MLS, with the karyotype 46,X,del(X)(p22.31). FISH analysis with probes for the subtelomeric region of Xp, *SHOX* and *KAL*, confirmed the terminal deletion (data not shown). To fine-map the breakpoint, we performed FISH with various BAC and fosmid clones from and nearby the MLS critical region and identified fosmid F-00757H8 hybridizing distal and F-8718D6 proximal to the breakpoint in Xp22.2 (Fig. 2A and data not shown). Subsequently, we identified the breakpoint spanning fosmid F-4734B1 (Fig. 2B) which encompasses part of the *MSL3L1* gene. The size of the terminal deletion was estimated to cover ~11.5 Mb, including the genes *HCCS*, mutated in MLS, *ARHGAP6*, *AMELX*, and probably a few exons of *MSL3L1* (Fig. 2A).

To examine if the Xp deletion found in the patient with MLS occurred *de novo*, we performed cytogenetic analysis of her parents. While the paternal karyotype was normal, the mother, who has no obvious signs of MLS, turned out to carry the same terminal Xp deletion as her daughter in 10 metaphases analyzed (data not shown). Karyotypes of the maternal grandparents were normal (data not shown). We performed FISH analysis on metaphase spreads of the proposita's mother using fosmid clones from the MLS critical region (see above). The same results as detected in the affected daughter were obtained (data not shown) suggesting the presence of an identical deletion [46,X,del(X)(p22.2)] in the mother.

The fact that both mother and daughter have the same Xp deletion raised the question why the mother is asymptomatic compared with her MLS-affected daughter. Microphthalmia had been excluded in the mother by ultrasound and no skin lesions had been noticed at birth. Although it has been suggested that the variable phenotype observed in patients with MLS may be the result of tissue specific X-inactivation patterns [8,14], chromosomal mosaicism could also explain the lack of any MLS-specific sign in the mother. Therefore, we performed 2-color FISH analysis on metaphase spreads of both females using the Xp subtelomeric GS-98-C4 probe and an X chromosomal centromeric probe. In the daughter, two centromeric signals

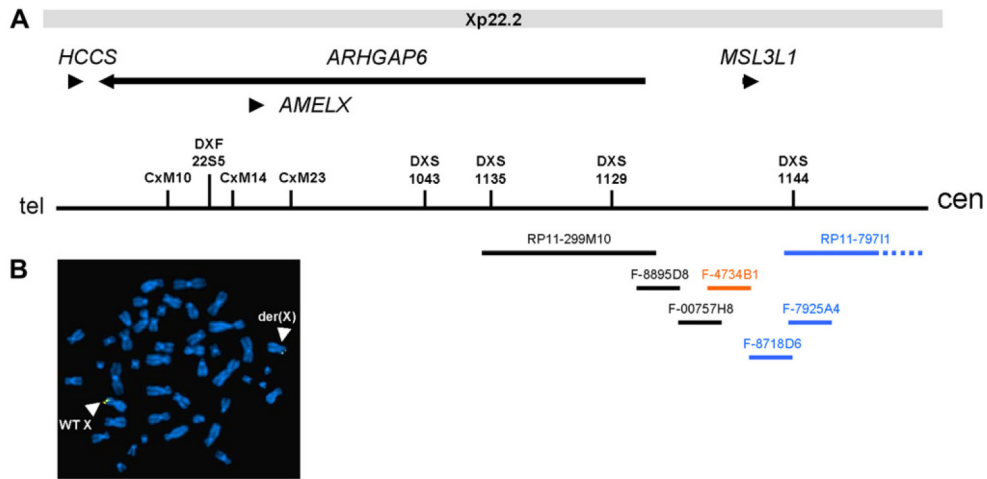


Fig. 2. Mapping of the deletion breakpoint in Xp22.2. (A) Schematic representation of the breakpoint area in Xp22.2. Arrows and arrowheads represent genes (not drawn to scale) and their orientation from telomere (tel) to centromere (cen). Names and positions of DNA markers previously mapped in this region are indicated. Bottom lines indicate BAC and fosmid clones used for FISH analysis. While clones hybridizing distal and proximal to the breakpoint are indicated in black and blue, respectively, the breakpoint spanning fosmid is indicated in red. (B) FISH with fosmid F-4734B1 produced strong signals on the wild-type X chromosome (WT X), while only faint signals were observed on the X chromosome with the terminal deletion [der(X)]. Arrowheads point to fluorescence signals. Probes were labeled by FITC (green) and chromosomes were counterstained with DAPI (blue).

and only one subtelomeric signal (on the wild-type X chromosome) were present in 100 analyzed metaphases (data not shown), indicating that the terminal Xp deletion is present in all cells. However, when we re-investigated the mother, we detected one centromeric and one subtelomeric signal on a single X chromosome in 11 out of 100 metaphases, while in the other 89 cells the same hybridization pattern as found in the daughter was observed (data not shown). These data suggest that the mother was a chromosomal mosaic with 11% of lymphocyte cells with only one normal X chromosome and loss of the derivative one, as well as 89% of cells with both wild-type and a terminally deleted X chromosome. Thus, the karyotype of the mother was corrected to 45,X[11]/46,X,del(X)(p22.2)[89].

To determine the parental origin of the X chromosome with the terminal deletion in the patient's mother, we performed haplotype analysis in the mother of the patient (II.1) and the patient's maternal grandmother (I.1) and grandfather (I.2) using various polymorphic markers, including *CxM29*, *CxM02*, *CxM14*, *CxM23*, and *DXS987* that are located in the Xp22.2 region containing the deletion breakpoint (Fig. 3). The mother of the patient with MLS (II.1 in Fig. 3) was heterozygous for markers *DXS987*, *DXS1214*, and *DXS1227*, in contrast, for five more distally located markers (*DXS1060*, *CxM29*, *CxM02*, *CxM14*, and *CxM23*) only maternal alleles were detected (Fig. 3). These data suggest that (i) the terminal Xp deletion occurred on the paternal X chromosome and (ii) the single wild-type X chromosome in the 45,X cell line is of maternal origin.

We studied X-inactivation in the MLS-affected patient (III.3), her mother (II.1), and her maternal grandmother (I.1) by using the methylation-specific PCR at the polymorphic *AR* locus (Fig. 4). Both the female infant with MLS and her mother showed a completely skewed X-inactivation (0:100) in their lymphocytes (II.1 and III.3 in Fig. 4). In contrast, the patient's

Please cite this article in press as: I. Wimplinger et al., Mother and daughter with a terminal Xp deletion: Implication of chromosomal mosaicism and X-inactivation in the high clinical variability of the microphthalmia with linear skin defects (MLS) syndrome, Eur. J. Med. Genet. (2007), doi:10.1016/j.ejmg.2007.07.004

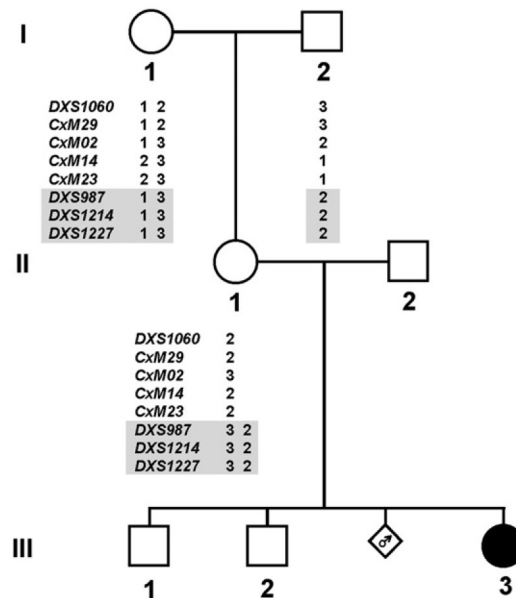


Fig. 3. Three-generation pedigree of the family and haplotype analysis in the mother (II.1) of the MLS-affected patient and her parents (I.1 and I.2). The mother (II.1) carried only maternal alleles for markers *DXS1060* (Xp22.32), *CxM29*, *CxM02*, *CxM14*, and *CxM23* (all in Xp22.2), while she was heterozygous for markers *DXS987* (Xp22.2), *DXS1214* (Xp21.2), and *DXS1227* (Xq27.2), highlighted by a light gray box.

maternal grandmother exhibited a random pattern of X-inactivation (43:57) (I.1 in Fig. 4). The MLS-affected patient (III.3) inherited the larger allele (286 bp), which turned out to be inactivated in all cells, from her mother indicating that this X chromosome contains the terminal deletion. Consistently, the same X chromosomal allele was found to be preferentially inactivated in all peripheral blood cells of the mother (II.1) (Fig. 4). The maternal grandmother of the patient (I.1) did not have the 286-bp allele, indicating that the deletion occurred on the paternal X chromosome as already reasoned from haplotype analysis. Taken together, X-inactivation analysis showed preferential inactivation of the X chromosome carrying the terminal deletion in peripheral blood cells of both the MLS-affected female infant and her normal mother.

Mother-to-daughter transmission and high intrafamilial phenotypic variability have been described in patients with MLS syndrome [2,14,17,30]. In two familial cases, the mothers showed only minor or no clinical signs, although they carry the same genetic lesion as their severely affected daughter(s) and somatic mosaicism could not be detected [2,30]. Nonetheless, a complex chromosomal mosaic has been found in a female patient with the classical MLS phenotype [20], suggesting that other factors might also contribute to manifestation of the disease. As frequently discussed, variable X-inactivation in different tissues may account for the variable severity of the phenotype [8,9,14,20]. The great majority of females heterozygous for a genetic defect associated with MLS showed a skewed X-inactivation pattern in peripheral blood cells ([20] and references therein; [3,6,22,30]). Accordingly, preferential X-inactivation of the X chromosome with the deletion was found in both mother and daughter described here. Selective disadvantage for rapidly dividing cells (e.g. blood cells) keeping the mutated X chromosome active has been suggested that gives rise to a skewed X-inactivation pattern in patients with MLS [14]. Indeed, the *HCCS* gene product is supposed to act in a cell-autonomous manner, therefore, functional

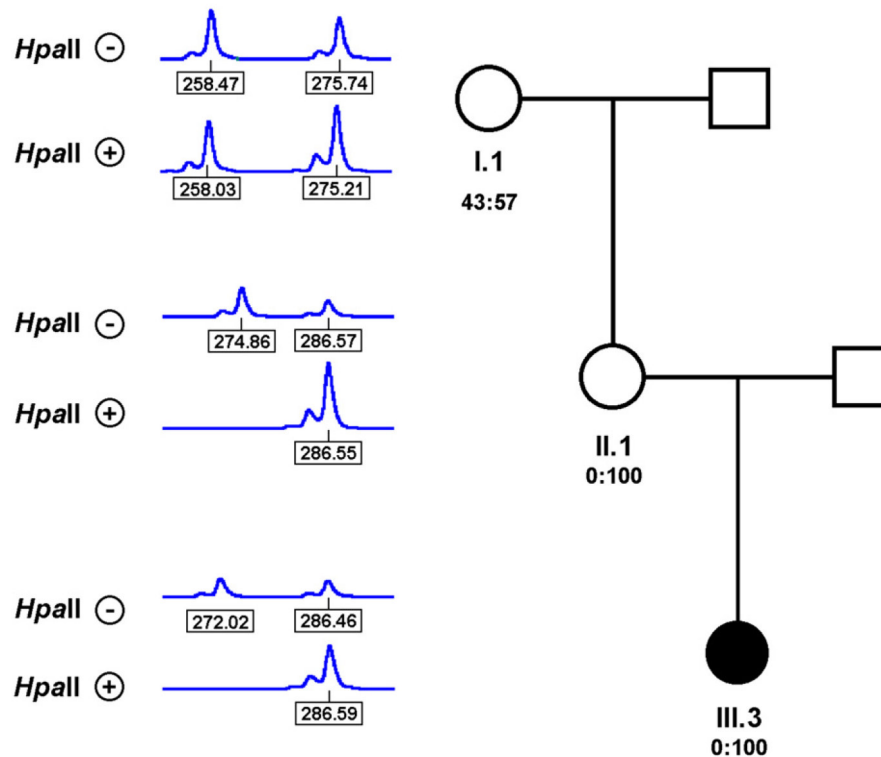


Fig. 4. Partial pedigree of the family and skewed X-inactivation in females with a terminal Xp deletion. X chromosome inactivation was determined by amplification of an *AR* sequence polymorphism and *Hpa*II digestion of genomic DNA isolated from lymphocytes (indicated with + or -). The ratio of the X-inactivation pattern (peak area of the shorter to longer allele) is given below the respective pedigree symbol. Both females carrying a terminal Xp deletion, II.1 and III.3, showed completely skewed X-inactivation, while the maternal grandmother of the MLS-affected individual (I.1) showed a random pattern.

nullisomy should result in selective cell loss and a skewed X-inactivation pattern in various tissues of heterozygous females. However, cell selection mechanisms may vary in diverse tissues [14] and during embryonic development organs like brain, eye, and skin may have problems to get rid of those cells which are supposed to die due to an active X chromosome carrying the MLS-associated mutation [8]. Recently, cell selection mechanisms during specific stages of development and in different tissues have been suggested to result in skewed X-inactivation in females carrying a mutation in a gene for X-linked mental retardation [18].

We have previously hypothesized that cell death of *HCCS*-deficient cells may be pushed toward necrosis as these cells are not any more able to die via cytochrome *c*-mediated apoptosis [30]. Necrosis bears the danger of inflammatory processes causing dramatic injury of neighboring cells in various tissues. Thus, the demise of *HCCS*-deficient cells by non-apoptotic cell death during embryogenesis or differentiation processes may cause severe deterioration of the affected tissue (e.g. linear skin defects and eye abnormalities) [30]. In fact, in a female embryo heterozygous for an *HCCS* mutation an average of 50% of cells, those with the mutated X chromosome active, undergoes respiratory problems due to severely disturbed oxidative phosphorylation. These cells are possibly supposed to die (e.g. by necrosis) in several tissues that may cause trouble for the respective cell population and result in MLS-typical features.

Please cite this article in press as: I. Wimplinger et al., Mother and daughter with a terminal Xp deletion: Implication of chromosomal mosaicism and X-inactivation in the high clinical variability of the microphthalmia with linear skin defects (MLS) syndrome, Eur. J. Med. Genet. (2007), doi:10.1016/j.ejmg.2007.07.004

However, stochastic variation leading to unequal distribution of the two cell populations may cause a non-random pattern of X-inactivation in the early embryo [4,16]. Thus, a female embryo having the mutated X chromosome active in the majority of cells, once the X-inactivation process has been initiated, will probably develop the classic MLS phenotype and vice versa. Consequently, one factor for the normal development of the MLS-affected patient's mother may be non-random X-inactivation in favor of activity of the wild-type X chromosome at an early time point during embryonic development.

Besides skewed X-inactivation in the early developing embryo, chromosomal mosaicism could also explain the apparent lack of MLS-specific features in the mother of the patient. The 45,X cell line was found in about 10% of her peripheral blood cells and it is likely that also other tissues are mosaic. The 45,X/46,X,del(X)(p22.2) mosaicism probably resulted from a postzygotic mitotic loss of the paternal X chromosome carrying the terminal deletion [15]. Thus, the cell population with 46,X,del(X)(p22.2) and an active wild-type X chromosome as well as cells with a 45,X karyotype might have protected the mother from an MLS phenotype. Similarly, chromosomal mosaicism could also account for the apparent lack of Turner syndrome features in the mother, except for the low posterior hairline and relative short stature. However, the short stature phenotype of patients with Turner syndrome has been primarily ascribed to haploinsufficiency of the pseudoautosomal *SHOX* gene [21].

In summary, we suggest that somatic mosaicism might be one factor protecting from an MLS phenotype in females heterozygous for a terminal Xp deletion or an *HCCS* mutation. Nonetheless, non-random X-inactivation in favor of the active wild-type X chromosome in the early embryo might be even more important for development of a mild MLS phenotype or the absence of any obvious clinical feature in these females.

Acknowledgements

We are grateful to the family who participated in this study. The results summarized here are part of the Ph.D. thesis of I.W. at the University of Hamburg. We thank Karin Ziegler and Michaela Kirsch for skillful technical assistance. This work was supported by a grant from the Wilhelm Sander-Stiftung (2003.160.1 to K.K.).

References

- [1] L.I. Al-Gazali, R.F. Mueller, A. Caine, A. Antoniou, A. McCartney, M. Fitchett, N.R. Dennis, Two 46,XX,t(X;Y) females with linear skin defects and congenital microphthalmia: a new syndrome at Xp22.3, *J. Med. Genet.* 27 (1990) 59–63.
- [2] J. Allanson, S. Richter, Linear skin defects and congenital microphthalmia: a new syndrome at Xp22.2, *J. Med. Genet.* 28 (1991) 143–144.
- [3] A. Anguiano, X. Yang, J.K. Felix, J.J. Hoo, Twin brothers with MIDAS syndrome and XX karyotype, *Am. J. Med. Genet A* 119 (2003) 47–49.
- [4] J.W. Belmont, Genetic control of X inactivation and processes leading to X-inactivation skewing, *Am. J. Hum. Genet.* 58 (1996) 1101–1108.
- [5] L.M. Bird, H.F. Krous, L.F. Eichenfield, C.I. Swalwell, M.C. Jones, Female infant with oncocytic cardiomyopathy and microphthalmia with linear skin defects (MLS): a clue to the pathogenesis of oncocytic cardiomyopathy? *Am. J. Med. Genet.* 53 (1994) 141–148.
- [6] C.C. Cain, D. Saul, L. Attanasio, E. Oehler, A. Hamosh, K. Blakemore, G. Stetten, Microphthalmia with linear skin defects (MLS) syndrome evaluated by prenatal karyotyping, FISH and array comparative genomic hybridization, *Prenat. Diagn* 27 (2007) 373–379.

Please cite this article in press as: I. Wimplinger et al., Mother and daughter with a terminal Xp deletion: Implication of chromosomal mosaicism and X-inactivation in the high clinical variability of the microphthalmia with linear skin defects (MLS) syndrome, *Eur. J. Med. Genet.* (2007), doi:10.1016/j.ejmg.2007.07.004

- [7] C.J. Cape, G.W. Zaidman, A.D. Beck, A.H. Kaufman, Phenotypic variation in ophthalmic manifestations of MIDAS syndrome (microphthalmia, dermal aplasia, and sclerocornea), *Arch. Ophthalmol* 122 (2004) 1070–1074.
- [8] B. Franco, A. Ballabio, X-inactivation and human disease: X-linked dominant male-lethal disorders, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16 (2006) 254–259.
- [9] R. Happle, X-chromosome inactivation: role in skin disease expression, *Acta Paediatr. Suppl* 95 (2006) 16–23.
- [10] S.J. Knight, C.M. Lese, K.S. Precht, J. Kuc, Y. Ning, S. Lucas, R. Regan, M. Brenan, A. Nicod, N.M. Lawrie, D.L. Cardy, H. Nguyen, T.J. Hudson, H.C. Riethman, D.H. Ledbetter, J. Flint, An optimized set of human telomere clones for studying telomere integrity and architecture, *Am. J. Hum. Genet.* 67 (2000) 320–332.
- [11] M. Kobayashi, M. Kiyosawa, T. Toyoura, T. Tokoro, An XX male with microphthalmos and sclerocornea, *J. Pediatr. Ophthalmol. Strabismus* 35 (1998) 122–124.
- [12] T. Kono, T. Migita, S. Koyama, I. Seki, Another observation of microphthalmia in an XX male: microphthalmia with linear skin defects syndrome without linear skin lesions, *J. Hum. Genet.* 44 (1999) 63–68.
- [13] K. Kutsche, W. Werner, O. Bartsch, A. von der Wense, P. Meinecke, A. Gal, Microphthalmia with linear skin defects syndrome (MLS): a male with a mosaic paracentric inversion of Xp, *Cytogenet. Genome Res.* 99 (2002) 297–302.
- [14] E.A. Lindsay, A. Grillo, G.B. Ferrero, E.J. Roth, E. Magenis, M. Grompe, M. Hulten, C. Gould, A. Baldini, H.Y. Zoghbi, et al., Microphthalmia with linear skin defects (MLS) syndrome: clinical, cytogenetic, and molecular characterization, *Am. J. Med. Genet.* 49 (1994) 229–234.
- [15] O. Martinez-Pasarell, C. Templado, E. Vicens-Calvet, J. Egozcue, C. Nogues, Paternal sex chromosome aneuploidy as a possible origin of Turner syndrome in monozygotic twins: case report, *Hum. Reprod* 14 (1999) 2735–2738.
- [16] B.R. Migeon, Non-random X chromosome inactivation in mammalian cells, *Cytogenet. Cell Genet.* 80 (1998) 142–148.
- [17] J. Mücke, W. Hoepffner, B. Thamm, H. Theile, MIDAS syndrome (microphthalmia, dermal aplasia and sclerocornea): an autonomous entity with linear skin defects within the spectrum of focal hypoplasias, *Eur. J. Dermatol* 5 (1995) 197–203.
- [18] M.R. Muers, J.A. Sharpe, D. Garrick, J. Sloane-Stanley, P.M. Nolan, T. Hacker, W.G. Wood, D.R. Higgs, R.J. Gibbons, Defining the cause of skewed X-chromosome inactivation in X-linked mental retardation by use of a mouse model, *Am. J. Hum. Genet.* 80 (2007) 1138–1149.
- [19] K. Naritomi, Y. Izumikawa, S. Nagataki, Y. Fukushima, K. Wakui, N. Niikawa, K. Hirayama, Combined Goltz and Aicardi syndromes in a terminal Xp deletion: are they a contiguous gene syndrome? *Am. J. Med. Genet.* 43 (1992) 839–843.
- [20] T. Ogata, K. Wakui, K. Muroya, H. Ohashi, N. Matsuo, D.M. Brown, T. Ishii, Y. Fukushima, Microphthalmia with linear skin defects syndrome in a mosaic female infant with monosomy for the Xp22 region: molecular analysis of the Xp22 breakpoint and the X-inactivation pattern, *Hum. Genet.* 103 (1998) 51–56.
- [21] E. Rao, B. Weiss, M. Fukami, A. Rump, B. Niesler, A. Mertz, K. Muroya, G. Binder, S. Kirsch, M. Winkelmann, G. Nordsiek, U. Heinrich, M.H. Breuning, M.B. Ranke, A. Rosenthal, T. Ogata, G.A. Rappold, Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome, *Nat. Genet.* 16 (1997) 54–63.
- [22] C. Schluth, M. Cossee, F. Girard-Lemaire, N. Carelle, H. Dollfus, E. Jeandidier, E. Flori, Phenotype in X chromosome rearrangements: pitfalls of X inactivation study, *Pathol. Biol.* 55 (2007) 29–36.
- [23] D.J. Shears, H.J. Vassal, F.R. Goodman, R.W. Palmer, W. Reardon, A. Superti-Furga, P.J. Scambler, R.M. Winter, Mutation and deletion of the pseudoautosomal gene SHOX cause Leri-Weill dyschondrosteosis, *Nat. Genet.* 19 (1998) 70–73.
- [24] R.F. Stratton, C.A. Walter, B.R. Paulgar, M.E. Price, C.M. Moore, Second 46,XX male with MLS syndrome, *Am. J. Med. Genet.* 76 (1998) 37–41.
- [25] I.K. Temple, J.A. Hurst, S. Hing, L. Butler, M. Baraitser, De novo deletion of Xp22.2-pter in a female with linear skin lesions of the face and neck, microphthalmia, and anterior chamber eye anomalies, *J. Med. Genet.* 27 (1990) 56–58.
- [26] I.B. Van den Veyver, Microphthalmia with linear skin defects (MLS), Aicardi, and Goltz syndromes: are they related X-linked dominant male-lethal disorders? *Cytogenet. Genome Res.* 99 (2002) 289–296.
- [27] I.B. Van den Veyver, Skewed X inactivation in X-linked disorders, *Semin. Reprod. Med* 19 (2001) 183–191.
- [28] M.C. Wapenaar, M.T. Bassi, L. Schaefer, A. Grillo, G.B. Ferrero, A.C. Chinault, A. Ballabio, H.Y. Zoghbi, The genes for X-linked ocular albinism (OA1) and microphthalmia with linear skin defects (MLS): cloning and characterization of the critical regions, *Hum. Mol. Genet.* 2 (1993) 947–952.

Please cite this article in press as: I. Wimplinger et al., Mother and daughter with a terminal Xp deletion: Implication of chromosomal mosaicism and X-inactivation in the high clinical variability of the microphthalmia with linear skin defects (MLS) syndrome, *Eur. J. Med. Genet.* (2007), doi:10.1016/j.ejmg.2007.07.004

- [29] M.C. Wapenaar, M.V. Schiaffino, M.T. Bassi, L. Schaefer, A.C. Chinault, H.Y. Zoghbi, A. Ballabio, A YAC-based binning strategy facilitating the rapid assembly of cosmid contigs: 1.6 Mb of overlapping cosmids in Xp22, *Hum. Mol. Genet.* 3 (1994) 1155–1161.
- [30] I. Wimplinger, M. Morleo, G. Rosenberger, D. Iaconis, U. Orth, P. Meinecke, I. Lerer, A. Ballabio, A. Gal, B. Franco, K. Kutsche, Mutations of the mitochondrial holocytochrome c-type synthase in X-linked dominant microphthalmia with linear skin defects syndrome, *Am. J. Hum. Genet.* 79 (2006) 878–889.
- [31] A. Zvulunov, L. Kachko, E. Manor, E. Shinwell, R. Carmi, Reticulolinear aplasia cutis congenita of the face and neck: a distinctive cutaneous manifestation in several syndromes linked to Xp22, *Br. J. Dermatol* 138 (1998) 1046–1052.

Please cite this article in press as: I. Wimplinger et al., Mother and daughter with a terminal Xp deletion: Implication of chromosomal mosaicism and X-inactivation in the high clinical variability of the microphthalmia with linear skin defects (MLS) syndrome, *Eur. J. Med. Genet.* (2007), doi:10.1016/j.ejmg.2007.07.004



***HCCS* loss-of-function missense mutation in a female with bilateral microphthalmia and sclerocornea: a novel gene for severe ocular malformations?**

Isabella Wimplinger,¹ Gary M. Shaw,² Kerstin Kutsche¹

¹Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany; ²March of Dimes Research Division, Oakland, CA

Purpose: To analyze if mutations in *HCCS*, encoding the mitochondrial holocholesterol *c*-type synthase, are associated with phenotypes other than the microphthalmia with linear skin defects (MLS) syndrome, including severe eye malformations such as microphthalmia and/or anophthalmia. In addition, we investigated the impact of the p.E159K missense mutation on sorting of *HCCS* to mitochondria and its functional integrity.

Methods: In a cohort of 27 females obtained from a population-based study on infants and fetuses with congenital eye malformations we performed mutation analysis of *HCCS* by PCR amplification of the coding exons and direct sequencing. The X-inactivation pattern was determined by analyzing the methylation pattern at the *AR* locus in one patient. For functional analysis of the identified missense mutation, we transfected CHO-K1 cells with wild-type *HCCS* or *HCCS* E159K mutant construct and analyzed subcellular localization of the expressed proteins by immunofluorescence analysis and confocal microscopy. Functional integrity of the mutated *HCCS* protein was investigated by complementation studies in yeast. Therefore, we ectopically expressed *HCCS* wild type and the E159K mutant in the *S. cerevisiae* strain B-8025, carrying a deletion of the *HCCS* ortholog *CYC3*, and analyzed the capacity of the yeast strain to grow on nonfermentable carbon sources.

Results: We detected the heterozygous c.475G>A mutation in exon 5 of *HCCS*, predicting an amino acid substitution of the highly conserved glutamate at position 159 by lysine, in a female presenting with bilateral microphthalmia and sclerocornea. This point mutation was not found on more than 460 X chromosomes. We identified a skewed X-inactivation in the patient's peripheral blood cells. Similar to *HCCS* wild type, ectopically expressed *HCCS* E159K was targeted to mitochondria in CHO-K1 cells. In contrast, expression of *HCCS* E159K did not complement respiratory growth of the *CYC3*-deficient yeast strain B-8025, while wild-type *HCCS* and the yeast heme lyase *Cyc3p* could rescue growth on nonfermentable carbon sources.

Conclusions: Identification of the novel missense mutation p.E159K of *HCCS*, which leads to loss-of-function of the encoded holocholesterol *c*-type synthase, in a sporadic female patient with microphthalmia of both eyes and bilateral sclerocornea may suggest *HCCS* as candidate for severe ocular manifestations.

Severe structural malformations of the eye, such as anophthalmia (absence of the eye) and microphthalmia (reduction in eye size), have a birth prevalence of about 1 per 5,000 [1-3]. These ocular abnormalities are often apparent at birth and caused by very early disturbances in the normal program of development. Although the cause of most human ocular malformations is unknown, various genes for the anophthalmia and/or microphthalmia phenotype have been identified. Originally, heterozygous mutations in *PAX6*, encoding a paired-box transcription factor, have been described to cause human aniridia [4]. Nonetheless, *PAX6* was also the first gene to be identified for anophthalmia [5], and alterations of *PAX6* have recently been discovered in patients with microphthalmia [6]. Heterozygous, loss-of-function mutations in *SOX2* are most commonly associated with bilateral anophthalmia, although

microphthalmia, sclerocornea and persistence of the hyperplastic vitreous are also seen (OMIM 206900) [7,8]. Moreover, in patients with the anophthalmia-esophageal-genital (AEG) syndrome (OMIM 206900) heterozygous mutations of *SOX2* have been detected [9,10]. *SOX2* codes for a transcription factor known to bind to *PAX6*, cooperatively activating expression of lens-specific genes [11]. Additionally, several other genes encoding transcription factors or repressors have been implicated in severe ocular malformations, such as *CHX10* (OMIM 610092 and 610093) [12], *RAX* (OMIM 611038) [13], *BCOR* (OMIM 300166) [14], and *OTX2* (OMIM 610125) [8,15].

The association of developmental eye abnormalities with transcription factors highlights the existence of a complex genetic network important to control each stage of eye development [16]. Remarkably, molecules other than transcription regulators have been shown to be mutated in patients with syndromic microphthalmia. Recently, sequence alterations in *STRA6*, encoding a membrane receptor for the retinol binding protein which mediates cellular uptake of vitamin A [17], have been reported in individuals with anophthalmia, mental retardation

Correspondence to: Kerstin Kutsche, PhD, Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Campus Forschung, Gebäude 146, Martinistraße 52, 20246 Hamburg, Germany; Phone: ++49.40.42803.4597; FAX: ++49.40.42803.5138; email: kkutsche@uke.uni-hamburg.de

dition, and a broad spectrum of organ malformations (OMIM 601186) [18,19]. The X-linked dominant, male-lethal microphthalmia with linear skin defects syndrome (also known as MLS or MIDAS; OMIM 309801) has been found to be associated with segmental monosomy of the Xp22.2 region in the majority of cases [20]. However, heterozygous, loss-of-function mutations of *HCCS* have been detected in patients with MLS and normal karyotype [21]. *HCCS* is an atypical gene for microphthalmia as its product is neither involved in transcriptional regulation nor belongs to the group of retinoic acid-inducible genes, such as *STRA6*, that are possible targets of the retinoid receptors [22]. *HCCS* encodes a mitochondrial enzyme, the holochoyochrome *c*-type synthase, which catalyzes the covalent attachment of heme to both apocytochrome *c* and *c*₁, thereby leading to the mature forms, holochoyochrome *c* and *c*₁ [23,24]. The product of the *HCCS*-catalyzed reaction, cytochrome *c*, has two cellular functions: First, it acts as an electron carrier in the mitochondrial respiratory chain and thereby is implicated in oxidative phosphorylation (OXPHOS), and second, it is released from mitochondria upon proapoptotic stimuli and plays an important role in caspase-dependent cell death, i.e., apoptosis [25].

The majority of MLS-affected females display the classic phenotypic features, including microphthalmia, sclerocornea, and linear erythrodermia, however, a high intra- and interfamilial phenotypic variability has been observed [21,26-29]. For example, several patients with severe eye malformations but without erythematous skin lesions at birth have been reported. These individuals show either isolated eye anomalies or a syndromic form with other organ manifestations, e.g., cardiomyopathy [21,30-32]. The broad spectrum of phenotypic abnormalities seen in patients with MLS led us to hypothesize that mutations in *HCCS* could be associated with isolated and syndromic forms of anophthalmia and/or microphthalmia in individuals with no apparent skin defects. Here, we describe mutation analysis of *HCCS* in a cohort of 27 females obtained from a population-based study on infants and fetuses with congenital eye malformations, including uni- and bilateral microphthalmia, and report functional analysis of a novel missense mutation leading to loss-of-function of the encoded HCCS protein.

METHODS

Patients: Clinical data were initially derived from the California Birth Defects Monitoring Program, a population-based active surveillance system for collecting information on births with congenital malformations. Diagnostic information was collected as previously described [3]. In that study, only infants with clinical anophthalmia or bilateral microphthalmia served as the analytic basis. In the period 1989-97, ascertainment among more than 2.5 million California births (liveborn and stillborn) resulted in the identification of 100 infants/fetuses with these eye anomalies. Ophthalmic examinations included slit lamp biomicroscopy, measurement of intraocular pressure (IOP) by applanation tonometry, gonioscopic evaluation of the anterior chamber angle, and perimetry by automated field analyzer.

For this study, phenotypes of 27 female cases with bilateral clinical anophthalmia and/or microphthalmia were reviewed. The cases were categorized as either isolated (9) or syndromic (18). Isolated cases had only anophthalmia/microphthalmia or anophthalmia/microphthalmia with other eye defects, whereas syndromic cases showed anophthalmia/microphthalmia and heart and/or brain defects and cataracts, respectively.

Mutation analysis: Total genomic DNA was isolated from Guthrie cards by standard procedures and amplified by using the GenomiPhi DNA Amplification Kit (GE Healthcare, München, Germany). We amplified the coding region of *HCCS* (exons 2 to 7, GenBank NM_005333), including the flanking intronic sequences, from whole genome amplified DNA. Primer sequences and PCR conditions are available on request. PCR products were directly sequenced with the Big Dye Terminator ready reaction kit (PE Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) on an ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems).

X-inactivation assay: Examination of the methylation pattern at the *AR* locus was performed as previously described [21].

Generation of NH₂- and COOH-terminal tagged HCCS constructs: Generation of *HCCS* wild-type constructs has been described previously [21]. The *HCCS* (E159K) insert was established by PCR-mediated mutagenesis [33]. The purified PCR product was cloned into pENTR/D-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) according to the protocol provided. Constructs were sequenced for integrity and then used for cloning the *HCCS* (E159K) coding region into plasmids pcDNA-DEST53 (NH₂-terminal EGFP epitope; Invitrogen), pcDNA-DEST47 (COOH-terminal EGFP epitope; Invitrogen), pMT2SM-HA-DEST (NH₂-terminal HA epitope), and pcDNA3.2/V5-DEST (COOH-terminal V5 epitope; Invitrogen) via LR reaction following the manufacturer's instructions (Invitrogen).

Generation of yeast expression constructs: For generation of yeast expression constructs we used pYEX4Tps which drives expression of the GST-fusion proteins from the *Saccharomyces cerevisiae* CUP1 promoter and carries the selectable markers *leu2-d* and *URA3*. Generation of pYEX4Tps-HCCS-wild-type and pYEX4Tps-CYC3 has been described previously [21]. HCCS-E159K was established by PCR-mediated mutagenesis [33]. After purification of PCR products, the amplicon was restricted with *Bam*HI and *Not*I and cloned unidirectionally into pYEX4Tps. Primer sequences and PCR conditions are available on request. All constructs were sequenced for integrity, and large and pure amounts of plasmid DNA were prepared by using a plasmid maxi kit (QIAGEN, Hilden, Germany).

Immunofluorescence: CHO-K1 cells were cultured on fibronectin coated (10 µg/ml) coverslips in F12-Ham's Nutrient Mixture supplemented with 10% FCS, 1% L-glutamine, and penicillin-streptomycin at 37 °C in 5% CO₂. Immunofluorescence analysis was performed as previously described [21]. In brief, after transfection with pcDNA-DEST53-HCCS-wild type, pcDNA-DEST53-HCCS-E159K, pcDNA-DEST47-HCCS-wild type, pcDNA-DEST47-HCCS-E159K, pMT2SM-

HA-DEST-HCCS-wild type, pMT2SM-HA-DEST-HCCS-E159K, pcDNA3.2/V5-DEST-HCCS-wild type, or pcDNA3.2/V5-DEST-HCCS-E159K, CHO-K1 cells were incubated in medium containing MitoTracker Red CMXRos (Invitrogen) and fixed. HA- and V5-tagged HCCS proteins were detected with rat monoclonal anti-HA-Flourescein antibody (1.25 µg/ml; Roche, Mannheim, Germany) and mouse monoclonal anti-V5-FITC antibody (2.0 µg/ml; Invitrogen), respectively. Cells were analyzed on a Zeiss Axiovert 200 M confocal microscope equipped with a 63x Planapochromat/1.4 DIC lens.

Yeast complementation studies: Complementation studies were performed as previously described [21]. We used the *S. cerevisiae* strain B-8025 (MAT α can1-100 *CYC1 cyc3-Δcyc7-Δ::CYH2 cyh2 his3-Δ1 leu2-3,112 trp1-289*), carrying a deletion of *CYC3* [34], as well as B-7553 (MAT α can1-100 *CYC1 cyc7::CYH2 cyh2 his3-Δ1 leu2-3,112 trp1-289*), as a growth control [35].

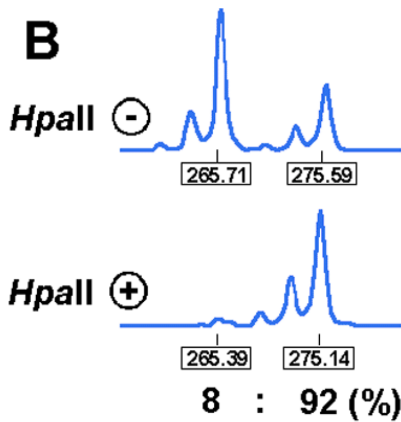
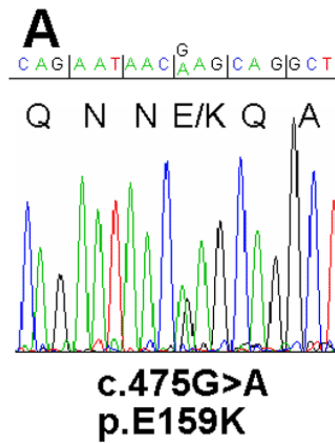
Immunoblotting: Expression of GST-HCCS and GST-CYC3-fusion proteins was confirmed by immunoblotting of lysates from saturated yeast cultures (grown in minimal medium or YPG medium with copper) using horseradish peroxidase-conjugated goat polyclonal anti-GST antibody (0.3 µg/ml; Amersham Pharmacia Biotech, Vienna, Austria).

RESULTS

We performed mutation analysis of *HCCS* in a cohort of 27 newborn female patients with isolated or syndromic microphthalmia or anophthalmia [3]. In a single patient, we identified the heterozygous c.475G>A mutation in exon 5 which predicted an amino acid change from glutamate to lysine at position 159 of the holoctochrome *c*-type synthase (p.E159K; Figure 1A). The female patient has been diagnosed with bilateral microphthalmia and bilateral scleral cornea at the age of one week. Since parental DNA samples were not available, we analyzed 234 DNAs from healthy females for the c.475G>A change and could not detect it in any of these samples (data not shown).

A skewed X-inactivation pattern has been commonly identified in MLS-affected individuals with segmental monosomy

Figure 1. An *HCCS* missense mutation in a female with nonsyndromic microphthalmia. **A:** Sequence electropherogram of part of *HCCS* exon 5 from genomic DNA of the proband. Triplets and encoded amino acids are indicated. The patient is heterozygous for the c.475G>A mutation (p.E159K) in exon 5. **B:** X chromosome inactivation determined by amplification of an *AR* sequence polymorphism and digestion of genomic DNA isolated from lymphocytes with *HpaII* (indicated with + or -). The allele sizes and ratio of the X-inactivation pattern are given below the peaks. **C:** Partial amino acid sequence alignment of the first heme lyase targeting motif from various species. The position of amino acids is given. Evolutionary conserved residues are presented in bold. The invariant glutamate at position 159 is shaded in gray. The consensus sequence is indicated below the amino acid alignment. HCCS_i indicates specificity of this heme lyase for cytochrome *c*_i. Hs, *Homo sapiens*; Mm₁, *Mus musculus*; Rr, *Rattus norvegicus*; Cf, *Canis familiaris*; Mm, *Macaca mulatta*; Bt, *Bos taurus*; Ca, *Candida albicans*; Sc, *S. cerevisiae*; Sp, *Schizosaccharomyces pombe*; Nc, *Neurospora crassa*; Ce, *Caenorhabditis elegans*.



C		
Hs	HCCS	151 I R I H N Q N N E Q A W K E I L K W E ¹⁶⁹
Mm ₁	HCCS	155 I R I H N Q N N E Q A W K E I L K W E ¹⁷³
Rr	HCCS	157 I R I H N Q N N E Q A W K E I L K W E ¹⁷⁵
Cf	HCCS	155 I R I H N Q N N E Q A W K E I L K W E ¹⁷³
Mm	HCCS	151 I R I H N Q N N E Q A W K E I L K W E ¹⁶⁹
Bt	HCCS	125 I R I H N Q N N E Q A W K E I L K W E ¹⁴³
Ca	HCCS	124 V E V H N F L N E G A W Q Q I L T W E ¹⁴²
Sc	HCCS	125 V Q V H N F L N E G C W Q E V L E W E ¹⁴³
Sc	HCCS ₁	106 V P L H N S I N E R V W N Y I K S W E ¹²⁴
Sp	HCCS	249 V Q V H N F L N E G A W S E I K A W E ²⁶⁷
Sp	HCCS ₁	97 V P I H N A V N E R A W Q D I L Q W E ¹¹⁵
Nc	HCCS	177 V A V H N F L N E G A W N E I V E W E ¹⁹⁵
Ce	HCCS	140 I S I H N A N N E E A W R E V L K W E ¹⁵⁸
Consensus		V H N N E A W E I L W E

of Xpter-p22.2 or an *HCCS* mutation [21,29,36]. Indeed, the holocytochrome *c*-type synthase acts in a cell-autonomous manner and loss-of-function mutations are supposed to cause selective cell loss resulting in a skewed X-inactivation pattern [21]. We used the methylation-specific PCR at the polymorphic human androgen receptor (*AR*) locus to study the X-inactivation pattern in the patient carrying the *HCCS* missense mutation. As expected, we detected preferential inactivation of one X chromosome with a ratio of 92:8 in the patient's peripheral blood cells (Figure 1B).

Holocytochrome *c*-type synthases, also known as "heme lyases", contain a sequence element which is essential for the import of these proteins into the intermembrane space of mitochondria. The targeting signal is located in the third quarter of HCCS and comprises about 60 amino acid residues which are spread over two highly conserved motifs, from residues 151-169 and 190-216 of human HCCS [37]. Glutamate at position 159 of HCCS is evolutionary conserved and located within the first targeting motif (Figure 1C). Thus, by changing glutamate for lysine at position 159, import of HCCS into mitochondria could be impaired. We compared subcellular localization of ectopically expressed wild-type with the mutated HCCS protein. NH₂-terminally HA-tagged wild-type HCCS was found to be targeted to mitochondria (Figure 2C). Similarly, the mutated HCCS protein with lysine-159 (HCCS E159K) also localized to mitochondria (Figure 2F). We performed the same experiments with wild-type HCCS and HCCS E159K carrying an NH₂- or COOH-terminal EGFP tag or a

COOH-terminal V5 tag and obtained similar results as described above (data not shown).

Mammalian cytochrome *c* heme lyases catalyze the covalent attachment of heme to the apoforms of both cytochrome *c* and *c*₁ [24,38]. Cytochrome *c* plays an important role in OXPHOS and is therefore required for respiratory growth. The *S. cerevisiae* yeast strain B-8025 carries a deletion of *CYC3* which encodes Cyc3p, the yeast ortholog of human HCCS, and is unable to grow on nonfermentable carbon sources indicating a severely depleted respiratory function [39]. While ectopic expression of human HCCS wild type is able to complement this deficiency [21,40], expression of HCCS mutants associated with MLS did not restore respiratory function of this yeast mutant [21]. We ectopically expressed HCCS E159K, HCCS wild type and yeast Cyc3p as glutathione-S-transferase (GST) fusion proteins in yeast strain B-8025 and analyzed their capacity to compensate for respiratory deficiency. Whereas human wild-type HCCS and yeast Cyc3p proteins restored growth on glycerol-containing medium, yeast cells expressing HCCS with p.E159K could not grow on nonfermentable carbon sources (Figure 3A). By western blot analysis of protein extracts from the transformed B-8025 strains grown in minimal medium we confirmed expression of the three different GST fusion proteins (Figure 3B).

DISCUSSION

Mutation analysis of *HCCS* in a cohort of 27 newborn females with nonsyndromic or syndromic microphthalmia and/

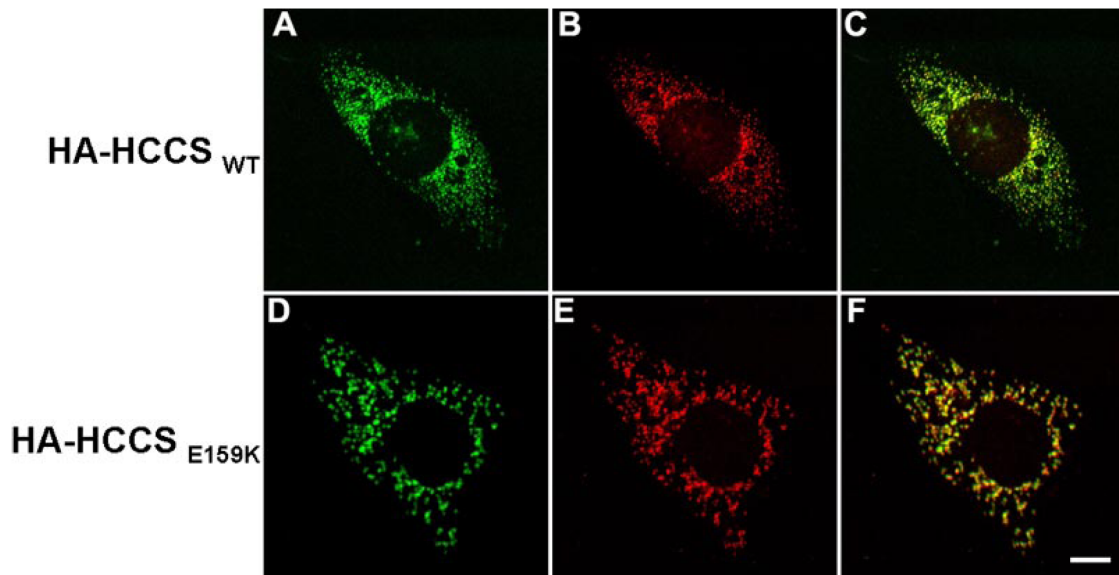


Figure 2. Targeting of ectopically expressed HCCS wild type and the E159K mutant to mitochondria. Subcellular localization of HA-tagged HCCS proteins ectopically expressed in CHO-K1 cells (A and D) and staining of endogenous mitochondria by MitoTracker are shown (B and E). HA-tagged HCCS wild type protein (A, green) is targeted to mitochondria (B, red) as shown by colocalization with the MitoTracker (yellow pseudocolor in C). Similarly, HA-tagged HCCS E159K mutant protein (D, green) shows a mitochondrial (E, red) distribution (yellow pseudocolor in F). The scale bar represents 10 μ m.

or clinical anophthalmia identified the heterozygous missense mutation c.475G>A/p.E159K in a single female infant with bilateral microphthalmia and sclerocornea in both eyes. The findings that (1) mutated HCCS with E159K did not complement respiratory deficiency of the *CYC3* *S. cerevisiae* mutant strain, (2) this mutation was not detected on more than 460 X chromosomes, and (3) a skewed X-inactivation was found in the patient's lymphocytes strongly provide evidence for the pathogenic relevance of the c.475G>A mutation.

The mutated glutamate-159 is an invariant residue and located within the first motif of the sequence element responsible for sorting HCCS to the mitochondrial intermembrane space. Chemical properties of the heme lyase targeting element are distinct from those of other mitochondrial proteins as it is highly hydrophilic with 30% charged residues containing a similar number of positively and negatively charged amino acids. This topogenic signal has been suggested to determine the specificity of transport into mitochondria and mediate the import into the mitochondrial intermembrane space [37]. Thus, substitution of the negatively charged glutamate-159 by the positively charged lysine most likely causes a disequilibrium of positively and negatively charged residues within the targeting motif which might interrupt mitochondrial sorting of HCCS. Surprisingly, the missense mutation p.E159K did not have any impact on translocating the mutated heme lyase to mitochondria (Figure 2F), although the capacity of the altered targeting sequence to specifically guide HCCS to the intermembrane space has not been investigated. These data suggest that the total amount of charged residues within the targeting element rather than the physicochemical nature of a single amino acid is important for directing HCCS to mitochondria.

In yeast complementation studies human heme lyase with E159K was not able to compensate for respiratory deficiency of the *CYC3* *S. cerevisiae* mutant strain indicating that glutamate-159 is important for functional integrity of the holo-cytochrome *c*-type synthase. In line with this finding, the two mitochondrial targeting motifs have also been suggested to be important for proper function of heme attachment [37]. Taken together, the p.E159K missense mutation of *HCCS* leads to loss-of-function of the encoded protein and is likely associated with the severe eye malformations in the female infant.

The function of the protein encoded by *HCCS* is completely different from that of several genes responsible for severe eye malformation disorders, such as *PAX6*, *SOX2*, and *OTX2*. The latter three code for transcriptional regulators involved in a complex regulatory network. Cross-regulation for *PAX6*, *SOX2*, and *OTX2* as well as regulatory mechanisms for their fine-tuned expression have been discovered indicating that these proteins cooperatively control each stage of eye development [16]. In marked contrast, *HCCS* is a mitochondrial housekeeping enzyme required for cytochrome *c* biosynthesis. On one hand, cytochrome *c* is necessary for proper functioning of the mitochondrial respiratory chain and on the other hand, release of cytochrome *c* from mitochondria induces apoptotic cell death [25]. Recently, we put forward the hypothesis that deficiency of *HCCS* may not only cause func-

tional deficits in OXPHOS, but also leads to severe constraints in the process of apoptosis. Thus, functional nullisomy of *HCCS* may disturb the balance between apoptosis and necrosis and push cell death toward necrosis [21]. Importantly, necrosis bears the danger of inflammatory reactions leading to substantial damage of neighboring cells [41,42] that could be

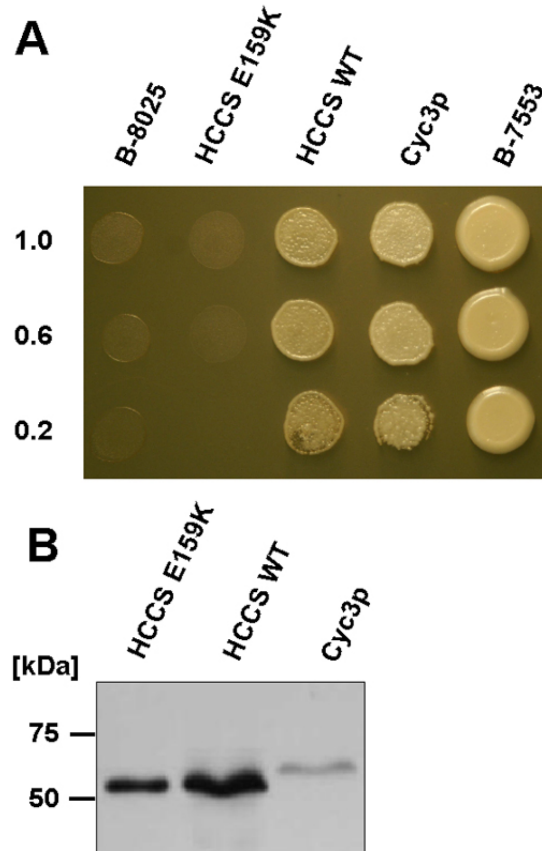


Figure 3. HCCS E159K is not able to complement *S. cerevisiae* *CYC3*-deficiency. **A:** Functional complementation of the *S. cerevisiae* strain B-8025. B-8025 was grown on minimal medium and transformed with human wild-type HCCS (HCCS WT), the HCCS mutant E159K (HCCS E159K), or yeast *CYC3* (*Cyc3p*) expression constructs. Transformants were grown in liquid minimal medium, and aliquots of saturated (top row) and diluted cultures (middle and bottom rows) were spotted on glycerol medium containing copper (to induce expression of GST fusion proteins), and were incubated for 7 days at 30 °C. Dilution rates are indicated to the left of the figure. Note restoration of growth by ectopic expression of *Cyc3p* and HCCS WT, whereas no growth was observed for the untransformed strain and B-8025 expressing HCCS E159K. Strain B-7553 served as wild-type growth control. **B:** Expression of GST-HCCS fusion proteins in yeast strain B-8025. Expression of GST-HCCS E159K (left lane), GST-HCCS wild type (middle lane), and GST-*Cyc3p* (right lane) fusion proteins in the yeast mutant strain B-8025 grown in minimal medium was demonstrated by immunoblotting.

a key element in developing eye malformations as well as other MLS-specific symptoms in affected individuals. A more direct role of HCCS in apoptotic cell death has been proposed recently. In response to apoptotic stimuli, HCCS is released from mitochondria into the cytoplasm where it interacts with several members of the inhibitor of apoptosis protein (IAP) family [43]. IAPs suppress caspase-3 activity required for apoptotic cell death [44], and binding of HCCS to IAPs was shown to cause accelerated cell death by antagonizing IAP activity [43]. Thus, holocytochrome *c*-type synthase has a pro-apoptotic activity and HCCS deficiency may result in enhanced resistance to cell death by apoptosis. Taken together, direct and indirect implication of HCCS in apoptotic cell death and requirement of cytochrome *c*, the final product of HCCS activity, for OXPHOS may suggest that disturbance of these processes contribute to the variable clinical features observed in patients with HCCS mutations. In addition, the pattern of X-inactivation in the early embryo of a female carrying an HCCS alteration may determine in part the severity of the disease phenotype.

Up to date, one missense mutation, p.R217C, and one nonsense mutation, p.R197X, in HCCS have been described in patients with MLS. While the girl with p.R197X shows the classical MLS phenotype, the female patient with p.R217C presented with bilateral microphthalmia and sclerocornea, but no linear skin defects. Later in life, she developed idiopathic ventricular tachycardia and suffered an occlusion of her right arteria cerebri media. The female infant with the HCCS mutation p.E159K presented only with severe eye malformations at birth, including microphthalmia of both eyes and bilateral sclerocornea. However, other features occasionally seen in patients with MLS, such as chorioretinal abnormalities, infantile seizures, and tachycardia, might have developed later in life in this patient and would have been missed by the California Birth Defects Monitoring Program, which only collected data on structural anomalies diagnosed within 1 year of delivery [3]. Nonetheless, it is reasonable to speculate that heterozygous mutations of HCCS are associated with isolated eye malformations in affected female patients. Indeed, a female carrying a heterozygous deletion of 8.6 kb, encompassing part of HCCS, only presented with a left opaque cornea, congenital glaucoma with total anterior synechia, and a white anterior cataract [21]. Similarly, Cape and colleagues [32] reported a girl with bilateral sclerocornea and partial aniridia in the left eye and an X/Y translocation resulting in heterozygous deletion of the MLS critical region [32]. The wide variety of ocular findings in patients with MLS suggests HCCS as an attractive candidate for a broad spectrum of ocular malformations. Since mutations of HCCS seem to be rarely associated with microphthalmia and/or anophthalmia in female patients, X-inactivation studies prior molecular testing may provide a clue for finding an alteration in this gene. Although male lethality has been proposed to be associated with MLS in patients with deletions involving Xp22 and later on with HCCS mutations [20,21,45], males carrying a loss-of-function mutation of HCCS may survive due to somatic mosaicism or Klinefelter syndrome, as reported for e.g., X-linked dominant incontinentia

pigmenti [46]. Alternatively, hypomorphic HCCS alleles might be present in male patients with various ocular malformations.

In conclusion, in this study we provide evidence for a loss-of-function mutation of HCCS in an individual with isolated eye abnormalities suggesting HCCS as candidate gene for a broad spectrum of human ocular phenotypes. In the future, mutation analysis in large cohorts of patients with severe ocular malformation disorders will shed light on the variable eye phenotypes associated with mutated HCCS alleles. Moreover, implication of a mitochondrial housekeeping enzyme in developmental ocular abnormalities is intriguing and opens the possibility of identifying other genes for these disorders whose products are involved in a wide spectrum of cellular functions.

ACKNOWLEDGEMENTS

The results summarized here are part of the Ph.D. thesis of Isabella Wimplinger at the University of Hamburg. We thank Thomas Rau for help with confocal microscopy and photographic art work, Inka Jantke for skillful technical assistance, and Georg Rosenberger for critical reading of the manuscript. This work was supported by a grant from the Wilhelm Sander-Stiftung (2003.160.1 to K.K.).

REFERENCES

- Morrison D, FitzPatrick D, Hanson I, Williamson K, van Heyningen V, Fleck B, Jones I, Chalmers J, Campbell H. National study of microphthalmia, anophthalmia, and coloboma (MAC) in Scotland: investigation of genetic aetiology. *J Med Genet* 2002; 39:16-22.
- Lowry RB, Kohut R, Sibbald B, Rouleau J. Anophthalmia and microphthalmia in the Alberta Congenital Anomalies Surveillance System. *Can J Ophthalmol* 2005; 40:38-44. Erratum in: *Can J Ophthalmol*. 2006; 41:232.
- Shaw GM, Carmichael SL, Yang W, Harris JA, Finnell RH, Lammer EJ. Epidemiologic characteristics of anophthalmia and bilateral microphthalmia among 2.5 million births in California, 1989-1997. *Am J Med Genet A* 2005; 137:36-40.
- Ton CC, Hirvonen H, Miwa H, Weil MM, Monaghan P, Jordan T, van Heyningen V, Hastie ND, Meijers-Heijboer H, Drechsler M, Royer-Pokora B, Collins F, Swaroop A, Strong LC, Saunders GF. Positional cloning and characterization of a paired box- and homeobox-containing gene from the aniridia region. *Cell* 1991; 67:1059-74.
- Glaser T, Jepeal L, Edwards JG, Young SR, Favor J, Maas RL. PAX6 gene dosage effect in a family with congenital cataracts, aniridia, anophthalmia and central nervous system defects. *Nat Genet* 1994; 7:463-71. Erratum in: *Nat Genet* 1994; 8:203.
- Dansault A, David G, Schwartz C, Jaliffa C, Vieira V, de la Houssaye G, Bigot K, Catin F, Tattu L, Chopin C, Halimi P, Roche O, Van Regemorter N, Munier F, Schorderet D, Duffier JL, Marsac C, Ricquier D, Menasche M, Penformis A, Abitbol M. Three new PAX6 mutations including one causing an unusual ophthalmic phenotype associated with neurodevelopmental abnormalities. *Mol Vis* 2007; 13:511-23.
- Fantes J, Ragge NK, Lynch SA, McGill NI, Collin JR, Howard-Peebles PN, Hayward C, Vivian AJ, Williamson K, van Heyningen V, FitzPatrick DR. Mutations in SOX2 cause anophthalmia. *Nat Genet* 2003; 33:461-3.
- Ragge NK, Lorenz B, Schneider A, Bushby K, de Sanctis L, de Sanctis U, Salt A, Collin JR, Vivian AJ, Free SL, Thompson P,

- Williamson KA, Sisodiya SM, van Heyningen V, Fitzpatrick DR. SOX2 anophthalmia syndrome. *Am J Med Genet A* 2005; 135:1-7; discussion8.
9. Williamson KA, Hever AM, Rainger J, Rogers RC, Magee A, Fiedler Z, Keng WT, Sharkey FH, McGill N, Hill CJ, Schneider A, Messina M, Tumpenny PD, Fantes JA, van Heyningen V, FitzPatrick DR. Mutations in SOX2 cause anophthalmia-esophageal-genital (AEG) syndrome. *Hum Mol Genet* 2006; 15:1413-22. Erratum in: *Hum Mol Genet* 2006; 15:2030.
 10. Kelberman D, Rizzoti K, Avilion A, Bitner-Glindzic M, Cianfarani S, Collins J, Chong WK, Kirk JM, Achermann JC, Ross R, Carmignac D, Lovell-Badge R, Robinson IC, Dattani MT. Mutations within Sox2/SOX2 are associated with abnormalities in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in mice and humans. *J Clin Invest* 2006; 116:2442-55.
 11. Kondoh H, Uchikawa M, Kamachi Y. Interplay of Pax6 and SOX2 in lens development as a paradigm of genetic switch mechanisms for cell differentiation. *Int J Dev Biol* 2004; 48:819-27.
 12. Ferda Percin E, Ploder LA, Yu JJ, Arici K, Horsford DJ, Rutherford A, Bapat B, Cox DW, Duncan AM, Kalnins VI, Kocak-Alintas A, Sowden JC, Traboulsi E, Sarfarazi M, McInnes RR. Human microphthalmia associated with mutations in the retinal homeobox gene CHX10. *Nat Genet* 2000; 25:397-401.
 13. Voronina VA, Kozhemyakina EA, O'Kernick CM, Kahn ND, Wenger SL, Linberg JV, Schneider AS, Mathers PH. Mutations in the human RAX homeobox gene in a patient with anophthalmia and sclerocornea. *Hum Mol Genet* 2004; 13:315-22.
 14. Ng D, Thakker N, Corcoran CM, Donnai D, Perveen R, Schneider A, Hadley DW, Tiffit C, Zhang L, Wilkie AO, van der Smagt JJ, Gorlin RJ, Burgess SM, Bardwell VJ, Black GC, Biesecker LG. Oculofaciocardiodental and Lenz microphthalmia syndromes result from distinct classes of mutations in BCOR. *Nat Genet* 2004; 36:411-6.
 15. Ragge NK, Brown AG, Poloschek CM, Lorenz B, Henderson RA, Clarke MP, Russell-Eggitt I, Fielder A, Gerrelli D, Martinez-Barbera JP, Ruddell P, Hurst J, Collin JR, Salt A, Cooper ST, Thompson PJ, Sisodiya SM, Williamson KA, Fitzpatrick DR, van Heyningen V, Hanson IM. Heterozygous mutations of OTX2 cause severe ocular malformations. *Am J Hum Genet* 2005; 76:1008-22. Erratum in: *Am J Hum Genet* 2005; 77:334.
 16. Hever AM, Williamson KA, van Heyningen V. Developmental malformations of the eye: the role of PAX6, SOX2 and OTX2. *Clin Genet* 2006; 69:459-70.
 17. Kawaguchi R, Yu J, Honda J, Hu J, Whitelegge J, Ping P, Wiita P, Bok D, Sun H. A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A. *Science* 2007; 315:820-5.
 18. Pasutto F, Sticht H, Hammersen G, Gillissen-Kaesbach G, Fitzpatrick DR, Nurnberg G, Brasch F, Schirmer-Zimmermann H, Tolmie JL, Chitayat D, Houge G, Fernandez-Martinez L, Keating S, Mortier G, Hennekam RC, von der Wense A, Slavotinek A, Meinecke P, Bitoun P, Becker C, Nurnberg P, Reis A, Rauch A. Mutations in STRA6 cause a broad spectrum of malformations including anophthalmia, congenital heart defects, diaphragmatic hernia, alveolar capillary dysplasia, lung hypoplasia, and mental retardation. *Am J Hum Genet* 2007; 80:550-60.
 19. Golzio C, Martinovic-Bouriel J, Thomas S, Mougou-Zrelli S, Grattagliano-Bessieres B, Bonniere M, Delahaye S, Munnich A, Encha-Razavi F, Lyonnet S, Vekemans M, Attie-Bitach T, Etchevers HC. Matthew-Wood syndrome is caused by truncating mutations in the retinol-binding protein receptor gene STRA6. *Am J Hum Genet* 2007; 80:1179-87.
 20. Van den Veyver IB. Microphthalmia with linear skin defects (MLS), Aicardi, and Goltz syndromes: are they related X-linked dominant male-lethal disorders? *Cytogenet Genome Res* 2002; 99:289-96.
 21. Wimplinger I, Morleo M, Rosenberger G, Iaconis D, Orth U, Meinecke P, Lerer I, Ballabio A, Gal A, Franco B, Kutsche K. Mutations of the mitochondrial holocytochrome c-type synthase in X-linked dominant microphthalmia with linear skin defects syndrome. *Am J Hum Genet* 2006; 79:878-89.
 22. Bouillet P, Sapin V, Chazaud C, Messaddeq N, Decimo D, Dolle P, Chambon P. Developmental expression pattern of Stra6, a retinoic acid-responsive gene encoding a new type of membrane protein. *Mech Dev* 1997; 63:173-86.
 23. Bernard DG, Gabilly ST, Dujardin G, Merchant S, Hamel PP. Overlapping specificities of the mitochondrial cytochrome c and c1 heme lyases. *J Biol Chem* 2003; 278:49732-42.
 24. Moraes CT, Diaz F, Barrientos A. Defects in the biosynthesis of mitochondrial heme c and heme a in yeast and mammals. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1659:153-9.
 25. Jiang X, Wang X. Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem* 2004; 73:87-106.
 26. Allanson J, Richter S. Linear skin defects and congenital microphthalmia: a new syndrome at Xp22.2. *J Med Genet* 1991; 28:143-4.
 27. Lindsay EA, Grillo A, Ferrero GB, Roth EJ, Magenis E, Grompe M, Hulten M, Gould C, Baldini A, Zoghbi HY, Ballabio A. Microphthalmia with linear skin defects (MLS) syndrome: clinical, cytogenetic, and molecular characterization. *Am J Med Genet* 1994; 49:229-34.
 28. Mucke J, Happle R, Theile H. MIDAS syndrome respectively MLS syndrome: a separate entity rather than a particular lyonization pattern of the gene causing Goltz syndrome. *Am J Med Genet* 1995; 57:117-8.
 29. Anguiano A, Yang X, Felix JK, Hoo JJ. Twin brothers with MIDAS syndrome and XX karyotype. *Am J Med Genet A* 2003; 119:47-9.
 30. Kobayashi M, Kiyosawa M, Toyoura T, Tokoro T. An XX male with microphthalmos and sclerocornea. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 1998; 35:122-4.
 31. Kono T, Migita T, Koyama S, Seki I. Another observation of microphthalmia in an XX male: microphthalmia with linear skin defects syndrome without linear skin lesions. *J Hum Genet* 1999; 44:63-8.
 32. Cape CJ, Zaidman GW, Beck AD, Kaufman AH. Phenotypic variation in ophthalmic manifestations of MIDAS syndrome (microphthalmia, dermal aplasia, and sclerocornea). *Arch Ophthalmol* 2004; 122:1070-4.
 33. Ito W, Ishiguro H, Kurosawa Y. A general method for introducing a series of mutations into cloned DNA using the polymerase chain reaction. *Gene* 1991; 102:67-70.
 34. Tong J, Margoliash E. Cytochrome c heme lyase activity of yeast mitochondria. *J Biol Chem* 1998; 273:25695-702.
 35. Dumont ME, Schlichter JB, Cardillo TS, Hayes MK, Bethlenny G, Sherman F. CYC2 encodes a factor involved in mitochondrial import of yeast cytochrome c. *Mol Cell Biol* 1993; 13:6442-51.
 36. Ogata T, Wakui K, Muroya K, Ohashi H, Matsuo N, Brown DM, Ishii T, Fukushima Y. Microphthalmia with linear skin defects syndrome in a mosaic female infant with monosomy for the Xp22 region: molecular analysis of the Xp22 breakpoint and the X-inactivation pattern. *Hum Genet* 1998; 103:51-6.
 37. Diekert K, Kispal G, Guiard B, Lill R. An internal targeting signal directing proteins into the mitochondrial intermembrane

- space. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96:11752-7.
38. Kranz R, Lill R, Goldman B, Bonnard G, Merchant S. Molecular mechanisms of cytochrome c biogenesis: three distinct systems. Mol Microbiol 1998; 29:383-96.
 39. Dumont ME, Ernst JF, Hampsey DM, Sherman F. Identification and sequence of the gene encoding cytochrome c heme lyase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J 1987; 6:235-41.
 40. Schwarz QP, Cox TC. Complementation of a yeast CYC3 deficiency identifies an X-linked mammalian activator of apocytochrome c. Genomics 2002; 79:51-7.
 41. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. Am J Pathol 1995; 146:3-15.
 42. Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL. Necrosis: a specific form of programmed cell death? Exp Cell Res 2003; 283:1-16.
 43. Kiryu-Seo S, Gamo K, Tachibana T, Tanaka K, Kiyama H. Unique anti-apoptotic activity of EAAC1 in injured motor neurons. EMBO J 2006; 25:3411-21.
 44. Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. Nat Rev Mol Cell Biol 2002; 3:401-10.
 45. Prakash SK, Cormier TA, McCall AE, Garcia JJ, Sierra R, Haupt B, Zoghbi HY, Van Den Veyver IB. Loss of holocytochrome c-type synthetase causes the male lethality of X-linked dominant microphthalmia with linear skin defects (MLS) syndrome. Hum Mol Genet 2002; 11:3237-48.
 46. Kenwick S, Woffendin H, Jakins T, Shuttleworth SG, Mayer E, Greenhalgh L, Whittaker J, Rugolotto S, Bardaro T, Esposito T, D'Urso M, Soli F, Turco A, Smahi A, Hamel-Teillac D, Lyonnet S, Bonnefont JP, Munnich A, Aradhya S, Kashork CD, Shaffer LG, Nelson DL, Levy M, Lewis RA, International IP Consortium. Survival of male patients with incontinentia pigmenti carrying a lethal mutation can be explained by somatic mosaicism or Klinefelter syndrome. Am J Hum Genet 2001; 69:1210-7.

The print version of this article was created on 27 Aug 2007. This reflects all typographical corrections and errata to the article through that date. Details of any changes may be found in the online version of the article.