

Anomale Augen- und Ohrentwicklung bei Genmutation NKX5–3/HMX1 Ein neues Syndrom mit einer 60-jährigen Schweizer Geschichte

Daniel Schorderet und Francis Munier

IRO – Institut de Recherche en Ophtalmologie, Sion
und Hôpital Ophtalmique Jules-Gonin, Lausanne

Während die Entwicklung des Auges durch eine beiderseitige Ausstülpung des Telenzephalons initiiert wird, beginnt die Ohrentwicklung mit der Differenzierung einer Region des Ektoderms, die sich im Mesenchym verstärkt und das Ohrvesikel bildet. A priori müssten diese beiden Ereignisse nichts miteinander zu tun haben, und dennoch betreffen zahlreiche erbliche Syndrome diese beiden Organe gleichzeitig.

■ Goldenhar- und Fraser-Syndrom

Unter den bekanntesten Syndromen mit gleichzeitigen Störungen der Augen und Ohrentwicklung kann man die Syndrome von Goldenhar und von Fraser nennen. Beim ersteren, erstmals beschrieben von Dr. Maurice Goldenhar,¹ finden sich eine Gesichtasymmetrie mit Hypoplasie der Mandibula, präaurikuläre Fisteln und eine oft einseitige Fehlbildung des äusseren Ohrs, die von der einfachen Ohrmuschelmissbildung bis zur vollständigen Hypoplasie mit begleitender Hypoakusis reichen kann.

Die wesentlichen okulären Zeichen sind Mikrophthalmie, epibulbäre Dermoide und Lidkolobome. Auch vertebrale Störungen vom Fusionstyp, Fehlbildungen des Herzens, der Lunge und der Nieren treten auf. Die grosse Variabilität des Syndroms macht die Analyse der Erbllichkeit schwierig. Obwohl es meist für sporadisch gehalten wird, gibt es mehrere Familien mit Goldenhar-Syndrom in dominantem Erbgang.

Das Fraser-Syndrom verbindet Kryptophthalmie (Lidstörung, bei der die Lider durch einen Hautlappen ersetzt sind), Mikro- oder Anophthalmie, breite Nasenwurzel, Missbildungen des äusseren Ohrs und Mittelohranomalien, Syndaktylie, Agenesie oder Hypoplasie der Nie-

ren, Vaginalatresie und Hypospadie. Die Vererbung ist autosomal rezessiv. Zwei Gene sind bislang identifiziert: FRAS 1 und FREM2. Beide kodieren Proteine, die an der Hautentwicklung beteiligt sind.

■ Das neue okulo-aurikuläre Syndrom

In den fünfziger Jahren hat Prof. Franceschetti zwei Kinder mit okulären Fehlbildungen identifiziert.² Das erste war praktisch blind und zeigte einen Horizontalnystagmus und eine Sklerokornea beiderseits in einem mikrophthalmischen Kontext. Das zweite hatte einen Visus von 1/60 mit Nystagmus, einer Mikrokornea, einer Mikrophthalmie, einem Iriskolobom, einer Katarakt und einer Mikrophakie. Die Untersuchung des äusseren Ohrs zeigte eine normale Ohrmuschel mit einem hypoplastischen Lobus. Die beiden Kinder wurden von einem in der 5. Generation miteinander verwandten Paar hervorgebracht, und Prof. Franceschetti postulierte zu Recht ein erbliches Syndrom mit rezessiv-autosomalem Vererbung.

Fünfzig Jahre später konnten wir ein anderes Kind beobachten, Neffe der beiden erwähnten Kinder, das die gleichen okulären und aurikulären Anomalien zeigte. Dieser letzte Fall bestätigte die Existenz eines neuen okulo-aurikulären Syndroms mit autosomal-rezessiver Vererbung.

■ Molekulargenetische Detektivarbeit

Unsere heutigen Werkzeuge der Molekulargenetik und die spezielle Familienstruktur erlaubten es, einen Genlokus mit Hilfe der Technik einer Homozygotie-Kartographie zu lokalisieren.

Bei diesem Ansatz stellt man die Hypothese auf, dass das mutierte Gen durch einen gemeinsamen Vorfahren über jede einzelne elterliche Linie an die Kranken weitergegeben wird. Da die beiden vererbten Chromosomensegmente von einem einzigen Vorfahren stammen, sind

sie identisch, und die analysierten Marker werden alle homozygot sein.

Die Genanalyse, die bei den drei kranken Individuen vorgenommen wurde, ergab eine einzelne homozygote Region zwischen den Markern D4A1582 und D4S419 auf den kurzen Armen des Chromosoms 4. Dieser Abschnitt von 8 Millionen Basen umfasst etwa fünfzig Gene, die mehr oder weniger gut charakterisiert sind.

Wir haben uns daher auf die Transkriptionsfaktoren und die Gene konzentriert, die für die Augenentwicklung relevant sind. Nach einigen Jahren Forschung haben wir eine Deletion von 26 Nukleotiden im Gen NKX5–3 identifiziert, die wir vorübergehend TRIS1 genannt haben.

NKX5–3, auch HMX1 genannt, wurde 1992 von Stadler et al mitgeteilt,³ aber die Sequenz, die publiziert wurde, unterschied sich deutlich von der, die wir in unseren Kontrollen gefunden haben. Speziell hatte sie ein zusätzliches Nukleotid eingefügt, das die Traduktion der cDNS in bis zu zwei Dritteln des Gens vollständig modifizierte und bei dem die Deletion eines Nukleotids den korrekten Leserahmen und die Homöobox der Mitglieder der Familie der Gene NKX5 wieder herstellte.

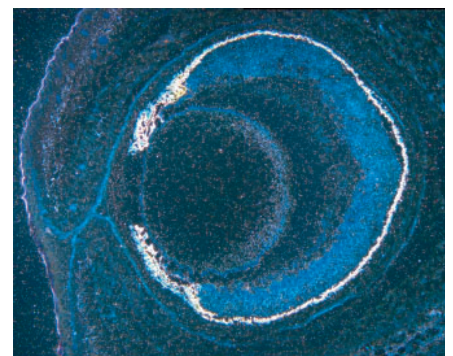


Abb. 1 Histologischer Schnitt durch ein Auge eines 19,5 Tage alten Mäuseembryos. Die Expression von NKX5–3 wird durch kleine weiße Punkte in der inferioren Retina und des hinteren Linsenanteils sichtbar.

■ Neues oder falsches Gen?

Bei den Vertebraten umfasst die Familie NKX5 vier Mitglieder: NKX-1, NKX-2, NKX-3 (auch genannt HMX3, HMX2 und HMX1) sowie SOHO1. Da beim Menschen nur NKX5-1, NKX5-2 und NKX5-3 bekannt waren, könnte TRIS1, das von uns identifizierte Gen, vielleicht ein neues Mitglied der Familie sein. Aber vielleicht wären auch SOHO1 oder die publizierte Sequenz von NKX5-3/HMX1 unrichtig gewesen. In diesem Fall würde TRIS1 die richtige NKX5-3/HMX1 repräsentieren.

Wir sind der Meinung, dass die zweite Hypothese korrekt ist, und zwar aus verschiedenen Gründen. Zunächst haben wir die Expression von TRIS1 im Auge und im Ohr über den Verlauf der Entwicklung bei der Maus und beim Menschen und bei *Daio rerio*, dem Zebrafisch, untersucht.

Bei der Maus wird TRIS1 der Ohrmuschel, in der Linse und der Netzhaut 13,5 Tage nach Befruchtung exprimiert. In der Retina ist die Expression besonders in der unteren Netzhaut und im hinteren Pol der Linse nachweisbar (Abb. 1). Beim menschlichen Embryo von 20 Wochen finden wir gleichfalls eine asymmetrische Expression, hauptsächlich in der internen Kernschicht der posterioren Retina. Beim gleichen Fötus exprimiert die Ohrmuschel TRIS1, die Haut um die Muschel jedoch nicht.

Es scheint in Anbetracht der Homologie der Sequenz zwischen TRIS1 und NKX5-3/HMX1 der Maus und der Expression dieses Gens während der Embryonalentwicklung möglich, dass TRIS1 das wahre NKX5-3/HMX1 repräsentiert und dass die Sequenz, die in der Genbank aufgeführt wird, nicht korrekt war. Inzwischen hat Genbank den alten Eintrag durch einen neuen ersetzt, identisch mit unserem Gen.

■ Schuldiges Gen in Funktion beobachtet

Die Identifizierung einer Deletion in einem Gen reicht jedoch nicht aus, um eine Kausalität dieses Gens in der Pathogenese einer Erbkrankheit zu beweisen, besonders wenn die Analyse nur eine einzige Familie betrifft.



Abb. 2 Zebrafish 24 h nach Befruchtung. In diesem Stadium hat sich das Auge (links) schon gut ausgebildet.

Daher haben wir beschlossen, das Gen NKX5-3/HMX1 beim Zebrafisch auszuschalten, um die Effekte auf die Augenentwicklung zu beobachten. Aber zunächst liess sich nicht zeigen, dass NKX5-3/HMX1 bei diesem Fisch ebenso exprimiert wurde, schon gar nicht an den gleichen Stellen. Zu unserer grossen Überraschung war das Gen, das beim Zebrafisch HMX1 genannt wurde, ebenfalls falsch. Nach mehrwöchiger Analyse und basierend auf der Homologie zwischen den verschiedenen Mitgliedern der Familie NKX5 und ihrer Position auf verschiedenen Chromosomen haben wir das richtige NKX5-3-Gen des Zebrafisches identifiziert und gezeigt, dass das Gen, das vorher HMX1 genannt worden war, tatsächlich SOHO1 war, das vierte Mitglied der Familie.

NKX5-3/HMX1 ist beim Zebrafisch im Auge und im Ohr gleichermassen exprimiert. Das zeigt, dass die Familie der NKX5-Gene sehr alt ist. Es zeigt ebenso, dass es eine wichtige Rolle in der Augenentwicklung spielen muss, wenn es unter den so divergenten Organismen wie dem Zebrafisch und dem Menschen persistiert.

■ Ein durchsichtiges Tiermodell

Der Zebrafisch ist ein sehr interessantes Tiermodell, weil sich der Embryo ausserhalb der Mutter entwickelt und transparent ist. Daher ist es möglich, kontinuierlich seine Entwicklung zu verfolgen. 24 Stunden nach Befruchtung ist das Auge schon ausgebildet (Abb. 2).

Der Zebrafisch ist auch deshalb von Interesse, weil es möglich ist, die Gen-

expression über 3–5 Tage zu bremsen, indem man ein Molekül ins Ei injiziert, das spezifisch die mRNA-Transkription dieses Gens inhibieren kann. Wir haben diese Technik eingesetzt, um vorübergehend die Funktion von TRIS1 beim Zebrafisch zu blockieren. Das Auge des Zebrafisches entwickelt sich dann weniger gut, es ist mikrophthalmisch, und die verschiedenen Netzhautschichten entwickeln sich im Vergleich zum normalen Embryo verzögert. Interessanterweise kann die gleichzeitige Gabe einer cDNA von NKX5-3 das Fehlen der endogenen NKX5-3 ausgleichen, und das Auge findet wieder zu seiner normalen Grösse.

■ Das «Schorderet-Munier-Franceschetti-Syndrom»

Diese Erfahrungen beim Zebrafisch bestätigen daher die Implikation des NKX5-3/HMX1 in der Pathogenese dieses neuen okulo-aurikulären Syndroms, das man als Schorderet-Munier-Franceschetti-Syndrom bezeichnen könnte.

Korrespondenz:

Prof. Dr. Daniel Schorderet
Direktor des IRO –
Institut de Recherche
en Ophtalmologie
Av. Grandchampsec 64
1950 Sion
daniel.schorderet@irovision.ch

Referenzen

- 1 M. Goldenhar. Associations malformatives de l'oeil et de l'oreille, en particulier le syndrome dermoïde epibulbaire-appendices auriculaires-fistula auris congenita et ses relations avec la dysostose mandibulo-faciale. *J. Génét hum* (Genève) 1952 ; 1: 243–282
- 2 Franceschetti A, Valerio M. Malformations associées des yeux et des oreilles. 4^{ème} Réunion ONO & Neurochir. Sion, 26-29.10.1944, Confinia Neurol. 1945 ; 6 :255-257.
- 3 Stadler H.S. et al. Identification and genetic mapping of a homeobox gene to the 4p16.1 region of human chromosome 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992 ; 89 :11579–11583
- 4 Schorderet DF, Nichini O, Boisset G, Polok B, tiab L, Mayeur H, Raji B, de la Housaye G, Abitbol MM, Munier FL. Mutation in the human homeobox gene NKX5-3 causes an oculo-auricular syndrome. *Am J Hum Genet* 2008 ; 82(5):1178–84

Anomalie du développement de l'œil et de l'oreille due à une mutation dans le gène *NKX5-3/HMX1* – Epilogue d'une histoire commencée il y a plus de 60 ans.

Daniel Schorderet^{1,2} et Francis Munier^{1,2}

1 IRO – Insitut de Recherche en Ophtalmologie, Sion et
2 Hôpital Ophtalmique Jules-Gonin, Lausanne

Alors que le développement de l'œil est initié par une évagination bilatérale du télencéphale, celui de l'oreille commence par la différenciation d'une région de l'ectoderme qui s'enfonce dans le mésenchyme pour former la vésicule otique. A priori, rien ne devrait relier ces deux événements et pourtant de nombreux syndromes héréditaires affectent simultanément ces deux organes.

Parmi les plus connus, on peut citer le syndrome de Goldenhar ou celui de Fraser. Dans le premier, décrit d'ailleurs pour la première fois par le Dr Maurice Goldenhar,¹ on retrouve, une asymétrie du visage avec hypoplasie de la mandibule, des fistules pré auriculaires, une malformation de l'oreille externe, souvent unilatérale, qui peut aller d'un pavillon simplement malformé à une hypoplasie complète avec hypoacousie associée. Sur le plan ophtalmique, microphthalmie, dermoïdes épibulbaires et colobome de la paupière sont les signes principaux. On peut aussi retrouver des atteintes vertébrales à type de fusion, des malformations du cœur, des poumons et des reins. La grande variabilité du syndrome rend difficile l'analyse de son hérédité. Bien que considéré comme sporadique, il existe plusieurs familles avec Goldenhar à transmission dominante.

Le syndrome de Fraser associe cryptophtalmie (atteinte des paupières qui sont remplacées par un lambeau cutané en continuation avec le front), micro ou anophthalmie, racine large du nez, dysplasies des oreilles externes et anomalies de l'oreille moyenne, syndactylie, agénésie ou hypoplasie des reins, atrésie vaginale et hypospadias. La transmission est récessive autosomique et deux gènes ont été impliqués à ce jour : *FRAS1* et *FREM2*, tout deux codant des protéines impliquées dans le développement de la peau.

Dans les années 50, le Prof. Franceschetti a identifié deux enfants souffrant de malformations oculaires.² Le premier

était pratiquement aveugle et présentait un nystagmus horizontal, ainsi qu'une sclérocornée bilatérale dans un contexte microphthalmique. Le second avait une vision limitée à 1/60 avec un nystagmus, une microcornée, une microphthalmie, un colobome de l'iris, une cataracte et une microphakie. Un examen des oreilles externes montrait un pavillon normal avec un lobule hypoplasique. Les deux enfants étant issus d'un couple consanguin à la 5^e génération, le Prof. Franceschetti évoquait à juste titre un syndrome héréditaire de transmission récessive autosomique. Cinquante ans plus tard, nous avons pu observer un autre enfant, neveu des deux enfants précités, et qui présentait les mêmes anomalies ophtalmiques et auriculaires. Ce dernier cas confirmait l'existence d'un nouveau syndrome oculo-auriculaire à transmission récessive autosomique.

Les outils de génétique moléculaire dont nous disposons aujourd'hui et la structure familiale particulière permettent de localiser un locus par la technique de la cartographie par homozygotie. Dans cette approche, on fait l'hypothèse que le gène muté est transmis aux malades par un ancêtre commun à travers chacune des branches parentales. Puisque les deux segments chromosomiques transmis proviennent d'un seul ancêtre, ils seront identiques et les marqueurs analysés seront tous homozygotes. L'analyse génétique pratiquée chez les 3 individus malades a identifié une région unique d'homozygotie entre les marqueurs *D4S1582* et *D4S419* situés sur le bras court du chromosome 4. Cet intervalle de 8 millions de bases comprenait une cinquantaine de gènes plus ou moins bien caractérisés. Nous nous sommes donc concentrés sur les facteurs de transcription et des gènes impliqués dans le développement de l'œil. Après plusieurs années de recherche, nous avons identifié une délétion de 26 nucléotides dans le gène *NKX5-3* que nous avons temporairement appelé *TRIS1*. *NKX5-3*, aussi appelé *HMX1* avait été rapporté en 1992 par Stadler et al.³ mais la séquence publiée était très différente de ce que nous trouvions chez nos contrôles. En particulier,

elle avait une insertion d'un nucléotide supplémentaire qui modifiait complètement la traduction du cDNA jusqu'au deux-tiers du gène où la délétion d'un nucléotide remettait le cadre de lecture correct et rétablissait la traduction de l'homeobox caractéristique des membres de la famille des gènes *NKX5*.

Chez les vertébrés, la famille *NKX5* comprend 4 membres, *NKX5-1*, *NKX5-2*, *NKX5-3* (aussi appelés *HMX3*, *HMX2* et *HMX1*) et *SOHO1*. Alors que chez l'homme, seuls *NKX5-1*, *NKX5-2* et *NKX5-3* étaient connus, *TRIS1*, le gène que nous avons identifié, représentait-il un nouveau membre de la famille, possiblement *SOHO1* ou la séquence publiée de *NKX5-3/HMX1* était-elle erronée ? Et alors *TRIS1* représenterait-il le vrai *NKX5-3/HMX1*. Nous sommes d'avis que la seconde hypothèse est correcte. Et ceci pour plusieurs raisons. Tout d'abord, nous avons étudié l'expression de *TRIS1* dans l'œil et l'oreille au cours de développement tant chez la souris que chez l'homme et chez *Danio rerio*, le poisson zèbre.

Chez la souris *TRIS1* est exprimé dans le pavillon de l'oreille, le cristallin et la rétine dès le 13.5^e jour post fertilisation. Dans la rétine, l'expression est préférentiellement présente dans la rétine inférieure et la pôle postérieure du cristallin (fig. 1). Chez l'embryon humain de 20 semaines,

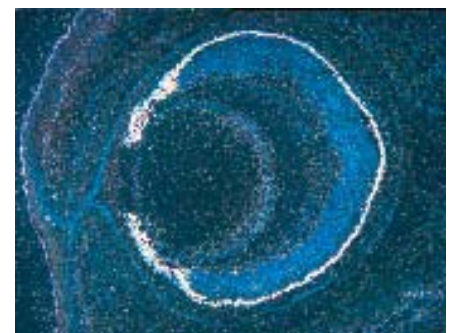


Fig. 1 Coupe histologique d'un œil d'embryon de souris à 19.5 jours.

L'expression de *NKX5-3* est visible sous la forme de petits points blancs dans la rétine inférieure et la partie postérieure du cristallin.

nous retrouvons également une expression asymétrique principalement dans la couche nucléaire interne de la rétine postérieure. Chez ce même fœtus, le pavillon de l'oreille exprime *TRIS1*, alors que la peau autour du pavillon ne l'exprime pas. Il semble donc bien que, compte tenu de l'homologie de séquence qui existe entre *TRIS1* et *Nkx5-3/Hmx1* de la souris et de l'expression de ce gène durant la vie embryonnaire, *TRIS1* représente le vrai *NKX5-3/HMX1* et que la séquence présente dans Genbank à l'époque n'était pas correcte. Incidemment, Genbank a remplacé l'ancienne entrée par une nouvelle, identique à notre gène.

L'identification d'une délétion dans un gène n'est pas suffisante pour prouver la causalité de ce gène dans la pathogenèse d'une maladie héréditaire, surtout si l'analyse ne porte que sur une seule famille. Nous avons donc décidé d'invalider le gène *NKX5-3/HMX1* chez le zebrafish pour voir les effets sur le développement de l'œil. Mais tout d'abord, il fallait montrer que *NKX5-3/HMX1* était également exprimé dans ce poisson et aux mêmes endroits. A notre grande surprise, le gène annoté comme *Hmx1* chez le zebrafish était également erroné. Après plusieurs semaines d'analyses et en se basant sur l'homologie entre les différents membres de la famille des *NKX5*, de leur position respective sur les différents chromosomes, nous avons identifié le vrai gène *Nkx5-3* du zebrafish et montré que le gène précédemment annoté « *Hmx1* » était, en fait, *Sohl1*, le 4^e membre de la famille. *Nkx5-3/Hmx1* du zebrafish est également exprimé dans l'œil et dans l'oreille, ce qui indique que la famille des gènes *Nkx5* est très ancienne et, si elle persiste dans des organismes aussi divergents que le zebrafish et l'homme, c'est qu'elle doit jouer un rôle important dans le développement de l'œil.

Le zebrafish est un modèle animal particulièrement intéressant puisque l'embryon se développe à l'extérieur de la mère et qu'il est transparent. Il est donc possible de suivre en continu son développement. Vingt-quatre heures après fertilisation, l'œil est déjà formé (fig. 2).

Le zebrafish est également intéressant parce qu'il est possible de freiner l'expression d'un gène particulier durant 3-5 jours en injectant dans l'œuf une



Fig. 2 Zebrafish à 24 h post fertilisation. A ce stade, l'œil (à gauche de l'image) est déjà bien formé.

molécule qui va inhiber spécifiquement la traduction du mRNA de ce gène. Nous avons utilisé cette technique pour bloquer transitoirement la fonction de *Tris1* chez le zebrafish. L'œil du zebrafish se développe moins bien, il est microphtalme et les différentes couches de la rétine sont en retard par rapport à un embryon normal. De manière fort intéressante, l'injection simultanée d'un cDNA de *NKX5-3* est capable de corriger l'absence de *NKX5-3* endogène et l'œil retrouve sa taille normale.

Ainsi, ces expériences sur le zebrafish confirment l'implication de *NKX5-3/HMX1* dans la pathogenèse de ce nouveau syndrome oculo-auriculaire qui pourrait s'appeler syndrome de Schorderet-Munier-Franceschetti.⁴

Références

- 1 Goldenhar M. Associations malformatives de l'œil et de l'oreille, en particulier le syndrome dermoïde épibulbaire-appendices auriculaires-fistula auris congenita et ses relations avec la dysostose mandibulo-faciale. *J génét hum*, Genève 1952 ;1: 243-282.
- 2 Franceschetti A, Valerio M. *Confin. Neurol.* 1945; 6:255-257.
- 3 Stadler HS, et al. Identification and genetic mapping of a homeobox gene to the 4p16.1 region of human chromosome 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89:11579-11583.
- 4 Schorderet DF, Nichini O, Boisset G, Polok B, Tiab L, Mayeur H, Raji B, de la Housaye G, Abitbol MM, Munier FL. Mutation in the human homeobox gene *NKX5-3* causes an oculo-auricular syndrome. *Am J Hum Genet* 2008; 82(5):1178-84.

ophtha
4|2008 14. Jahrgang / 14^e Année

Schweizerische Fachzeitschrift für
augenärztliche Medizin und Technologie
mit Mitteilungen SOG
Revue suisse spécialisée pour la médecine
et la technique ophtalmologique
avec informations SSO

Herausgeber / Editeurs

Manfred Burth/Targetmedia, Dr. Ulrike Novotny
Haltenrain 4, CH-6048 Horw/LU
Tel. 041 340 47 17, Fax 041 340 47 18
info@targetmedia-online.ch

Redaktion / Rédaction

Chefredaktor / Rédacteur en chef :

Dr méd. Albert Franceschetti
1, av. J.-D. Maillard, CH-1217 Meyrin
Tél. 022 783 10 90, Fax 022 783 10 99
albert@franceschetti.net

Verantwortlicher Redaktor Deutschschweiz /

Rédacteur responsable Suisse Alémanique :

Dr. med. Dietmar Thumm
Bahnhofplatz 4, CH-6002 Luzern
Tel. 041 226 3010, Fax 041 226 3015
dietmar.thumm@augentagesklinik.com

Chefin vom Dienst / Rédacteur responsable

Dr. med. Ulrike Novotny
Tel. +49 7732 94 1000, Fax +49 1805 060 348 046 98
uno@unomedtext.de

Offizielle Mitteilungen SOG

Informations officielles SSO

Sekretariat: Prof. Peter M. Leuenberger,
Kirchbühl 5, 3400 Burgdorf
Tel. 034 422 94 11, Fax 034 423 45 40
peter.m.leuenberger@bluewin.ch

Verwaltungssekretariat SOG

Secrétariat administratif SSO

Fürsprecher Christoph Egli
Berneckerstrasse 26
Postfach 95, CH-9435 Heerbrugg
Tel. 071 727 16 61, Fax 071 727 16 62
sog@erlaw.ch

Erscheinungsweise / Parution

7 x jährlich / 7 x annuel

Abonnement

Schweiz / Suisse CHF 86.- inkl. MwSt.
Ausland / Etranger CHF 95.-

Inserate / Abonnements

Michael Habermehl, Geschäftsführung
Susanne Preisig, Administration
Targetmedia
Haltenrain 4, CH-6048 Horw/LU
Tel. 041 340 47 17, Fax 041 340 47 18
info@targetmedia-online.ch

Druck / Impression

UD Print AG, Reussgasse 9, 6002 Luzern
Layout/Herstellung: Irene Bucher
Tel. 041 491 91 91, Fax 041 491 91 92
ISDN 041 491 98 11, irene.bucher@ud-print.ch