

Aus dem Institut für Humangenetik
des Zentrums für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin
des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktor Prof. Dr. A. Gal

**Kartierung eines Locus für die
autosomal rezessive Retinitis pigmentosa durch
Kopplungsanalyse**

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Bahmann Moazami-Benab
aus Hamburg
Hamburg 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 10.05.2006

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der
Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/ die Vorsitzende: Prof. Dr. A. Gal

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/ in: Prof. Dr. O. Strauß

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/ in: PD Dr. S. Kindler

Meinem Vater und meiner Mutter gewidmet.

Inhalt

	Seite
1 Einleitung	1
1.1 Zielsetzung	1
1.2 Retinitis Pigmentosa	6
1.2.1 Klinik, Diagnose und Differentialdiagnose	6
1.2.2 Therapie der Retinitis Pigmentosa	10
1.2.3 Pathophysiologie	12
1.3 Kopplung und Rekombination von Genen	15
1.3.1 Kopplungsanalyse	15
1.3.2 Berechnung der LOD-Scores	16
1.3.3 Homozygosity Mapping	18
2 Familie, Methoden und Materialien	20
2.1 Familie	20
2.2 Methoden	22
2.2.1 DNA-Isolierung	22
2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion	22
2.2.3 Chromosomale Marker	24
2.2.4 Produktprüfung auf Agarosegel	25
2.2.5 Analyse durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese	27
2.2.6 Analyse der DNA-Proben mit GeneScan	30
2.2.7 Berechnung der LOD-Scores	32
2.3 Materialien	33
(Chemikalien/ Lösungen/ Nukleotide/ Enzyme/ Geräte)	
2.3.1 DNA-Isolierung	33
2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion	33

2.3.3 Produktprüfung	34
2.3.4 Polyacrylamidgel-Elektrophorese	35
2.3.5 GeneScan	36
2.3.6 Sonstiges	36
3 Ergebnisse	37
3.1 Ausschluss der Kandidatengene	37
3.2 Segregationsdaten nach genomweiter RP-Locussuche	44
3.3 Berechnung der Zweipunkt-LOD-Scores	61
3.4 Berechnung der Mehrpunkt-LOD-Scores	63
4 Diskussion	65
4.1 Einleitung	65
4.2 Homozygoty Mapping	65
4.3 Ergebnisse in dieser Familie	67
4.4 Kandidatengen-Ausschluss und Suche nach weiteren Kandidatengenen	70
4.5 Mögliche Bedeutung dieser Arbeit für Diagnostik und Therapie	71
5 Zusammenfassung	73
6 Literaturverzeichnis	75
7 Lebenslauf	85
8 Danksagung	86

1 Einleitung

1.1 Zielsetzung

Die Retinitis pigmentosa (RP) gehört zur Gruppe der hereditären tapetoretinalen Dystrophien (s. Abb. 1). Sie kann isoliert (non-syndromic RP) oder mit anderen klinischen Merkmalen vergesellschaftet als Syndrom vorkommen. Ursächliche Mutationen, Vererbungsmodi, Phänotypen und Penetranz sind äußerst heterogen (Inglehearn et al. 1998). So sind autosomal dominante (ad), autosomal rezessive (ar), X-chromosomale, digenische und maternale (mitochondriale) Erbgänge beschrieben worden. Viele Erkrankte werden als sog. Simplex-Fälle beschrieben, da sie als die einzigen Betroffenen in ihrer Familie zu finden sind. Meist tragen diese Personen jedoch keine Neumutationen in ihrem Erbgut, sondern eher die Kombination ihrer heterozygot mutierten elterlichen Gene. Diese Heterozygotie für ein RP-Gen wird bei einer von fünfzehn Personen in der Bevölkerung gefunden (Jurklies et al. 1997). Epidemiologisch leidet eine von 3000-5000 Personen (Zrenner et al. 1992) bzw. ungefähr 1,5 Millionen Menschen weltweit an RP (Berson et al. 1996), womit diese die häufigste hereditäre retinale Dystrophie ist.

Ziel dieser Arbeit war es, eine deutsche Familie, mit mehreren an einer autosomal rezessiv erblichen Retinitis pigmentosa (arRP) erkrankten Mitgliedern, auf die bereits beschriebenen arRP-Loci (s. Tab. 1, Quelle: <http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/sum-dis.htm>) hin zu untersuchen. Bei Ausschluss dieser Loci sollte dann eine genomweite Suche nach einem neuen Locus begonnen werden.

Ausschluss und Suche nach Genloci erfolgte mittels Kopplungsanalyse zu spezifischen chromosomalen Markern bzw. deren kartierten DNA-Markerloci. Wird ein neuer Krankheitslocus durch Projekte wie dieses gefunden, kann man die dortigen, u.U. erst zu findenden, Kandidatengene auf Mutationen untersuchen. Hat man die Funktion eines Kandidatengens bestimmen können, so lässt dies wichtige Rückschlüsse auf die Pathophysiologie der RP zu. Spezifische Therapien wie z.B. die Substitution oder Blockierung bestimmter Stoffe oder eine Gentherapie durch Einschleusung intakten genetischen Materials wären dadurch in Zukunft möglich. Von genaueren Kenntnissen der ursächlichen Mutationen könnte auch die genetische Beratung von RP-Patienten profitieren, wenn Genotyp-Phänotyp-Korrelationen aufgedeckt werden würden.

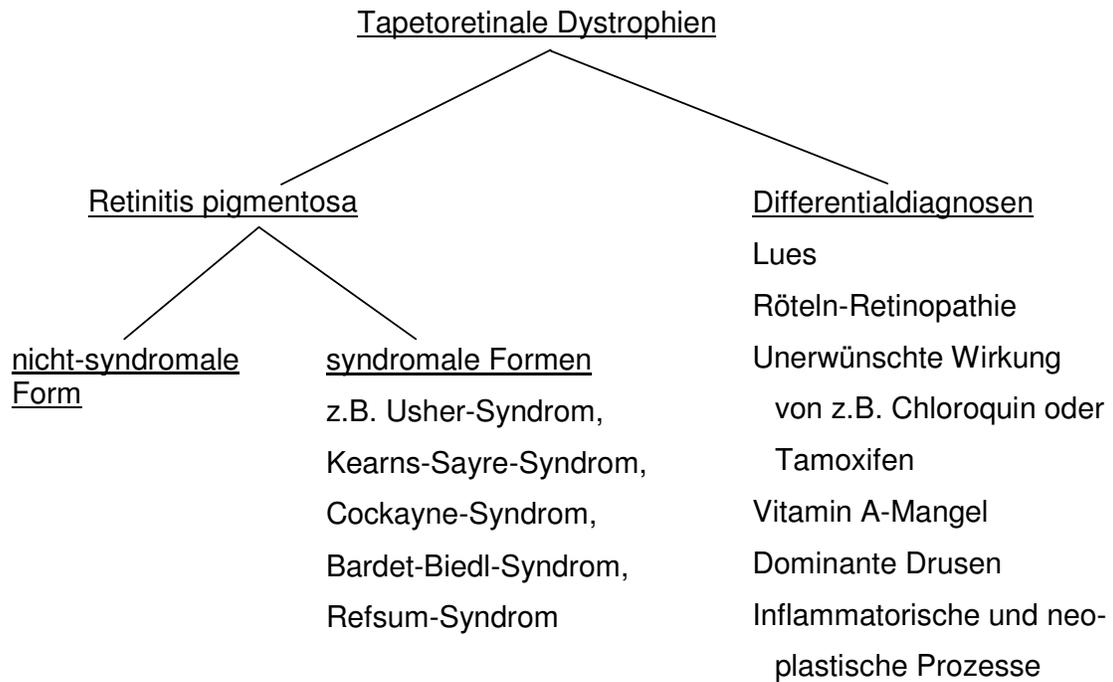


Abbildung 1:

Hereditäre tapetoretinale Dystrophien.

Tabelle 1: Bekannte arRP-Loci

Chromosom	Locus	Symbol	Protein	Kartierungsmethode	Literatur
1	1p31.2	RPE65, RP20, LCA2	retinal pigment epithelium-specific 65 kD Protein	Kopplungsanalyse, Kandidaten-Gen	Gu 1997, Nicoletti 1995
	1p22.1	ABCR, RP19, STGD1, ABCA4	ATP-binding cassette transporter-retinal	Kopplungsanalyse, Kandidaten-Gen	Martinez-Mir 1998, Cremers 1998
	1q31.3	RP12, CRB1	crumbs homolog 1	Kopplungsanalyse, Kandidaten-Gen	Leutelt 1995, den Hollander 1999
	1q41	USH2A	usherin	Kopplungsanalyse, Kandidaten-Gen	Rivolta 2000
2	2p11-p16	RP28	?	Kopplungsanalyse	Gu 1999
	2q13	MERTK	c-mer protooncogene receptor tyrosine kinase	Kopplungsanalyse, Kandidaten-Gen	Gal 2000
	2q31-q33	RP26	?	Kopplungsanalyse	Bayes 1998
	2q37.1	SAG	Arrestin (S-Antigen)	Kopplungsanalyse, Kandidaten-Gen	Fuchs 1995, Maw 1995, Nakazawa 1998, Wada 1996
3	3q22.1	RHO, RP4	Rhodopsin	Kandidaten-Gen	Rosenfeld 1992

Für aktuelle Daten siehe bitte: <http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/sum-dis.htm>.

weiter Tabelle 1: Bekannte arRP-Loci

Chromo-som	Locus	Symbol	Protein	Kartierungs-Methode	Literatur
4	4p16.3	PDE6B, CSNB3	rod cGMP phosphodiesterase beta subunit	Kopplungsanalyse, Kandidaten-Gen	Mc Laughlin 1993, Valverde 1995, Weber 1991
	4p12	CNGA1, CNCG, CNGC1	rod cGMP-gated channel alpha subunit	Kopplungsanalyse, Kandidaten-Gen	Dryja 1995
	4q32.1	LRAT	lecithin retinol acyltransferase	Kandidaten-Gen	Thompson 2001
	4q32-q34	RP29	?	Kopplungsanalyse	Hameed 2001
5	5q33.1	PDE6A	cGMP phosphodiesterase alpha subunit	Kandidaten-Gen	Huang 1995, Dryja 1999, Pittler 1990
6	6p21.31	TULP1, RP14	tubby-like protein 1	Kopplungsanalyse, Klonierung	Banerjee 1998, Hagstrom 1998
	6cen-q15	RP25	?	Kopplungsanalyse	Ruiz 1998
8	8q12.3	TTPA	alpha-tocopherol-transport protein	Kandidaten-Gen	Yokota 1996

Für aktuelle Daten siehe bitte: <http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/sum-dis.htm>.

weiter Tabelle 1: Bekannte arRP-Loci

Chromo-som	Locus	Symbol	Protein	Kartierungs-Methode	Literatur
10	10q23.1	RGR	retinal G protein coupled receptor	Kopplungsanalyse, Kandidaten-Gen	Chen 1996, Morimura 1999
15	15q23	NR2E3, ESCS, PNR	nuclear receptor subfamily 2 group E3	Kopplungsanalyse, Kandidaten-Gen	Gerber 2000, Kobayashi 1999
	15q26.1	RLBP1, CRALBP	cellular retinaldehyde-binding protein	Kopplungsanalyse, Klonierung	Maw 1997
16	16p12.3-p12.1	RP22	?	Kopplungsanalyse	Finckh 1998
	16q13	CNGB1, CNCG2	rod cGMP-gated channel beta subunit	Kopplungsanalyse, Kandidaten-Gen	Bareil 2001, Ardell 2000

Für aktuelle Daten siehe bitte: <http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/sum-dis.htm>.

1.2 Retinitis pigmentosa

1.2.1 Klinik, Diagnose und Differentialdiagnose

Die Klinik der Retinitis pigmentosa wird u.a. bestimmt durch jeweils beidseitig fortschreitenden Gesichtsfeldverlust und Nachtblindheit als Zeichen eines Photorezeptorfunktionsverlustes. Das Skotom entwickelt sich zweistufig zunächst in der mittleren Peripherie, bevor dann als zweite Stufe eine rapide konzentrische Zunahme der Gesichtsfeldausfälle auftritt (Jurklies et al. 1997), die dann ungefähr vom 30. bis zum 60. Lebensjahr zur Blindheit führt (Berson et al. 1996). Es können Refraktionsanomalien, Katarakt und Glaskörperveränderungen vorkommen.

Je nach Vererbungsmodus verläuft die RP unterschiedlich: Die ad (autosomal dominante) RP wird häufig relativ spät symptomatisch und verläuft in der Regel langsam. Ihre zweite Stufe beginnt durchschnittlich nach dem 30. Lebensjahr, und ein Restsehvermögen bleibt meist bis ins höhere Alter erhalten. Es werden klinisch zwei Typen unterschieden (nach Massof und Finkelstein 1987): 1. Der diffuse Typ mit diffusem, frühem und starkem Abfall der Stäbchenfunktion und 2. der regionale Typ mit lokalem Abfall der Empfindlichkeit von Stäbchen und Zapfen in der Retina bei späterem und milderem Verlauf.

Bei autosomal rezessiver Vererbung beginnt die RP gewöhnlich früher und verläuft schneller. Diese Form findet sich auch bei syndromischen Fällen, z.B. dem Usher-Syndrom, welches u.a. mit angeborener Taubheit (Typ I), mit Schwerhörigkeit (Typ II) oder progredienter Schwerhörigkeit (Typ III) einhergeht (Bolz et al. 2002).

Als dritthäufigste Art wird die RP X-chromosomal vererbt. Sie wird bei den männlichen Betroffenen sehr früh und schnell fortschreitend manifest. Konduktorinnen zeigen Teilbefunde, die unterschiedlich ausgeprägt und asymmetrisch vorkommen können. Sie können gelegentlich funduskopisch oder durch das Elektroretinogramm identifiziert werden. Im Alter können zusätzlich Visus- und Gesichtsfeldeinschränkungen auftreten (Rivolta et al. 2002).

Die diagnostischen Möglichkeiten bei der RP beginnen schon vor einem symptomatischen Auftreten mit dem ERG. Hier zeigen sich deutlich reduzierte und verzögerte Antworten des Stäbchensystems der Retina (Nachtsehstörung), während die Zapfen in der Regel erst später ihre Funktion verlieren (Visusstörung und Farb-

sinnstörung) (Kellner et al. 2003). Eine getrennte Beurteilung der Stäbchen- und Zapfenfunktion wird durch eine vorherige Dunkel- bzw. Helladaptation erreicht.

Die Prüfung des Gesichtsfeldes mittels Goldmann-Perimeter erlaubt die Differenzierung zwischen RP mit einem Ringskotom und anderen Netzhautdystrophien wie z.B. der Makuladystrophie mit zentralem Skotom (s. Abb. 2: E).

Funduskopisch zeigen sich die typischen Befunde beidseits symmetrisch. Fast immer nachweisbar sind wachsgelbe Papillen, verengte Gefäße und Makulaveränderungen mit Reflexverbreiterung (Zrenner et al. 1992). Das retinale Pigmentepithel zeigt erst Depigmentierungen, bevor man nach drei bis fünf Jahren Hyperpigmentationen und Knochenkörperchen, als Zeichen von Migration von melanhaltigen Strukturen in der Retina, ophthalmologisch feststellen kann (s. Abb. 2: A-D). Geschichtlich waren diese Knochenkörperchen der erste Befund, der, beschrieben von Donders im Jahre 1857, zur missverständlichen Namensgebung Retinitis pigmentosa führte (Donders 1857).

Wichtig ist auch die Familienanamnese der Patienten. Sie kann Aufschluss über den Vererbungsmodus und somit ggf. über den wahrscheinlichen Verlauf und Prognose der Erkrankung geben. Auch von Interesse für den Patienten ist das Vererbungsrisiko für seine Nachkommen. Die Eigenanamnese dient natürlich auch der Diagnose einer RP und zusätzlich dem Ausschluss eventuell behandelbarer Differentialdiagnosen.

Einige Krankheiten können eine RP durch ihr funduskopisches Erscheinungsbild vortäuschen. So müssen z.B. ein ausgeheiltes Lues, die Röteln-Retinopathie, die chronisch-rezidivierende posteriore Uveitis und andere inflammatorische Prozesse sowie neoplastische Prozesse ausgeschlossen werden. Intoxikationen mit z.B. Chloroquin (Antibiotikum), Chlorpromazin (Neuroleptikum), Indometazin (NSAR), Tamoxifen (Antiöstrogen) und Phosphodiesterase-Hemmern (u.a. Theophyllin) oder auch ein Vitamin A-Mangel kommen ebenfalls als Ursache von Pigmentepithelpathologien in Frage (Zrenner et al. 1992).

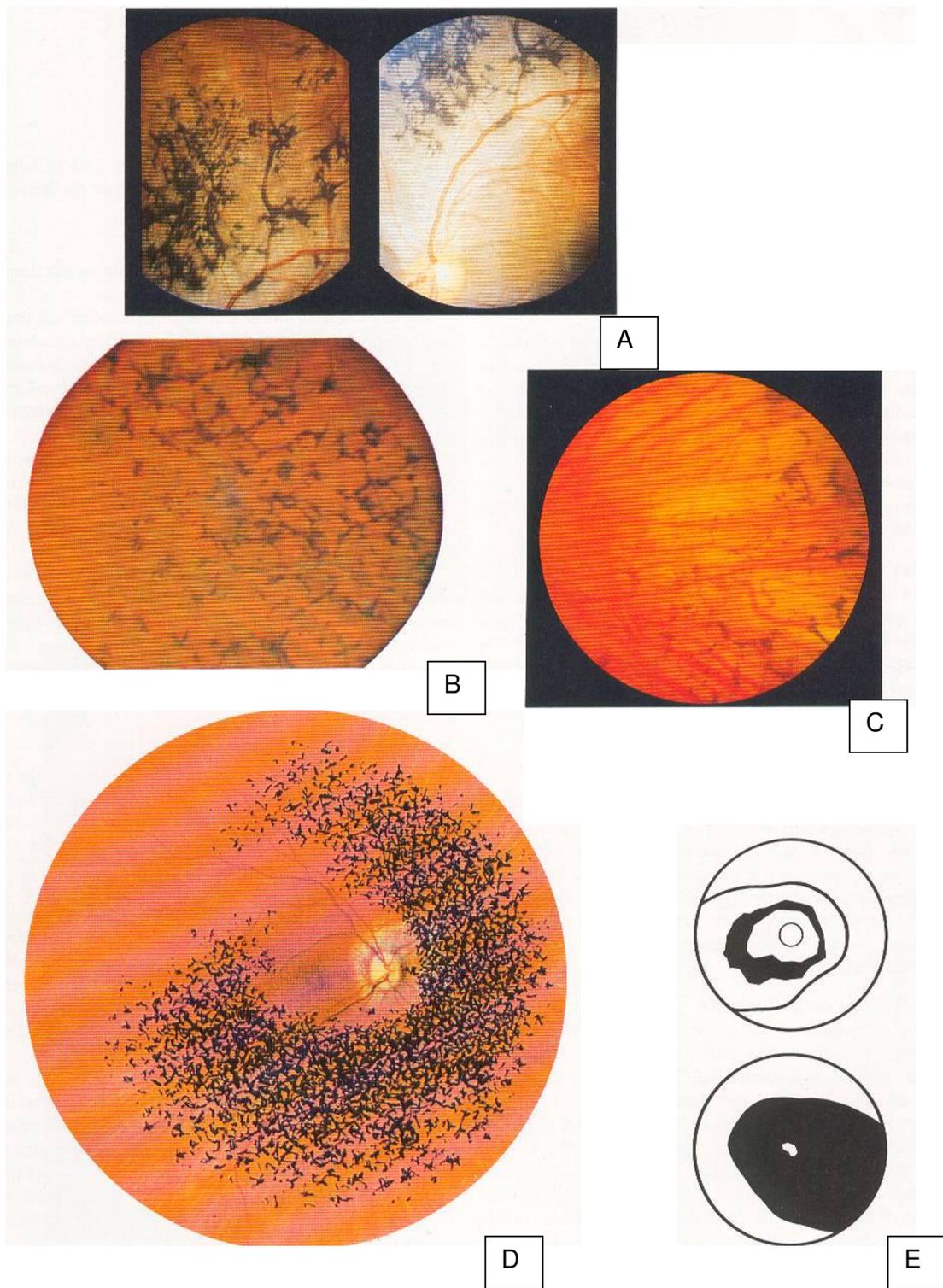


Abbildung 2:

A bis C: Funduskopische Befunde mit wachsgelber Papille, Hyperpigmentation und Knochenkörperchen, D: Veränderungen der Retina schematisch, E: Oben Typische Perimetriebefunde mit Ringskotom.

Ausschließen muss der Augenarzt auch die syndromischen Formen der RP, die meist autosomal rezessiv sind, z.B. das Usher-Syndrom (ar, Typ I vergesellschaftet mit angeborener Taubheit und vestibulärer Ataxie, Typ II mit milder nicht fortschreitender/ Typ III mit fortschreitender Schwerhörigkeit, (Bolz et al. 2002)) und das Bardet-Biedl-Syndrom (ar, mit Polydaktylie, Adipositas, Hypogonadismus, Minderwuchs, geistiger Retardierung und Nierenfunktionsstörungen). Das Refsum-Syndrom (ar, mit Ichthyose, Knochenanomalien, progredienter Schwerhörigkeit, Polyneuropathie und Ataxie) ist behandelbar, da bekannt ist, dass es auf einer Phytansäure-Abbaustörung beruht und man eine phytansäurearme Diät verordnen kann. Auch die Atrophia Gyrate (ar, defektes Gen für Ornithinaminotransferase, mit zirkulärer Aderhautdegeneration und girlandenförmigem Verlust des retinalen Pigmentepithels in der mittleren Netzhautperipherie, (Zrenner et al. 1992)) ist bei einem Teil der Patienten therapierbar. Durch einen Mangel an Ornithinaminotransferase entstehen pathologisch überhöhte Ornithinspiegel im Blut. Diese können durch eine argininarme Diät wieder gesenkt werden, so dass ein Fortschreiten der Krankheit verhindert werden kann. Die Atrophia Gyrate wird in der Literatur teilweise als eigenständige Stoffwechselkrankheit und teilweise als syndromale Form der RP angesehen (Zrenner et al. 1992).

Die Gene dieser und weiterer hereditärer Netzhautdystrophien sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Nachkommen von Betroffenen können gelegentlich schon frühzeitig hinsichtlich einer späteren Erkrankung an RP diagnostiziert werden. Bei einer anamnestisch bekannten rezessiven Form ist bei normalem ERG nach dem sechsten Lebensjahr, bzw. bei der dominanten Form nach dem 16. Lebensjahr, eine „RP praktisch ausgeschlossen“ (Zrenner et al. 1992).

1.2.2 Therapie der Retinitis Pigmentosa

Eine kausale Therapie für RP gibt es noch nicht. Eine Behandlung richtet sich nach den jeweiligen Symptomen und dem Krankheitsgrad. So sind als etablierte Maßnahmen Sehhilfen in Form von vergrößernden Optiken, Sonnenschutzbrillen und Kantengläsern bekannt. Sonnenbrillen sollen einen UV-Schutz bewirken, da bekannt ist, dass von Dystrophien geschädigte Netzhäute empfindlicher gegen UV-Licht sind. Ferner helfen sie, die erhöhte Lichtempfindlichkeit der Augen zu lindern. Brillen mit Kantenfiltergläsern, die es für verschiedene Wellenlängen des Lichts gibt, erhöhen u.a. den Kontrast des Gesehenen.

Auch Operationen können symptomatisch helfen. Allen voran die Kataraktoperation, aber auch die Laser-/ Kryoagglutination oder die Vitrektomie können bei den häufig auftretenden Linsentrübungen gegen retinale (Coats-ähnliche Gefäße) und subretinale Neovaskularisationen und Glaskörpertrübungen indiziert sein.

Medikamentös kann Azetazolamid (Carboanhydrase-Hemmer, Hemmung der Kammerwasserbildung) ein zystoides Makulaödem bei einem Teil der Patienten bessern.

Umstritten ist die hochdosierte Gabe von Vitamin A, durch die von Berson et al. (1993) lediglich ein verzögertes Abfallen der Werte im ERG nachgewiesen wurde. Im experimentellen Stadium befinden sich Therapieoptionen wie z.B. die Transplantation von retinalem Pigmentepithel (RPE) beim Menschen (Radtke et al. 1999, LaVail et al. 1992), die retinale Implantation von Phototransduktions-Mikrochips (Nadig et al. 1999), das Einschleusen intakter Gene in Mäusezellen mittels viralem Vektor (Takahashi et al. 1999, Vollrath et al. 2001) und, für die adRP, die Einschleusung von Ribozymen, welche nur die mRNA mutierter Gene spalten und so deren pathologische Wirkung neutralisieren sollen (Hauswirth et al. 2000).

Tabelle 2: Hereditäre Netzhautdystrophien/ syndromale Formen der arRP

Erkrankung	Gen	Vererbungsmodus	Genort	Protein
Atrophia Gyrate	OAT	ar	10q26	Ornithinaminotransferase
Bardet-Biedl-Syndrom	BBS5 BBS3 BBS1 BBS4 BBS2 BBS6 (MKKS)	ar ar ar ar ar ar	2q31 3p13-p12 11q13 15q22.3-q23 16q21 20p12	? ? BBS1 protein, NP078925 BBS4 protein, NP149017 BBS2 protein, NP114091 McKusick-Kaufman syndrome protein
Cockayne-Syndrom	ERCC3	ar	2q21	DNA-Helicase
Dominante Drusen	EFEMP1	ad	2p16-p21	EGF-containing fibrillin-like extra-cellular matrix protein 1
Kearns-Sayre-Syndrom	KSS	mitochondrial	mitochondrial	mitochondriale Proteine
Refsum-Syndrom	PHYH (RDPA, PAHX)	ar	10p15.3-p12.2	phytanoyl-CoA hydroxylase 1
Usher-Syndrom	USH2A USH2B USH2C USH1F USH1D (CDH23) USH1C USH1B (MYO7A) USH1E	ar ar ar ar ar ar ar ar ar	1q41 3p24.2-p23 5q14-q21 10q21-q22 10q21-q22 11p15.1 11q13.5 21q21	usherin ? ? protocadherin 15 cadherin-like gene 23 harmonin myosin VIIA ?

Literaturangaben unter <http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/disease.htm>.

1.2.3 Pathophysiologie

Hinsichtlich der pathophysiologischen Zusammenhänge, die der RP zugrundeliegen, wurden im letzten Jahrzehnt einige Fortschritte gemacht. Allein für die autosomal rezessive RP wurden bislang 22 Genloci auf neun Chromosomen beschrieben. Für 17 dieser Loci wurden die RP-Gene identifiziert.

Ein großer Teil dieser Gene erfüllt Funktionen im Vitamin A-Zyklus und im Rahmen der Phototransduktion (s. Abb. 3):

Als erstes dieser Gene wurde 1990 von Dryja et al. (1990) das Rhodopsin identifiziert. Es wurden über 90 Mutationen in diesem Gen gefunden, und nur bei drei Rhodopsin-Mutationen ein autosomal rezessiver Vererbungsmodus beobachtet. Die Mehrheit wirkt autosomal dominant. Rhodopsin wird in den Stäbchen exprimiert, wo es bei Mutation des Gens ektopt akkumuliert und wahrscheinlich so zum Zelluntergang führt (Dryja et al. 1995). Je nach Mutationsort in der Aminosäuresequenz des Proteins kann die Veränderung entweder in einer verminderten 11-cis-Retinal-Bindung, einer herabgesetzten Transduzinaktivierung oder einer pathologischen Ansammlung mutierten Opsins in den Photorezeptorscheibchen resultieren (Berson et al. 1996).

Arrestin (S-Antigen) ist ein ca. 48 kD Protein und zusammen mit der Rhodopsinkinase an der Deaktivierung des Rhodopsins nach Lichteinfall beteiligt (Palczewski et al. 1992).

Das Enzym Lecithin-Retinol-Acyltransferase ist an der Umwandlung von Vitamin A (all-trans-Retinol) in 11-cis-Retinal beteiligt. Mutationen des LRAT-Gens wurden bei Patienten mit retinaler Degeneration gefunden (Thompson et al. 2001).

Auch den Vitamin A-Metabolismus stören soll die Mutation des Gens für das zelluläre Retinaldehyd-bindende Protein (CRALBP). Es kommt im RPE und in den Müllerschen Gliazellen der Retina vor. Aus der Mutation resultiert eine geringere Löslichkeit und ein Wegfallen der 11-cis-Retinal Bindungsfähigkeit des Proteins und somit eine Unterbrechung des Vitamin A-Zyklus (Maw et al. 1997).

Das RPE-spezifische Protein mit einem ungefähren Gewicht von 65 kD (RPE65-Gen) findet sich im Endoplasmatischen Retikulum des retinalen Pigmentepithels von Wirbeltieren. Hier ist es wahrscheinlich an der Bildung von 11-cis-Retinal beteiligt (Redmond et al. 1998).

Ebenfalls vermutlich an der Herstellung von 11-cis-Retinal beteiligt ist der retinale G-Protein-bindende Rezeptor (RGR) (Maeda et al. 2003).

Ein Teil der Phototransduktionskaskade ist die cGMP-hydrolysierende Phosphodiesterase (PDE). McLaughlin beschrieb 1993 eine Mutation ihrer β -Untereinheit (McLaughlin et al. 1993) und Huang 1995 die ihrer α -Untereinheit bei der arRP (Huang et al. 1995). Im Tiermodell (rd-Maus/ „retinal degeneration Mouse“) wurde gezeigt, dass eine funktionsuntüchtige PDE zu einer Erhöhung der cytosolischen cGMP-Konzentration führt. Deren wahrscheinliche Toxizität wird sowohl bei der rd-Maus als auch beim Menschen für den Photorezeptoruntergang verantwortlich gemacht.

Der letzte Teil des Phototransduktionsprozesses besteht aus dem cGMP gesteuerten Na-Ionenkanal, bzw. dessen α -Untereinheit. Diese schließt sich durch erniedrigte intrazelluläre cGMP-Konzentrationen bei Lichteinfall und wird in ihrer cGMP-Empfindlichkeit durch die β -Untereinheit des Kanals moduliert. Mutationen der α -/ β -Untereinheit des Gens für CNGA1-/ CNGB1 resultieren entweder in einer ausbleibenden oder fehlerhaften Expression, wodurch anscheinend die Stäbchenzellen der Retina ihre Funktion nicht wahrnehmen können (Dryja et al. 1995b, Ba-reil et al. 2001).

Neben den genannten Störungen der Phototransduktion sind auch folgende pathophysiologischen Mechanismen bekannt:

Das ABCR-Gen codiert für ein Protein aus der ATP-Bindungstransporter-Familie und ist photorezeptorspezifisch. Die ABC-Genprodukte sind transmembrane Substrattransporter, ABCR wurde in den Stäbchenzellen gefunden, wo es vielleicht am Substrataustausch zwischen Stäbchen- und RPE-Zellen beteiligt ist (Allikmets et al. 1997).

Die Mutation des MERTK-Gens, welches für die Rezeptor-Tyrosinkinase codiert, führt bei der RCS-Ratte und Patienten zu einer gestörten Phagozytose der Stäbchen- und Zapfen-Außenglieder durch das retinale Pigmentepithel und einer arRP (Gal et al. 2000).

Mehr Einzelheiten sind über den mutierten GABA (Gamma-aminobutyric acid)-Rezeptor, codiert auf Chromosom 6, bekannt. Durch seine fehlende inhibitorische Wirkung erhöht sich die Ausschüttung von Glutamat in den Stäbchen- und Bipolarenzellsynapsen, von der ein toxischer Effekt ausgehen soll (Ruiz et al. 1998).

Yokota beschrieb 1996 einen weiteren Pathomechanismus. Er fand bei zwei Patienten mit RP und niedrigen Serum-Vitamin E-Konzentrationen die gleiche Mutati-

on im α -TTP-Gen, das für das α -Tocopherol-Transport-Protein codiert. Vitamin E soll einen protektiven Einfluss auf die äußere Membran der Photorezeptoren haben, die zu einem hohen Prozentsatz aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren besteht und so besonders durch Oxidation geschädigt werden kann. Als Beweis für seine Theorie führt er an, dass seine Patienten durch Vitamin E-Gabe eine Besserung bzw. ein Sistieren der Progression ihrer RP erfuhren (Yokota et al. 1996). Zuletzt soll das, nur in der Retina exprimierte, tubby-like Protein 1 erwähnt sein. Sein Gen (TULP1) gehört zur Familie der „tubby-like genes“ von Pflanzen, Wirbeltieren und wirbellosen Tieren. Die Funktion dieses Proteins ist noch unbekannt (Hagstrom et al. 1998).

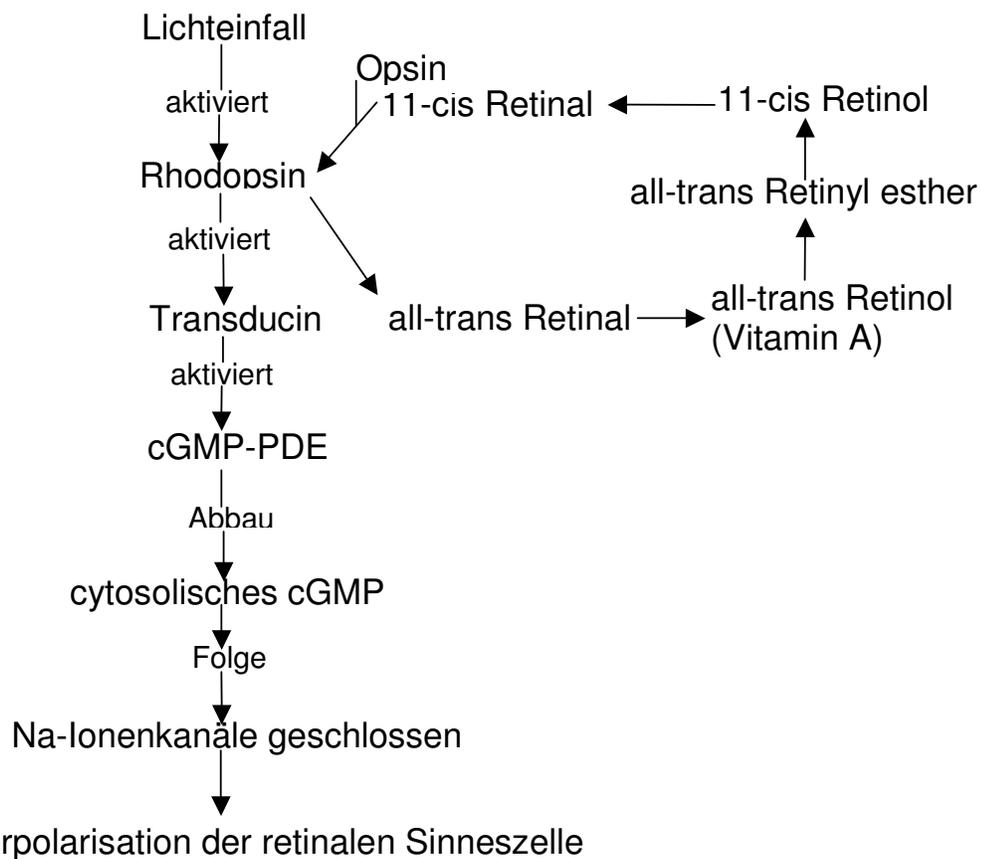


Abbildung 3:

Vereinfachtes Schema des Phototransduktionsprozesses und des Vitamin A-Zyklus.

1.3 Kopplung und Rekombination von Genen

1.3.1 Kopplungsanalyse

Gene werden gemeinsam vererbt, wenn ihre jeweiligen Loci nahe genug beieinander auf demselben Chromosom liegen. Man spricht hier von Kopplung; die beteiligten Loci sind gekoppelt. Die Wahrscheinlichkeit einer Kopplung steigt, je näher sich die Genorte sind. Umgekehrt steigt die Wahrscheinlichkeit der zufälligen Trennung zweier Loci, je weiter sie voneinander entfernt liegen. Die Trennung erfolgt beim Crossingover während der Meiose, bei der homologe Chromosomenabschnitte ausgetauscht rekombiniert werden. Im Ergebnis können die vererbten elterlichen Gameten rekombinant oder nicht-rekombinant in bezug auf das Verhältnis zweier Genloci zueinander sein.

Die Beobachtung von Kopplung und Rekombination von Genloci ist in zweierlei Hinsicht von Interesse: Man kann einerseits die relative Entfernung und Reihenfolge zwischen Genorten ermitteln, als Ausdruck ihrer Rekombinationshäufigkeit, und andererseits anhand von Markerloci einen gesuchten Locus kartieren, wenn diese Loci hinreichend wahrscheinlich miteinander gekoppelt vorliegen. Beide Anwendungen sind essentiell für die Durchführung einer Kopplungsanalyse.

Die Rekombinationswahrscheinlichkeit oder auch die Fraktion der für zwei Genloci rekombinanten Gameten nach der Meiose wird als θ (Theta) in Prozent angegeben. Sie kann maximal 50% ($\theta = 0,5$) betragen, welches eine freie Rekombination bzw. die zufällige Segregation der zwei Loci bedeuten würde. Diese Loci können auf verschiedenen Chromosomen oder weit entfernt auf dem gleichen Chromosom liegen. Theta von z.B. 0,1 (10%) entspricht einer relativen Entfernung in Rekombinationseinheiten von 10 Centimorgan (cM). Diese Maßeinheit der genetischen Distanz entspricht einer physikalischen Distanz von etwa 1,05 Megabasen beim Mann, bei der Frau von etwa 0,7 Mb, im Durchschnitt also 0,88 Mb und annäherungsweise 1 Mb.

Um eine genomweite Suche nach einem Krankheitsgen durchführen zu können, braucht man eine große Anzahl von Markerloci, die über das gesamte Genom verteilt vorliegen und hoch polymorph sind, so dass es möglichst viele Menschen gibt, die hierfür heterozygot sind.

Mikrosatelliten erfüllen beide Bedingungen. Sie bestehen meist aus repetitiven CA (Cytosin-Adenin)-Dinucleotiden und sind leicht durch PCR (Polymerase-

Kettenreaktion) zu amplifizieren und darzustellen. Sie unterscheiden sich durch die Länge ihrer Allele zwischen den verschiedenen untersuchten Personen.

Einen Grad für die Informativität eines Markers liefert die mittlere Heterozygotie der Bevölkerung für diesen Marker. Sie ergibt sich aus der Anzahl der verschiedenen Allele (1,2,3,...) und der jeweiligen Frequenz (p) in der Bevölkerung: $1 - (p_1^2 + p_2^2 + p_3^2 + \dots)$.

1.3.2 Berechnung der LOD-Scores

Eine Kopplung wird angenommen, wenn sie statistisch wahrscheinlich genug ist. Aus der Wahrscheinlichkeit (Likelihood, L) für eine Kopplung dividiert durch die Wahrscheinlichkeit gegen eine Kopplung ergibt sich ein Quotient, der odds ratio genannt wird. Diese Wahrscheinlichkeiten ergeben sich aus der Rekombinationsfraktion θ bzw. der Annahme der Nicht-Kopplung mit der Fraktion von 0,5. Das Verhältnis muss mindestens 1000 zu 1 betragen, damit es statistisch sicher genug auf eine Kopplung hinweist. Der dekadische Logarithmus einer odds ratio von 1000/1 wäre dann ein sogenannter LOD-Score von 3 [LOD-Score $Z(\theta) = \log_{10}(L(\theta)/L(0,5))$].

Die Annahme gegen eine Kopplung zweier Loci an einem θ -Wert gilt als statistisch belegt, wenn der LOD-Score ≤ -2 beträgt.

Man kann die LOD-Scores verschiedener Familien mit gemeinsamem Krankheitslocus addieren, um die statistische Absicherung von $Z = 3$ einer Kopplung mit einem Markerlocus zu erreichen.

Die Berechnung der LOD-Scores wird Computerprogrammen überlassen (s. S. 32). Es müssen, wenn unbekannt, die wahrscheinlichsten Genotypen der Elterngeneration aus Daten von bereits analysierten Verwandten und der Genfrequenz ermittelt und dann für die möglichen Rekombinationsfraktionen (θ) des Markers im Stammbaum die jeweiligen LOD-Scores berechnet werden. Die wahrscheinlichste errechnete Rekombinationsfrequenz (θ) ist diejenige mit dem höchsten LOD-Score.

Um Geschwindigkeit und Genauigkeit einer Kopplungsanalyse zu erhöhen, benutzt man gleich mehrere chromosomale Marker für die Eingrenzung eines möglichen Krankheitslocusses. In dieser sogenannten Mehrpunkt-Kopplungsanalyse werden Marker benutzt, deren Reihenfolge und relative Entfernung voneinander bereits auf einer Karte angegeben sind, so dass der Computer im Idealfall eine

signifikante Kopplung zwischen zwei dieser Markerpositionen errechnet. Der höchste Punkt der daraus resultierenden Kurve ist der wahrscheinlichste Ort für diese Kopplung (s. Abb. 4). Eine aktuelle Liste der Marker bietet z.B. <http://cedar.genetics.soton.ac.uk/ldb.html>.

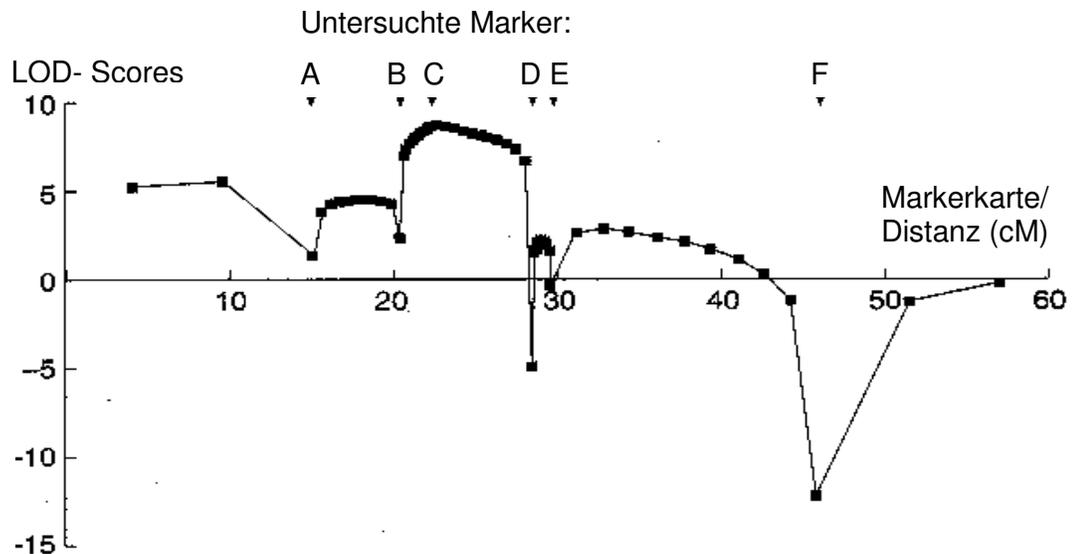


Abbildung 4:

Beispielhafte graphische Darstellung einer Mehrpunkt-LOD-Score-Berechnung. Ein Computerprogramm berechnete die Wahrscheinlichkeit der Lage eines Krankheitslocusses unter den verschiedenen Markerloci auf der Karte unter Berücksichtigung der Segregationsdaten des Stammbaumes. Der höchste und gleichzeitig über drei liegende Punkt der Kurve zeigt die wahrscheinlichste Position des Krankheitslocusses an (C). Werte unter -2 schließen eine Kopplung des untersuchten Markers mit dem Krankheitslocus aus (D, F).

1.3.3 Homozygosity Mapping

Bei Familien mit Erbkrankheiten, bei denen ein autosomal rezessiver Erbgang nachgewiesen wurde, ist das Auffinden eines Krankheitslocusses erschwert: In der Regel stehen hier weniger Patienten zur Verfügung als bei autosomal dominanten Erbgängen. Wenn jedoch die Vorfahren der Patienten miteinander verwandt waren, wird ein Nachweis einfacher, da signifikante LOD-Scores mit weniger untersuchten Personen zu erzielen sind (Farrall et al. 1993). Die Methode des „Homozygosity Mapping“ setzt voraus, dass ein Krankheitsallel von einem gemeinsamen Vorfahren der Elterngeneration getrennt an beide Nachkommen vererbt wurde (s. Abb. 5). Wenn einem Untersucher der Nachweis des identischen Allels durch eine Haplotypenbildung der Eltern gelingt, dann gilt z.B. bei Cousin-Cousine-Verbindungen ersten Grades und einem homozygoten Nachkommen eine Wahrscheinlichkeit von 16/1 für Kopplung von Marker- zu Krankheitslocus (odds ratio). Bei solchen Familien mit einem betroffenen Nachkommen kann also schon ein LOD-Score von 1,2 errechnet werden (Farrall et al. 1993). Je weiter zurück der gemeinsame Verwandte im Stammbaum zu finden ist, desto kleiner ist der Teil des Genoms, den er mit der Indexperson in der letzten Generation teilt. Entsprechend steigt der LOD-Score bei einem eventuell gefundenen Krankheitslocus in diesem Bereich. Die Segregationsdaten eines betroffenen Kindes, dessen Eltern Cousin-Cousine zweiten Grades sind, würden bereits einen LOD-Score von 1,8 aufweisen ($\log 64/1$). Zwei weitere betroffene Geschwister hätten einen LOD-Score von 3 zur Folge ($64 \times 4 \times 4 = 1024/1$).

Es muss allerdings beachtet werden, dass mit sich entfernenden Verwandtschaftsgraden die Möglichkeit steigt, dass sich ein zweites Allel für den Krankheitslocus oder für den Marker in der Familie einfindet. Ideal für eine solche Analyse wären also ein in der Bevölkerung selten vorkommendes Krankheitsallel, wobei jedoch genügend Probanden zur Verfügung stehen sollten, und möglichst polymorphe chromosomale Marker in dessen Nähe.

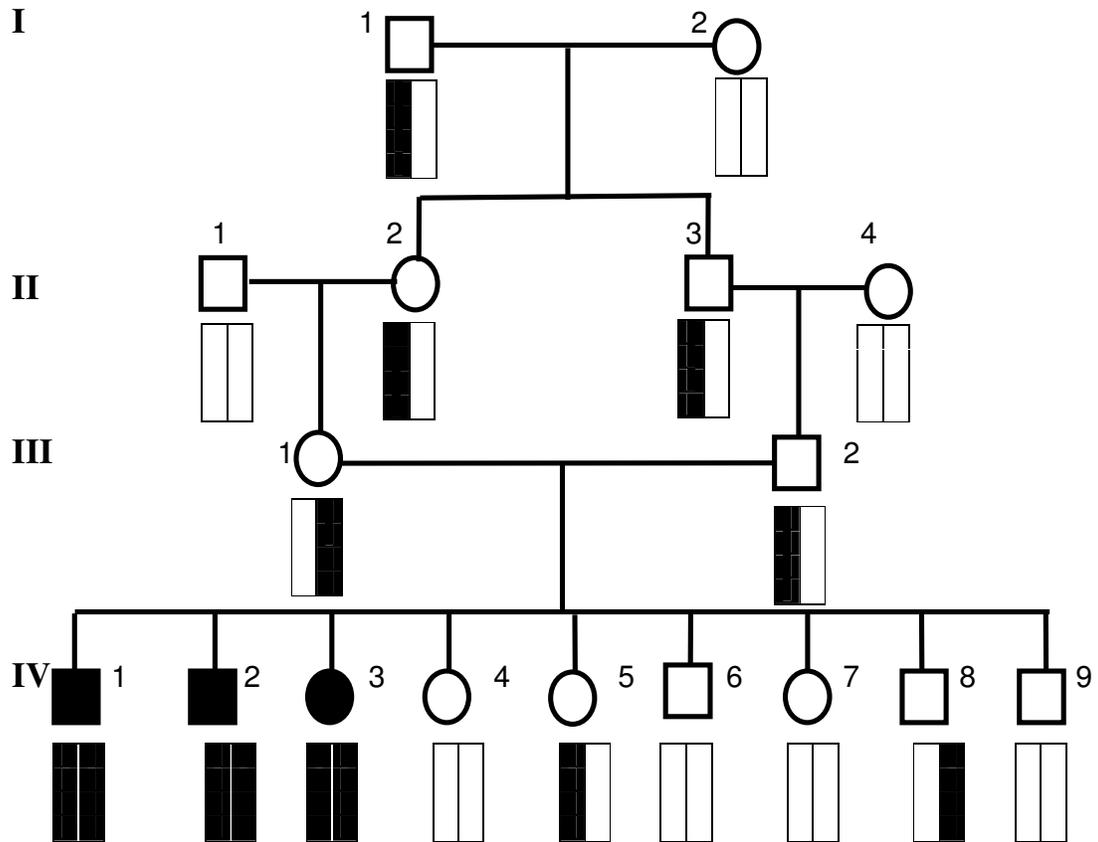


Abbildung 5

Vereinfachter Stammbaum einer Cousin-Cousine-Verbindung ersten Grades (Person III₁ und III₂). Person I₁ vererbt Person III₁ und III₂ ein Krankheitsallel einer autosomal rezessiven Erkrankung, welches bei den betroffenen Person IV₁-IV₃ homozygot vorliegt.

2 Familie, Methoden und Materialien

2.1 Familie

Bei der untersuchten deutschen Familie handelt es sich um neun Geschwister, deren Eltern blutsverwandt waren. Der genaue Verwandtschaftsgrad der Eltern ist jedoch unbekannt. Die Angaben der Geschwister, von denen drei an RP leiden, wurden im Jahre 1992 zusammengetragen von Prof. Dr. Birgit Lorenz in der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Universität Regensburg (s. S. 21, Abb. 6: Stammbaum).

Anamnestisch litt Indexpatient II₂ schon seit früher Kindheit an Nachtblindheit. Im Jugendalter traten Gesichtsfelddefekte und insgesamt eine zunehmende Sehbehinderung auf. Mit 27 wurden in beiden Augen posteriore subcapsuläre Katarakte und im Augenhintergrund die RP-typischen Veränderungen wie wachsgelbe Papillen, verengte Gefäße und Knochenkörperchen (s. Kap. 1.2.1) gefunden. Der betroffene ältere Bruder und die ebenfalls erkrankte jüngere Schwester des Patienten zeigten etwas mildere bzw. um einige Jahre verzögerte Krankheitsverläufe in ihrer Anamnese. Alle drei Patienten wurden in ihrem dritten Lebensjahrzehnt wegen Blindheit berentet.

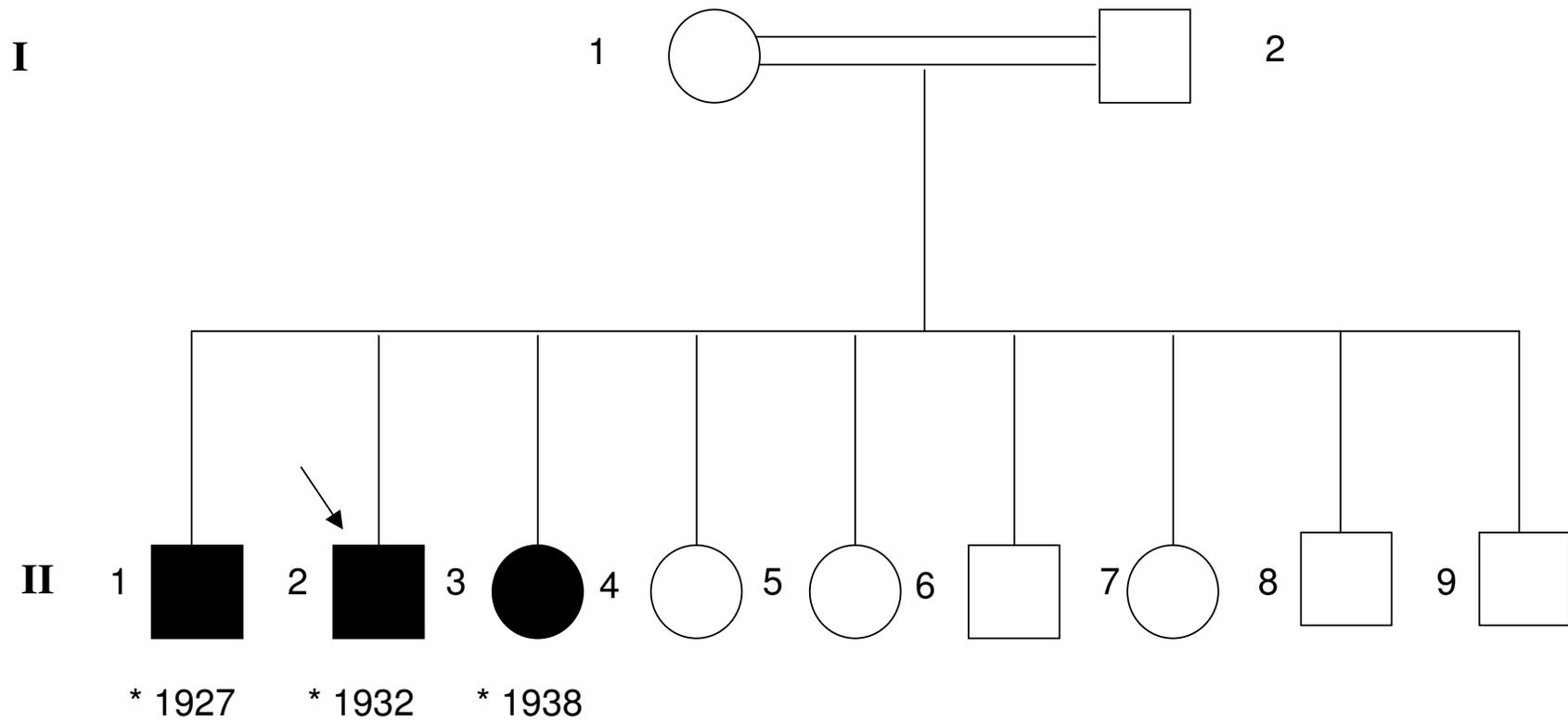


Abbildung 6:
Stammbaum der in dieser Arbeit untersuchten Familie.

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Isolierung

Die DNA-Proben der neun untersuchten Personen wurden vom Institut für Humangenetik zur Verfügung gestellt. Ihre Konzentrationen lagen zwischen 95 µg/ml und 530 µg/ml. Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden dann, durch Zugabe von Aqua dest., Arbeitsverdünnungen zu je 100 µg/ml hergestellt.

Die Isolierung der DNA aus EDTA-Blut wurde von den Mitarbeitern des Instituts nach der sog. Aussalzmethode vorgenommen. Hierbei werden im wesentlichen erst die Erythrozyten lysiert und abzentrifugiert. Dann werden die verbleibenden Leukozyten ebenfalls lysiert und in Kochsalzlösung zentrifugiert. Dem entnommenen Überstand wird Alkohol beigefügt, so dass die in ihm enthaltene DNA ausfällt. Man kann diese Makromoleküle nun greifen und, in Tris-EDTA gelöst, lagern.

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode, mit der selektiv DNA-Sequenzen amplifiziert werden. Hierzu muss eine kurze Sequenz vor der zu Amplifizierenden bekannt sein, um einen Startpunkt für die komplementäre Neusynthese zu haben. An diese Sequenz binden speziell synthetisierte Oligonukleotide, Primer, die ca. 15-25 Nukleotide lang sind. Sie ermöglichen einer DNA-Polymerase, unter Zugabe der vier Desoxynukleosid-Triphosphate (dATP, dTTP, dCTP und dGTP) den neuen Strang zu synthetisieren. Eine PCR läuft in Zyklen ab, die aus Denaturierung, Annealing und DNA-Synthese bestehen. Erst werden also die DNA-Stränge durch Zufuhr von Hitze voneinander getrennt, so dass beim Annealing die Primer an ihre Startpunkte binden können und dann die DNA-Synthese in 5'-3'-Richtung beginnen kann. Die Primer werden immer paarweise benutzt, um beide getrennte DNA-Stränge kopieren zu können (s.a. Abb. 7).

Die DNA-Polymerase wird aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) gewonnen, dessen natürlicher Lebensraum heiße Quellen sind und das so eine Hitzeresistenz von ca. 94 °C entwickelt hat. Es bleibt also aktiv, auch wenn die DNA für den nächsten Zyklus denaturiert wird.

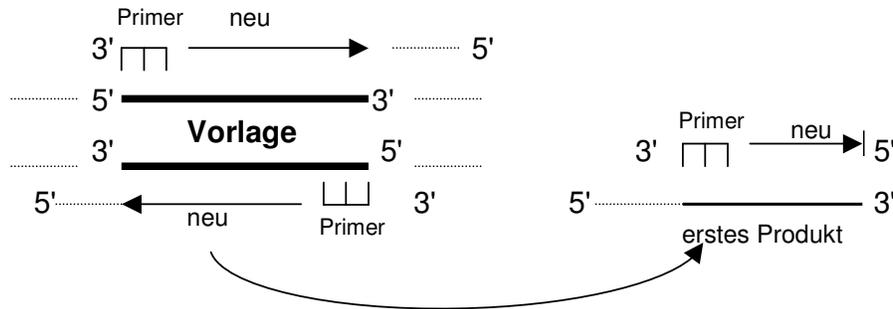


Abbildung 7:

Von der Vorlage beginnt die DNA-Neusynthese in 5'-3'-Richtung nach Annealing der Primer an ihre Startpunkte. Das erste Produkt dient nun selber als Vorlage.

Das Reaktionsergebnis besteht hauptsächlich aus den gewünschten Sequenzen in Originallänge. Die exakte Länge des Produktes kommt zustande, indem die Produkte selber als Vorlage dienen. Das erste Produkt hat hierbei noch eine variable Länge, da nur dessen Anfangspunkt durch den Primer determiniert wird. Im zweiten Zyklus dient dieses Produkt nun selber als Vorlage, so dass der Primer der Gegenrichtung eine Kopie von automatisch der richtigen Länge entstehen lässt (s. Abb. 7). Nach mehreren Zyklen überwiegen dann diese Kopien deutlich gegenüber den ersten Produkten, da sie sich, im Gegensatz zu den Kopien der Original-DNA, exponentiell vermehren (Mullis, 1987).

Für den PCR-Ansatz wurde aus Primern, dNTP, $MgCl_2$, Puffer und H_2O der sogenannte Mastermix hergestellt (jeweilige Volumina mit Anzahl der Proben + 1 multipliziert) (s. Tab. 3). Dieser wurde auf die verschiedenen Tubes verteilt, bevor die DNA und, als letzter Schritt, die Taq-Polymerase zugegeben wurde. Mit einem Tropfen Paraffin-Öl zum Schutz vor Verdunstung wurden die Proben dann in den Thermocycler I (s. S. 33) gestellt und dessen Programm wurde gestartet (s. Tab. 4).

Eine mögliche Fehlerquelle bei der Durchführung der PCR ist die Kontamination der Proben mit fremder DNA. Dieses Risiko muss durch die strenge Einhaltung der Hygiene bei der Durchführung und ständige Mitführung von Negativproben ohne DNA als Kontrolle so gering wie möglich gehalten werden.

Tabelle 3: PCR-Ansatz

<u>PCR-Reaktionsgemisch</u>	<u>Funktion</u>
1 µl DNA (100 ng/µl)	Vorlage zur Amplifikation
0,5 µl Primer F	Forward } Startpunkte der Amplifikation, Reverse } in 3'- und in 5'-Richtung
0,5 µl Primer R	
0,5 µl dNTP	Substrat für die Neubildung der DNA
1 µl Enzym (Taq-Polymerase 5 U/µl, 1/10 verdünnt)	DNA-Polymerase, hitzebeständig
0,8 µl MgCl ₂	Unterstützung der Enzymfunktion
2,5 µl PCR-Reaktionspuffer	Herstellung eines optimalen Milieus
18,2 µl H ₂ O ad 25 µl	

(geänderte Volumina bei PCR-Ansatz für GeneScan-Apparat, s. S. 36)

Tabelle 4: Thermocycler I-Programm

<u>PCR-Reaktionszyklen</u>	<u>Funktion</u>
1. 1x 94°C 4 min	Initiale Denaturierung
2. 36x {	94°C 1 min Denaturierung
	58°C/ 55°C 1 min Annealing, Temperatur abhängig von Primer
	72°C 1 min Extension, optimale Temperatur für Taq-Polymerase
3. 1x 72°C 10 min	Anordnung der Produkte als Doppelstränge

2.2.3 Chromosomale Marker

Zum Ausschluss der bereits beschriebenen Loci der arRP wurden Marker benutzt, die nach Studium der entsprechenden Literatur (s. Tab. 1) gewählt wurden. Hierbei sind die Primer aus dem "Research Genetics, Human Screening Set Version 6" gewählt worden, deren Positionen, gemäß Soton-Markerkarte (<http://cedar.genetics.soton.ac.uk/ldb.html>), +/- 5 cM von den angegebenen entfernt waren (s. Tab. 5).

Tabelle 5: Benutzte chromosomale Marker zum Ausschluss der bereits beschriebenen Loci der arRP

Kandidatengen	Marker	Chromosomale Lokalisation	Heterozygotie	Fragmentlänge in bp	Annealingtemperatur in °C
ABCR, RP19	<i>D1S551</i>	1p22.1	0,67	166-186	58
	<i>D1S1588</i>	1p21.3	0,68	118-136	58
	<i>D1S1631</i>	1p21.2	0,77	129-156	55
RPE65, RP20	<i>D1S1665</i>	1p22.3	0.81	219-239	55
	<i>D1S1728</i>	1p22.1	0.55	158-174	55
RP26	<i>D2S1391</i>	2q32.1	0,79	109-133	55
PDE6A	<i>D5S210</i>	5p11	0,78	212-232	55
TULP1, RP14	<i>D6S273</i>	6p21.31	0.77	130-140	55
	<i>D6S291</i>	6p21.31	0.73	198-210	55
	<i>D6S1017</i>	6p21.1	0,68	151-171	58
RP25	<i>D6S1031</i>	6q12	0,76	251-266	55
	<i>D6S1270</i>	6q13	0,62	113-137	55
RLBP1, CRALBP	<i>D15S175</i>	15q25.3	0,78	ca. 175	55
	<i>D15S116</i>	15q26.1	0,84	164-184	55
	<i>D15S152</i>	15q25.3	0,84	200-234	55
	<i>D15S1046</i>	15q26.1	0,77	134-148	55
RP22	<i>D16S403</i>	16p12.1	0,85	134-152	55
	<i>D16S524</i>	16p12.2	k. A.	143-169	60

2.2.4 Produktprüfung auf Agarosegel

Nach Abschluss einer PCR muss deren Produkt getestet werden. Dies geschieht durch das Auftragen der Proben auf ein Agarosegel mit anschließender Elektrophorese. Der Test dient einerseits der Versicherung, dass überhaupt eine Reaktion stattgefunden hat und andererseits der Kontrolle, dass keine Kontamination mit fremder DNA aufgetreten ist. Auch eine Aussage über die Konzentration des Produktes ist annäherungsweise möglich, so dass man in die folgende PAA-Gel-Elektrophorese ein angemessenes Volumen der Amplifikatlösung einbringen kann.

Das 2%ige Agarosegel wurde aus 4 g Agarosepulver und 200ml 1x TBE hergestellt. Diese Mischung wurde im Mikrowellenherd unter wiederholtem Umrühren ca. 2 min erhitzt, bis die Lösung, und damit später auch das Gel, klar und frei von Schlieren war.

Die Lösung wurde auf dem Magnetrührer gelassen, bis sie auf 65-70°C abgekühlt war; anschließend wurden 4 µl Ethidiumbromid zugesetzt. Das Ethidiumbromid lagert sich später in die DNA des PCR-Produkts ein und macht diese unter UV-

Licht sichtbar. Seine Affinität zur DNA-Doppelhelix macht Ethidiumbromid zu einem hochtoxischen Stoff, weshalb es immer gekühlt gelagert wird und nicht in die erhitzte Agaroselösung gegeben werden darf, da es sonst zu einer Verdunstung mit anschließender Inhalation kommen könnte.

Nun wurde die noch flüssige Lösung in den Gelträger der Elektrophoresekammer gegeben. Der Gelträger gab dem Gel seine später gewünschte Form mit Kämmen, die, beim Herausziehen, Slots entstehen ließen und Klebeband gegen Auslaufen, bevor das Gel fest war. Nach ca. 30 min konnte das fertige Gel in die Kammer eingesetzt und mit 1 l 0,1x TBE-Puffer umspült werden.

Für die Durchführung der Elektrophorese wurden 2,5 µl des PCR-Produktes mit 5 µl 6x Farbstoffpuffer gemischt und dann vorsichtig in die Gel-Slots pipettiert. Die Kammer wurde nun für 15-20 min bei 100-120 V an ein Gleichstromaggregat angeschlossen. Durch die Wanderung des Farbstoffpuffers wurde die ungefähre Lage des Produktes erkennbar, so dass zu gegebener Zeit die Stromzufuhr beendet und das Gel unter UV-Licht untersucht werden konnte. Hierbei stellten sich die DNA-Proben durch das Ethidiumbromid als helle rosa leuchtende Banden dar (s. Abb. 8).

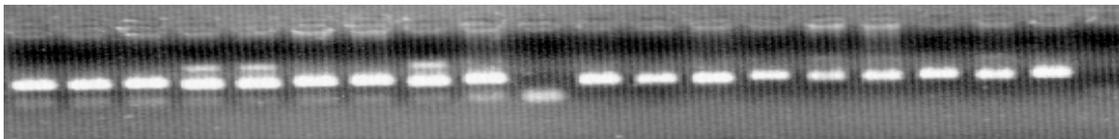


Abbildung 8:

Im Gel abwärts gewanderte Proben. In Slot Nr. 10 und 20 v.l. keine Kontamination durch DNA, deshalb kein Produkt. Hier zeigt sich die sogenannte Primerbande durch nicht verbrauchte Primer.

Eine Kontamination des PCR-Ansatzes mit fremder DNA zeigt sich durch eine Bande für die Negativprobe in Höhe des übrigen Produktes, die eigentlich durch die Abwesenheit von DNA nicht entstehen dürfte (s. Abb. 8: Gel ohne Kontamination von Slot 10 und 20 von links).

Die Bandenstärken liefern einen Hinweis darauf, welche Produktmenge in der nun folgenden Analyse mittels PAA-Gel verwendet werden sollte, um möglichst kräftige, aber dennoch scharf umrandete, Banden zu erhalten.

2.2.5 Analyse durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Um die Ergebnisse der PCR und somit auch der verwendeten Marker zu ermitteln, werden die Proben auf einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Hierbei kommt der Basenpaarlänge des Amplifikates die entscheidende Rolle zu. Die Allele der Markerloci werden durch die Elektrophorese sehr genau dargestellt, da auch schon geringe Unterschiede ihrer Länge zu einem veränderten Wanderungsverhalten im PAA-Gel führen. Eine Haplotypenbildung ist nun möglich.

Die Herstellung eines 8%igen Polyacrylamidgels wurde mit der sorgfältigen Reinigung zweier unterschiedlich großer Glasscheiben mit Alkohol begonnen. Auch ein Kamm, der später Slots (Gelaussparungen) erzeugt und zwei Spacer (Abstandhalter), die zwischen den Scheiben einen Zwischenraum erzeugen und diese gleichzeitig abdichten, wurden gereinigt. Nun wurden die Spacer auf die Außenränder der größeren Glasplatte (33 x 41,5 cm) positioniert, die kleinere Glasplatte (33 x 39 cm) wurde darübergelegt und beide wurden mit Klammern übereinander fixiert.

Das eigentliche Gel wurde angesetzt, indem folgende Chemikalien in einem Glaskolben eingebracht und miteinander verrührt wurden:

Tabelle 6: PAA-Gelansatz

78,75 ml	Aqua dest.
12,5 ml	10x TBE
33,75 ml	PAA 30% (Acrylamidstammlösung)
1 ml	APS (Ammoniumpersulfat)
24 µl	TEMED (Tetramethylethylendiamid)
ergeben 125 ml 8%iges PAA-Gel	

Für ein 12%iges Gel wird weniger H₂O und mehr PAA-Lösung verwendet. Auf Grund seiner höheren Dichte ist es eher für elektrophoretische Auftrennungen kleinerer DNA-Fragmente geeignet, die jedoch bei dieser Arbeit nicht erzeugt wurden (s. Tab. 5).

Bevor der flüssige Gelansatz polymerisiert hätte, wurde er gleichmäßig schnell und mit Vorsicht auf den überstehenden Glasrand der großen Glasplatte geschüttet, so dass er, angesogen durch die Kapillarkraft, zwischen den Scheiben zu Lie-

gen kam. Dabei musste beachtet werden, dass sich keine Lufteinschlüsse in dem noch flüssigen Gel bildeten, denn diese hätten später die elektrophoretische Wanderung des PCR-Produkts empfindlich gestört. War das Gel nun frei von Luftblasen und füllte es den gesamten Raum zwischen den Glasscheiben aus, wurde ein Kunststoffkamm auf der Einfüllseite zwischen die Scheiben geschoben und mit Klammern fixiert. Jetzt wurde die gegenüberliegende Seite der Scheiben, jene mit den gleichlangen Enden, mit Klebeband verschlossen, so dass während der Polymerisation kein Gel auslief oder es dort trocknete.

Nach ca. 2 h war das Gel fest, und es konnten Klebeband, Klammern und Kamm entfernt werden. Die nun freiliegenden Slots im Gel wurden mit Wasser gespült, um noch verbliebene Gelreste zu entfernen. Die noch aneinanderhaftenden Glasscheiben kamen nun in die Elektrophoresekammer, wo sie, senkrecht festgeklemmt, mit 0,1x TBE am oberen und unteren Ende des Gels umspült wurden. Erneut wurden die Geltaschen mit einer Pipette gespült, damit dort später alle Proben unbeeinträchtigt von Luftbläschen und Gelresten zu Liegen kommen konnten.

Je nach Bandenintensität bei der Produktprüfung wurden 1 oder 2 µl der Proben und 6 bzw. 5 µl 3x Farbstoffpuffer zusammenpipettiert und als 7 µl Gemisch vorsichtig in die Slots eingelassen, wobei immer eine Geltasche für 7 µl des Längenstandards pBR 322 (100 ng/µl) reserviert blieb.

Waren die Proben und der Längenstandard vollständig einpipettiert, wurde der Stromgeber auf 70 Watt eingestellt, und die Elektrophorese begann. Die Proben wanderten dabei von der oben angeschlossenen Kathode zur unten liegenden Anode. Ihre ungefähre Position ließ sich abschätzen, indem man die erwartete Basenpaarlänge mit dem Längenstandard verglich und die Wanderung des Farbstoffpuffers beobachtete. Letzterer ist im 8%igen Gel mit seiner schnelleren Bande ein Indikator für Fragmente mit 45 bp und mit seiner zweiten Bande ein Indikator für 160 bp Fragmentlänge.

Nach 3-4 h waren die PCR-Produkte hinreichend aufgetrennt, so dass man aus ihnen eventuell verschiedene Allellängen unterscheiden konnte. Die Stromzufuhr wurde abgeschaltet, der TBE-Puffer aus dem oberen Teil der Elektrophoresekammer gelassen und das Gel mit seinen Scheiben herausgenommen. Um das Gel nun aus den Scheiben zu befreien, wurde die kleine Scheibe entfernt und das freiliegende Gel zugeschnitten.

Das Gel wurde nun für 5 min in eine Glaswanne voll mit 10%igem Äthanol gelassen. Die Silbernitrat-Färbung hatte dadurch begonnen und folgte insgesamt einem Schema mit Zuschütten und Absaugen folgender Reagenzien:

1. 5 min Äthanol 10%
2. 3 min HNO₃ (Salpetersäure) 1%
3. 2 x mit Aqua dest. spülen
4. 20 min AgNO₃-(Silbernitrat-) Lösung → als Sondermüll entsorgen
5. 2 x mit Aqua dest. spülen
6. 2-3 min Reducer (Entwickler) bis Banden sichtbar, dann sofort Reducer austauschen, um Braunfärbung des gesamten Gels zu verhindern, ebenfalls einige Minuten einwirken lassen → als Sondermüll entsorgen
7. 2 min Essigsäure 10%
8. 1 x mal mit Aqua dest. spülen

Das Gel mit den gefärbten Banden wurde zur Konservierung in Plastikfolie eingeschweißt. Es konnte eine Interpretation der gefundenen Banden erfolgen.

Neben zwei Hauptbanden, die entstehen, wenn ein Allel zwei verschiedene Längen aufweist, gibt es noch die schwächeren Nebenbanden. Diese werden während der PCR gebildet, wenn Fehler bei der Ablesung oder der Synthese der DNA auftreten, die zu einer Auffaltung der Vorlage oder des neu synthetisierten Stranges führen. Repetitive Sequenzen sind besonders anfällig für diesen Vorgang, da sich die Basensequenzen nach der aufgefalteten Stelle immer noch komplementär zueinander anlagern und die Synthese fortgesetzt wird. Die Anzahl der Repeats des neuen Stranges hat sich also verändert und verursacht im weiteren Verlauf die Bildung von DNA-Fragmenten mit „falscher“ Länge (s. Abb. 9).

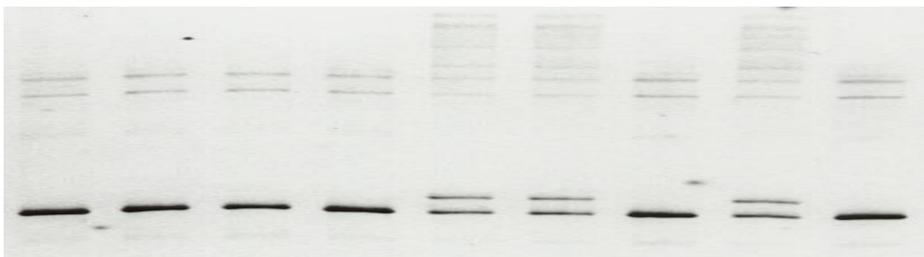


Abbildung 9:

PAA-Gelbeispiel mit Bildung von DNA-Fragmenten mit „falscher“ Länge während der PCR mit den entsprechenden Nebenbanden in der oberen Bildhälfte.

2.2.6 Analyse der DNA-Proben mit GeneScan

Nach dem Ausschluss der bekannten Kandidatengene mit Markerloci durch PCR und PAA-Gel-Elektrophorese wurden einzelne Chromosomen auf solche Markerloci hin untersucht, die mit dem unbekanntem Krankheitslocus kosegregieren und somit nur bei den betroffenen Personen Homozygotie aufweisen.

Die hohe Anzahl von Primern, und folglich auch von elektrophoretischen Auftrennungen, wurde durch die Verwendung des automatischen Sequenzierers von „ABI Prism™ 310“ bearbeitet. Sein Prinzip beinhaltet, dass man bei der PCR fluoreszierend markierte Primer benutzt, die später das Produkt für einen optischen Sensor sichtbar machen. Dazu lässt das Gerät die Proben während der Elektrophorese in einem röhrenförmigen Gel an einem Laserstrahl vorbeiwandern und bestimmt dann die Basenpaarlänge durch Vergleich mit dem mitgelaufenen Längenmarker (Sizemarker) definierter Größe. Die Quantität des entstandenen PCR-Produktes wird durch die Stärke der Fluoreszenz beim Auftreffen des Laserstrahls auf die markierten Proben errechnet (s. Abb. 10).

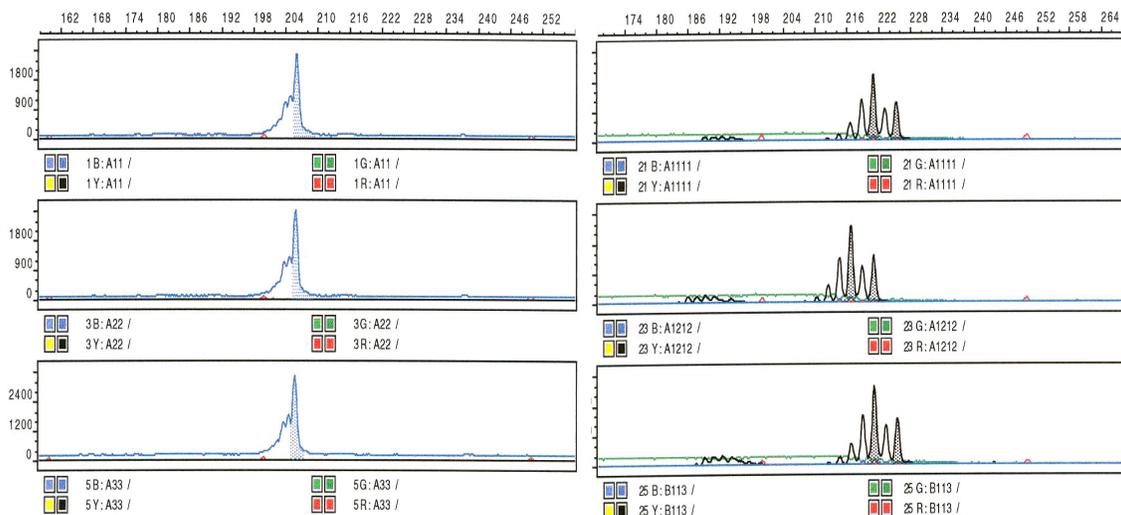


Abbildung 10:

Beispiel für Ergebnisse der GeneScan-Untersuchung mit Darstellung der Produktquantität auf der x-Achse und der Allellänge des Amplifikates auf der y-Achse. Linke Kolumne mit Homozygotie und rechte mit Heterozygotie für einen untersuchten Marker mit jeweils einem Allel bei drei verwandten Personen. Bei der PCR entstehen Nebenbanden, welche sich als kleinere Banden nach einer Großen zeigen. Sie bestehen aus DNA-Fragmenten mit „falscher“ Länge (s.S. 29).

Die benutzten Marker entstammen dem „ABI Prism™ Linklage Mapping Set Version 1 und 2“ und haben untereinander jeweils eine genetische Distanz von ca. 20 cM. Zusätzlich wurden vereinzelt Marker aus dem “Research Genetics, Human Screening Set Version 6” benutzt. In ergänzender Zusammenarbeit mit Dr. Peter Gyurus wurden die in Tabelle 8 und 9 aufgeführten Chromosomen mit den ebenfalls dort aufgeführten Markern untersucht.

Die PCR-Ansätze bestanden jeweils aus folgender Mischung pro Tube:

DNA 0,5 µl, Primer-Mix aus F und R 3 µl, PCR-Puffer 1,5 µl, MgCl (50 mM) 0,45 µl, dNTP 0,3 µl, H₂O 6 µl und Taq-Polymerase 0,06 µl (in 3 µl H₂O).

Um ein möglichst reines PCR-Produkt zu erhalten, wurden die Reagenzien nach der „Hot-Start“-Methode gemischt, d.h., dass erst nach einer initialen Denaturierung der DNA die Polymerase hinzugegeben wurde. Außerdem wurde der Thermocycler programmiert, einem sogenannten „Touchdown“-Programm zu folgen (s.S.32), bei dem die Annealing-Temperatur schrittweise auf die hier ideale Temperatur von 55°C gesenkt wurde. Sinn war es, zu Beginn der PCR so wenig wie möglich ungenaue Fragmentlängen entstehen zu lassen, so dass bei den späteren Kopien ein größerer Anteil des richtigen Produkts, auf Grund von weniger „falschen“ Vorlagen, entstehen würde.

Die Produkte dieser PCR wurden ebenfalls, wie schon in 2.2.4 beschrieben, geprüft und dann von Dr. Gyurus der automatischen Elektrophorese zugeführt. Diese empfindliche Auftrennungsmethode erfordert eine besonders vorsichtige Dosierung des PCR-Produkts. Deshalb wurden die bei der Produktprüfung gemachten Fotodrucke des Agarosegels in der Bandenintensität mit der einer bereits erfolgreich gelaufenen Auftrennung verglichen und so die DNA-Verdünnung bestimmt. Es wurde jeweils das Produkt unverdünnt oder 4 µl Produkt mit 6 bis 16 µl Aqua dest. pro GeneScan-Tube als Verdünnung benutzt.

Programm HST-TD-55 für Thermocycler II (s. S. 33):

Schritt	Temperatur in °C	Dauer
1.	94	3 min
2.	94	20 sec
3.	59	30 sec
4.	72	1 min
5.	zurück zu Schritt 2; 3x	
6.	94	30 sec
7.	57	20 sec
8.	72	1 min
9.	zurück zu Schritt 6; 3x	
10.	94	20 sec
11.	55	1 min
12.	72	1 min
13.	zurück zu Schritt 10; 39x	
14.	72	10 min
15.	Programmende	

2.2.7 Berechnung der LOD-Scores

Die Berechnung der LOD-Scores für die Kopplungsanalyse wurde von PD Dr. Bertram Müller-Myhsok unter Verwendung von Computerprogrammen, spezialisiert für diese große Menge an Daten, durchgeführt.

Für die Zweipunkt-LOD-Scores wurde das Programm „MLINK“ (Lathrop et al. 1984) des LINKAGE-Package Version 5.1, unter der Annahme von autosomal rezessiver Vererbung, vollständiger Penetranz und einer Genfrequenz von 0,001 der RP, verwendet.

Die Mehrpunkt-Kopplungsanalyse wurde mit Hilfe von SIMWALK 2.60 (Sobel et al. 1996) durchgeführt.

2.3 Materialien

(Chemikalien/ Lösungen/ Nukleotide/ Enzyme/ Geräte)

2.3.1 DNA-Isolierung

Tris-EDTA (TE)	10 mM Tris 1 mM EDTA
----------------	-------------------------

2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion

Aqua ad injectabilia (Aqua dest.)	Braun
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Gibco, BRL
Nucleotid-Mix	10 mM Desoxyadenosin-5-Phosphat, 10 mM Desoxythymidin-5-Phosphat, 10 mM Desoxycytidin-5-Phosphat, 10 mM Desoxyguanidin-5-Phosphat, jeweils Gibco, BRL
Paraffin-Öl	Merck
10x PCR-Reaktionspuffer	Gibco, BRL
PCR-Tubes 0,5 ml	Biozym
Primer	Research Genetics, Human Screening Set, Version 6
Primer (fluoreszierend markiert)	ABI Prism™ Linkage Mapping Set Version 1 und 2
Taq-Polymerase	Quiagen
Thermocycler I	Omnigene, Hybaid
Thermocycler II	PTC-200, MJ Research
Tischzentrifuge	Centrifuge 5417 R, Eppendorf
Vortex-Apparat	Vortex Genie 2, Scientific Industries

2.3.3 Produktprüfung

Borsäure	Merck
Bromphenolblau Na-Salz	Serva
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure), Titriplex III	Merck
Elektrophoresekammer für Agarosegele	Sigma
Ethidiumbromid (1%)	Merck
6x Farbstoffpuffer	7,5 g Ficoll Aqua dest. ad 50 ml 0,05% Bromphenolblau 0,05% Xylencyanol
Fotodokumentationsanlage	E.A.S.Y. 429 K, Herolab
Ficoll 400	Pharmacia
Gleichstromaggregat	ST 305, Gibco, BRL
Kämme für Agarosegele	Sigma
Klebeband	Gibco, BRL
Magnetrührer	RET basic, IKA Labortechnik
Messbecher 200 ml	Brandt
Messzylinder 100 ml	Brandt
Mikrowellenherd	Micromat, AEG
Seakam Agarosepulver	Biozym
10x TBE-Puffer	108 g Tris (0,89 M) 55 g Borsäure (0,89 M) 7,44 g EDTA (20 mM)
Thermometer	Assistent
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Gibco, BRL
UV-Lampe	UVT-28 M, Herolab
Waage	PB 3000, Mettler
Xylencyanol	Fluka AG

2.3.4 Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Ammoniumpersulfat (APS) 10%	Serva
Elektrophoresekammer für PAA-Gele	Model S 2, Gibco, BRL
Essigsäure 10%	100 ml Essigsäure 100% Aqua dest. ad 1000 ml
Essigsäure 100%	Merck
Ethanol 10%	100 ml Ethanol 96% Aqua dest. ad 1000 ml
Ethanol 96% (pro analysi), vergällt	Merck
Folienschweißgerät	Vacupack 2 Plus, Krups
Formaldehyd-Lösung 37%	Merck
Gelschüttler	GFL
Glaswanne	Duran
Glasplatten 33 x 39 cm und 33 x 41,5 cm	Gibco, BRL
Kämme für PAA-Gele	Gibco, BRL
Laborflasche 5 l	Duran
Längenstandard pBR 322 DNA-Mspl, Digest (100 ng/μl)	Biolabs
Meßbecher 1000 ml	Brandt
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck
Polyacrylamid (PAA) 30%	Roth
Reducer	279 mM Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃) 0,02% Formaldehyd-Lösung 37%
Salpetersäure 1%	15,4 ml Salpetersäure (HNO ₃) 65% Aqua dest. ad 1000 ml
Salpetersäure (HNO ₃) 65%	Merck
Silbernitrat (AgNO ₃)	Merck
Silbernitrat-Lösung	2,02 g Silbernitrat (AgNO ₃) Aqua dest. ad 1000 ml
Spacer	Gibco, BRL
Stromgeber	Electrophoresis Constant Power Sup- ply ECPS 3000/150, Pharmacia Fine Chemicals
Tetramethylethylendiamid (TEMED)	Sigma

2.3.5 GeneScan

Automatischer Sequenzierer	ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer, Perkin Elmer
GeneScan Längenstandard Tamra	Perkin Elmer
GeneScan Tubes	Perkin Elmer

2.3.6 Sonstiges

Latex-Handschuhe	Safeskin
Pipetten 20 µl, 200 µl,	P 20, P 200, Gilson
Pipetten 1000 µl	1000 µl Eppendorf
Pipettenspitzen P 20, P 200,	Gilson
Pipettenspitzen blau	Sarstedt
Reaktionsgefäßständer	Biozym

3 Ergebnisse

3.1 Ausschluss der Kandidatengene

Grundsätzlich sind zwei Ergebnismöglichkeiten denkbar gewesen: Kopplung zwischen dem ausgesuchten Markerlocus und dem arRP-Locus oder keine Kopplung zwischen den beiden Loci. Beide Fälle sollen im Folgenden an Hand von Beispielen erläutert werden.

1.) Im Falle einer Kopplung des arRP-Locus mit einem Markerlocus hätte man eine Homozygotie für des gleiche Allel bei den erkrankten drei Geschwistern gesehen.

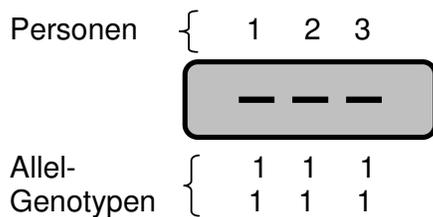


Abbildung 11:

Schematische Darstellung eines Elektrophorese-Gels mit Homozygotie der Allele eines bestimmten Markers bei den drei betroffenen Geschwistern.

Hinweisend auf eine Kopplung des Markerlocus mit dem gesuchten Krankheitslocus wäre, wenn nun die nicht betroffenen Geschwister für den gleichen Marker heterozygote Allele oder Homozygotie für das andere Allel aufweisen würden.

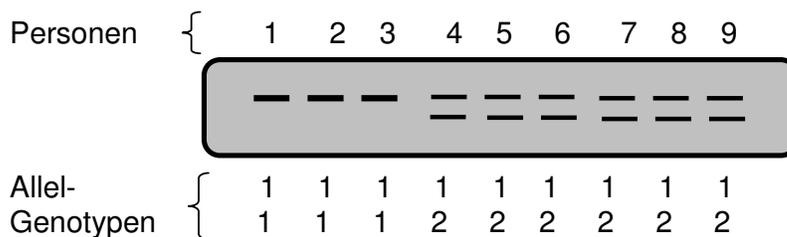


Abbildung 12:

Homozygotie des Markerallels bei den betroffenen Geschwistern (Person 1-3). Heterozygotie für den Markerlocus bei den gesunden Geschwistern (Person 4-9).

2.) Bei fehlender Kopplung von Markerlocus und arRP-Locus sind verschiedene Elektrophorese-Bilder möglich. Diese sollen durch die Abbildungen 13 und 14 erklärt werden.

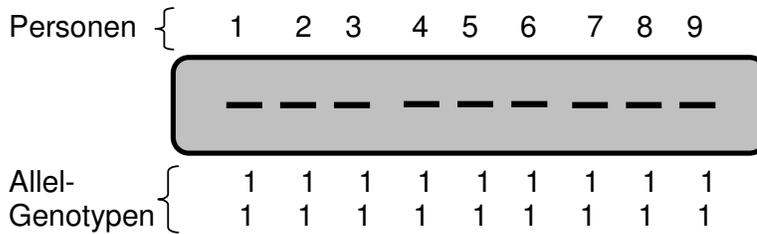


Abbildung 13:

Aus den hier gezeigten beispielhaften schematischen Darstellungen von drei verschiedenen Markern lässt sich ein Ausschluss der betreffenden arRP-Loci herleiten. Da hier ein autosomal rezessiver Krankheitslocus gesucht wurde, hätten alle betroffenen Geschwister homozygote Markerallele zeigen müssen. Im linken Gel zeigen die Allel-Banden bei allen betroffenen Geschwistern zwei verschiedene jeweils gleiche Längen. Das mittlere Beispiel zeigt drei verschiedenen Allellängen verteilt auf die drei Betroffenen. Das rechte Gel zeigt zwar homozygote Allellängen bei Person 1, nicht jedoch bei Person 2 und 3. Der Markerlocus ist also nicht mit dem Krankheitslocus gekoppelt, da bei einem gesuchten rezessiv vererbten Krankheitsgen auch alle Betroffenen homozygote Allellängen des Markerlocus aufweisen müssen.

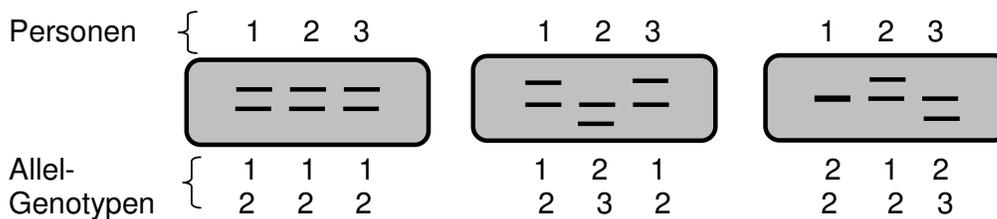


Abbildung 14:

Hier zeigt sich Homozygotie für ein Markerallel bei sowohl den erkrankten drei (Person 1-3) als auch den gesunden Geschwistern. Der benutzte Marker liefert keine Information über Kopplung, er ist nicht „informativ“.

Die Untersuchung der Familie mit arRP ergab keinen Hinweis darauf, dass hier die Mutation eines der damals ausgesuchten Gene (s. Tab. 1, S. 3) für das Auftreten dieser Krankheit verantwortlich ist. DNA-Polymorphismen in der Nähe einer der bekannten arRP-Loci würden sich im Falle einer Kopplung bei den Betroffenen (Personen 1-3) homozygot zeigen. Dieser Fall ist jedoch für die benutzten Marker nicht aufgetreten, die Genotypen der betroffenen Patienten waren heterozygot oder untereinander unterschiedlich.

Bei vereinzelt gefundener Homozygotie der drei zunächst untersuchten erkrankten Personen wurden deren gesunde Geschwister nachuntersucht. Da diese dann aber ebenfalls Homozygotie für das betreffende Allel zeigten, konnte keine Aussage getroffen werden.

RPE65

(retinal pigment epithelium-specific 65 kD protein, Gu et al. 1997 und Morimura et al. 1998)

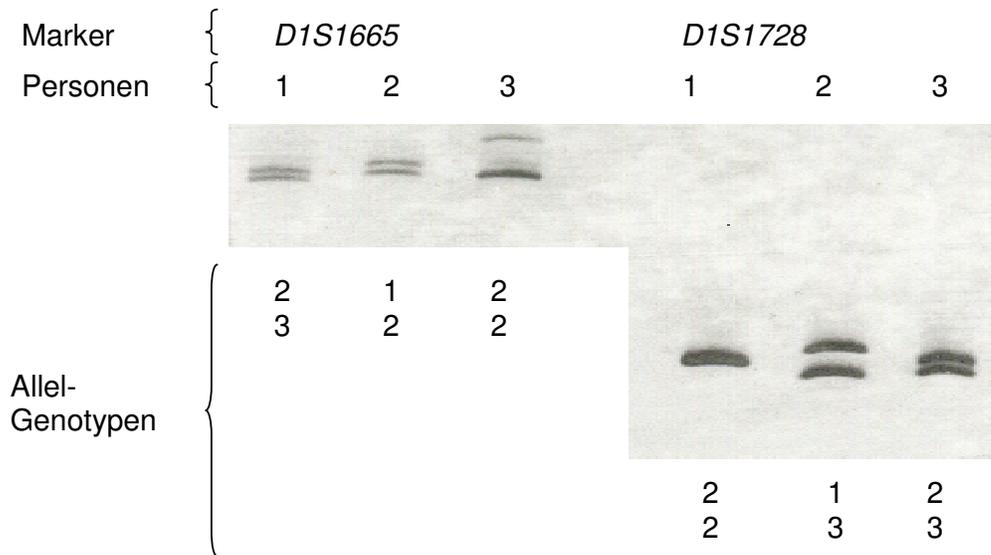


Abbildung 15:

Auf dem PAA-Gel zeigen sich beide Marker mit jeweils drei Allelen. Für Marker *D1S1655* sind die betroffenen Personen 1 und 2 und für *D1S1728* sind die Personen 2 und 3 heterozygot.

ABCR

(ATP-binding cassette transporter-retinal, Martinez-Mir et al. 1997 und Hoyng et al. 1997)

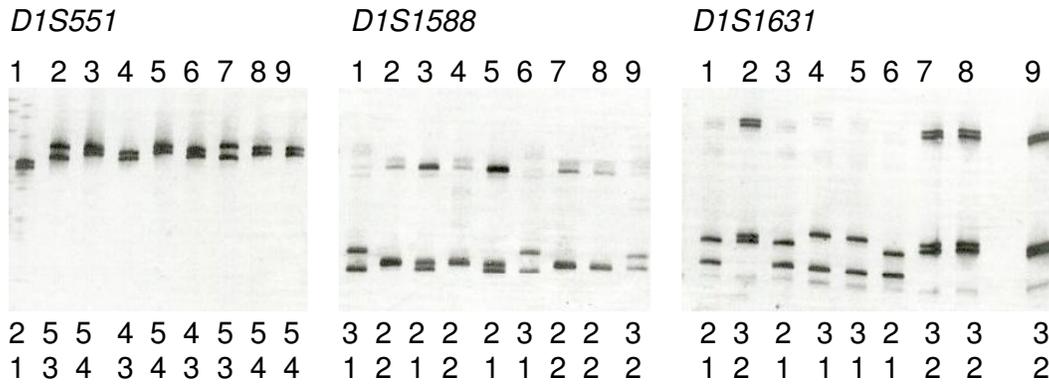


Abbildung 16:

Alle drei Marker sind bei den betroffenen Personen 1-3 heterozygot.

RP26

(?, Bayes et al. 1998)



Abbildung 17:

Alle betroffenen Personen sind für den Marker *D2S1391* heterozygot.

PDE6A

(phosphodiesterase alpha subunit, Huang et al. 1995)

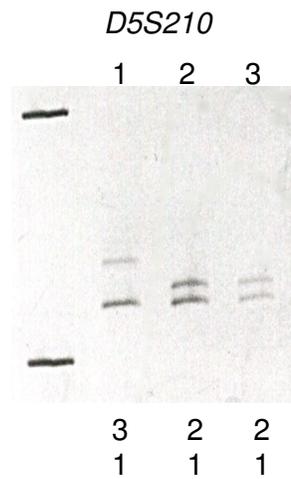


Abbildung 18:

Alle betroffenen Personen sind für den Marker *D5S210* heterozygot.

TULP1/ RP14

(tubby-like protein 1, Banerjee et al. 1998, Hagstrom et al. 1998)

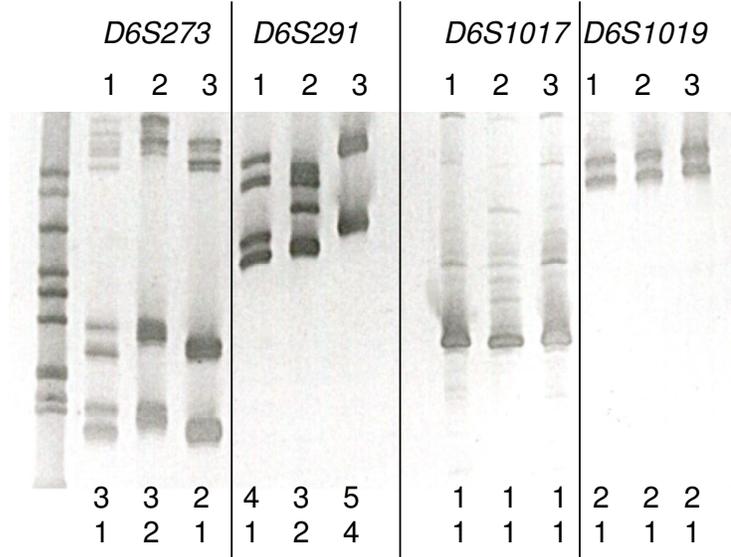


Abbildung 19:

D6S1019 zeigt einheitlich heterozygote Allele. Die Marker *D6S273* und *D6S291* sind heterozygot. *D6S1017* zeigt Homozygotie.

Nach diesem Ergebnis wurden auch die nicht betroffenen Familienmitglieder mit dem Marker *D6S1017* untersucht. Dies ergab sowohl für die Betroffenen als auch phänotypisch gesunden Familienmitglieder Homozygotie. Man ging unter Berücksichtigung der Ergebnisse der übrigen Marker, von einem Ausschluss einer Koppelung dieses Genortes mit dem arRP-Locus in dieser Familie aus.

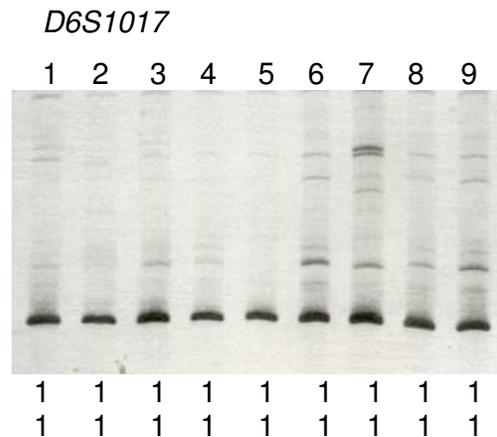


Abbildung 20:

Die Untersuchung des der Markes *D6S1017* zeigt für alle neun Geschwister Homozygotie.

RP25

(region of GABA-receptor, Ruiz et al. 1998)

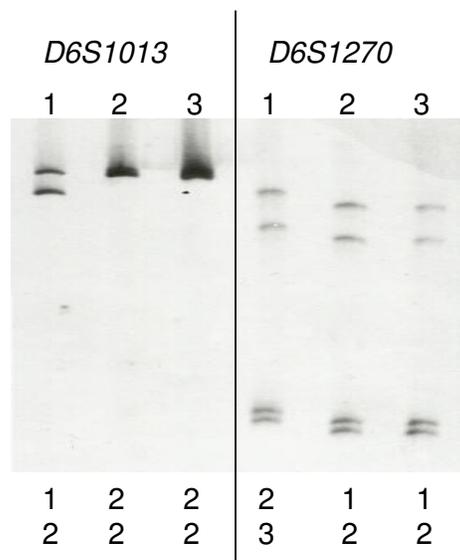


Abbildung 21:

Für den Marker *D6S1013* ist Person 1 heterozygot, während die Personen 2 und 3 homozygot sind. Bei Marker *D6S1270* sind alle Betroffenen heterozygot.

RLBP1/ CRALBP

(cellular retinaldehyde-binding protein, Maw et al. 1997)

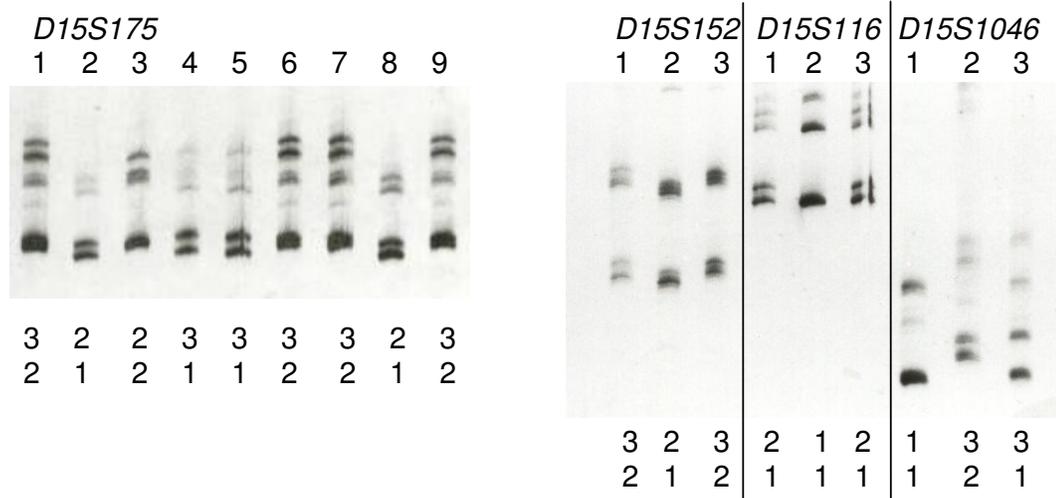


Abbildung 22:

Die betroffenen Personen 1-3 weisen untereinander unterschiedliche Genotypen auf.

RP22

(?, Finckh et al. 1998)

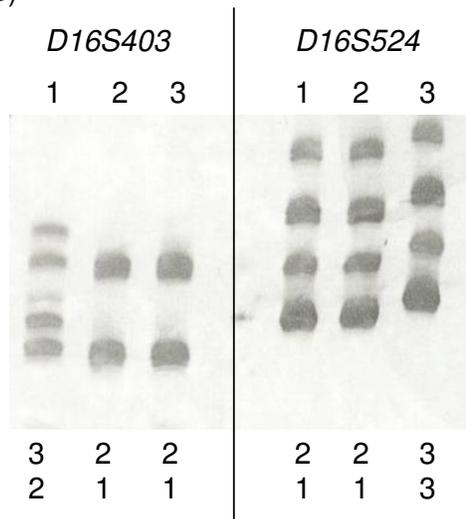


Abbildung 23:

Die betroffenen Personen 1-3 weisen untereinander unterschiedliche Genotypen auf.

3.2 Segregationsdaten nach genomweiter RP-Locussuche

Dem Ausschluss der Kandidatengene folgte eine genomweite Suche nach dem Krankheitslocus. Bei den dazu benutzten Markern ergaben sich Hinweise für eine Kopplung bei Regionen auf Chromosom 1q und 2p. Die entsprechenden Haplotypen wurden für die neun untersuchten Geschwister, und rückschließend für die Elterngeneration, mit der kleinstmöglichen Anzahl von Rekombinationen gebildet (s. Abb. 24 und 25). Die übrigen Segregationsdaten sind in Tabelle 8 und 9 aufgelistet.

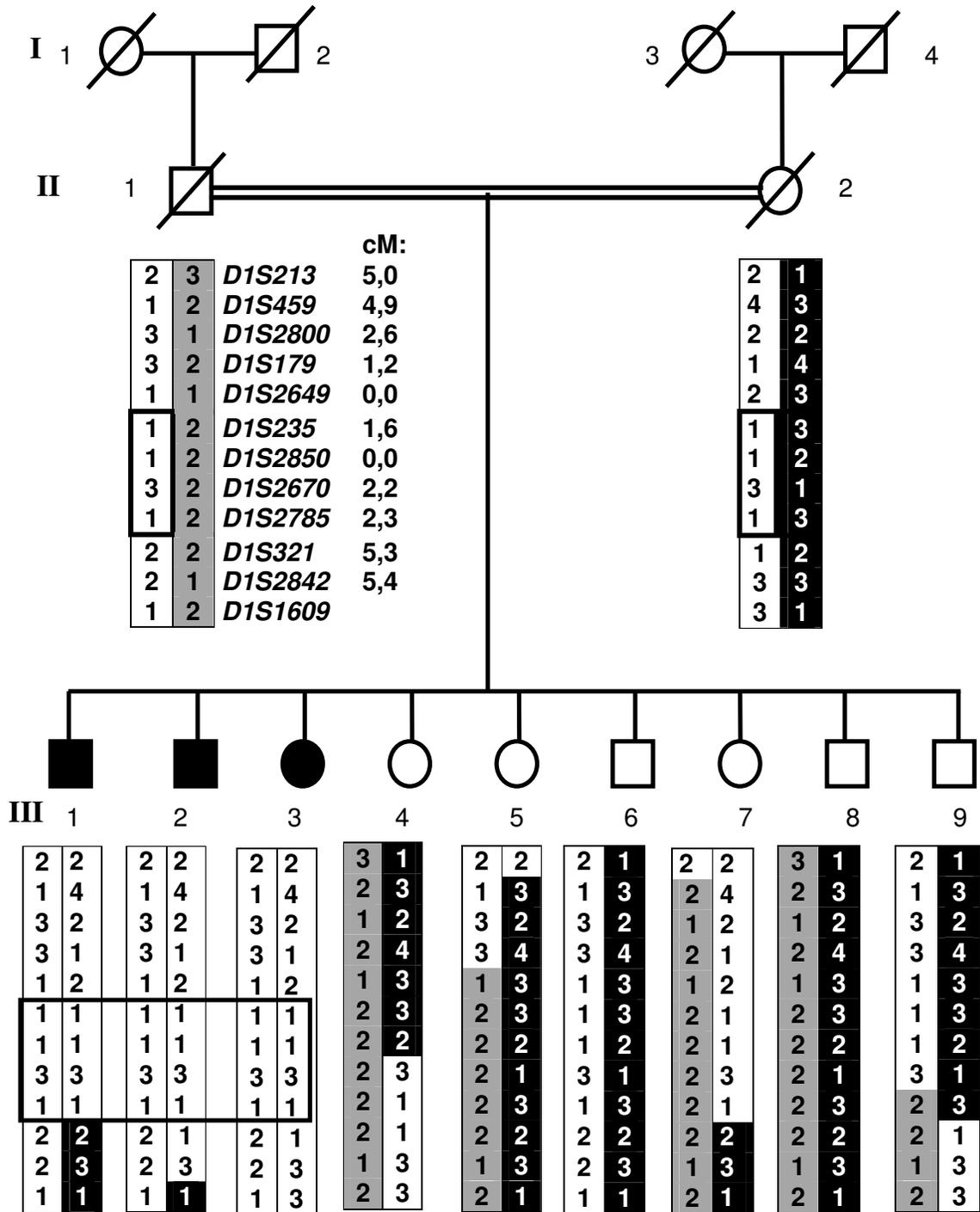


Abbildung 24:

Segregation der Marker auf Chromosom 1q. Homozygot vererbte Markerloci der betroffenen Personen sind viereckig umrandet. Neben jedem Markerlocus ist die genetische Entfernung zum nachfolgenden Markerlocus in cM angegeben.

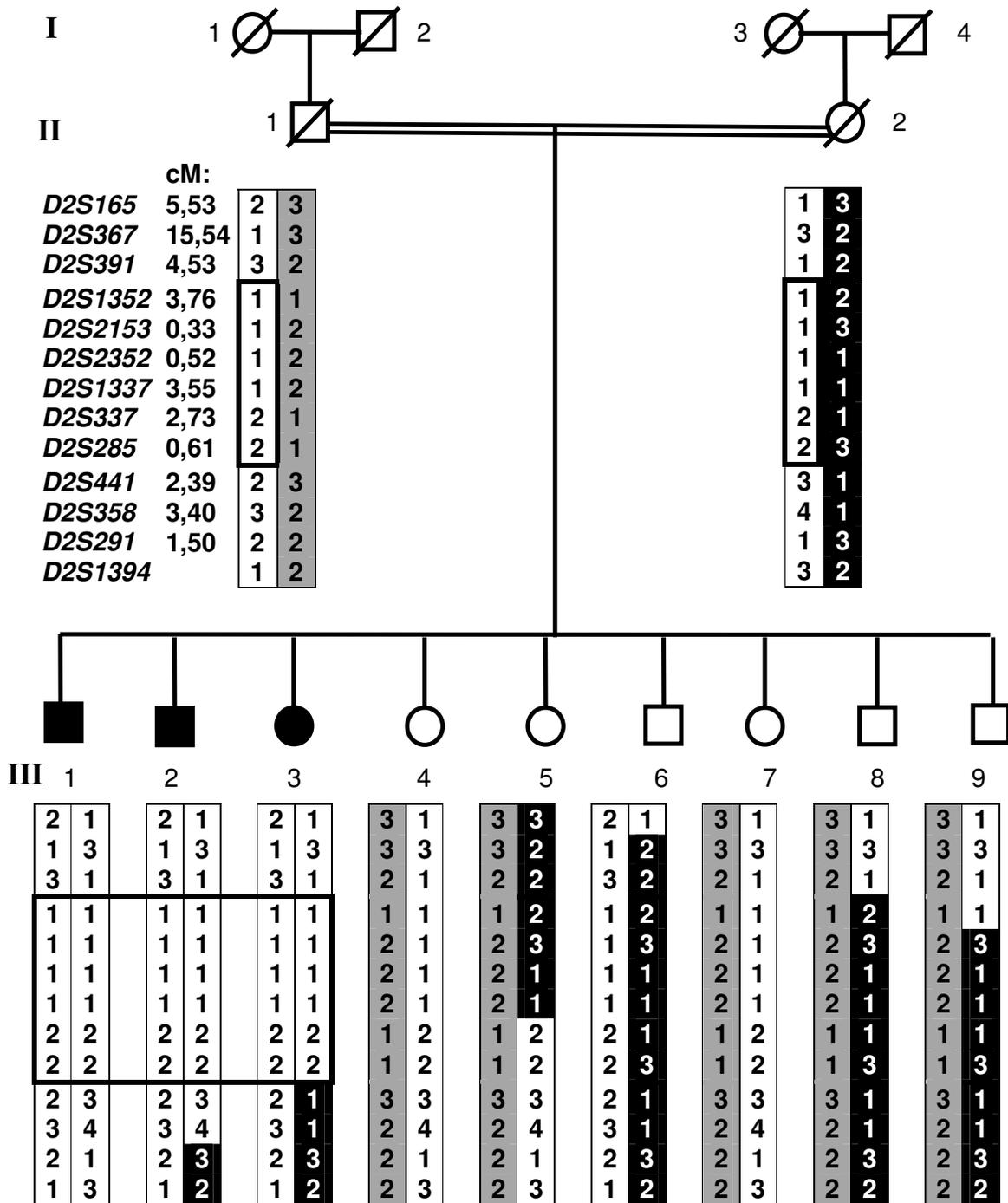


Abbildung 25:

Segregation der Marker auf Chromosom 2p. Homozygot vererbte Markerloci der betroffenen Personen sind viereckig umrandet. Neben jedem Markerlocus ist die genetische Entfernung zum nachfolgenden Markerlocus in cM angegeben.

Tabelle 8: Weitere Segregationsdaten von Chromosom 1 und 2

Chromosom 1									
Locus/ genet. Distanz	1. ■	2. ■	3. ●	4. ○	5. ○	6. □	7. ○	8. □	9. □
<u>D1S468 HEX</u> 24.9	2 3	1 3	1 3						
<u>D1S228 HEX</u> 17.6	1 2	1 3	1 2						
<u>D1S199 FAM</u> 19.8	1 2	2 3	1 2						
<u>D1S255 HEX</u> 7.5	1 2	1 3	1 2						
<u>D1S197 FAM</u> 12.0	2 2	1 2	2 2						
<u>D1S220 HEX</u> 15.8	2 3	1 3	1 3						
<u>D1S216 HEX</u> 11.6	2 3	1 3	1 2						
<u>D1S207 FAM</u> 14.3	1 2	4 3	1 3						
<u>D1S424 FAM</u> 20.6	1 2	3 1	1 1						
<u>D1S502 TET</u> 23.1	2 3	1 2	1 2						
<u>D1S484 HEX</u> 24.6	2 3	2 3	1 2						
<u>D1S218 TET</u> 19.4	1 3	2 3	2 3						
<u>D1S413FAM</u> 9.8	1 1	1 1	1 2						
<u>D1S249 FAM</u> 11.4	1 2	2 3	1 2						
<u>D1S425TET</u> 10.2	1 2	1 2	1 2						
<u>D1S549*</u>	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	2 4	4 4
(...) S. Abb. 24									
<u>D1S423*</u>	1 2	1 2	2 1	1 1	1 2	2 1	1 2	1 2	1 1

Die mit "*" gekennzeichneten Marker entstammen dem "Research Genetics, Human Screening Set Version 6", die übrigen aus dem „ABI Prism™ Linkage Mapping Set Version 1 und 2“.

weiter Tabelle 8: Weitere Segregationsdaten von Chromosom 1 und 2

Chromosom 2									
Locus/ genet. Distanz	1. ■	2. ■	3. ●	4. ○	5. ○	6. □	7. ○	8. □	9. □
<u>D2S319 HEX</u> 21.7	1 3	2 3	1 3						
<u>D2S168 HEX</u>	3 4	2 4	3 4	1 2	1 3	3 4	3 4	1 2	1 2
(...) S. Abb. 25									
<u>D2S286 FAM</u> 8.8	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2
<u>D2S139TET</u> 8.7	1 1	1 1	1 1	1 2	1 2	1 1	1 2	1 1	1 1
<u>D2S113 FAM</u> 23.2	1 2	1 2	1 2	3 4	2 4	1 2	1 3	1 3	1 3
<u>D2S347 FAM</u> 20.2	2 3	1 3	2 3						
<u>D2S151 HEX</u> 27.9	1 2	2 3	1 2						
<u>D2S326 HEX</u> 17.9	1 3	2 3	1 4						
<u>D2S117 HEX</u> 10.2	3 4	1 2	2 4						
<u>D2S325TET</u> 17.5	1 1	1 2	1 1						
<u>D2S126 HEX</u> 19.6	1 3	1 2	1 3						
<u>D2S206 HEX</u> 17.7	2 3	1 3	1 2						
<u>D2S125 HEX</u>	2 2	2 2	1 3						
<u>D2S2114*</u> 6	2 2	2 1	2 1	1 2	1 2	2 1	1 2	1 1	1 1
<u>D2S438*</u> 0	2 2	2 2	2 2	2 1	2 1	2 2	2 1	2 2	2 2
<u>D2S1777*</u>	2 1	2 1	2 1	1 2	2 2	2 1	1 2	1 1	1 1

Die mit "*" gekennzeichneten Marker entstammen dem "Research Genetics, Human Screening Set Version 6", die übrigen aus dem „ABI Prism™ Linkage Mapping Set Version 1 und 2“.

Tabelle 9: Segregationsdaten von Chromosom 3-22

Chromosom 3									
Locus/ genet. Distanz	1. ■	2. ■	3. ●	4. ○	5. ○	6. □	7. ○	8. □	9. □
<u>D3S1297HEX</u> 13.3	2 3	1 3	1 3						
<u>D3S1304HEX</u> 21.8	3 3	1 2	3 2						
<u>D3S2338HEX</u> 12.00	1 3	2 2	2 3						
<u>D3S1266HEX</u> 10.0	1 3	2 4	2 3						
<u>D3S1277NED</u> 21.4	1 3	1 2	2 3						
<u>D3S1300FAM</u> 11.8	2 3	3 3	2 1						
<u>D3S1285NED</u> 18.1	1 2	1 2	2 2						
<u>D3S3681HEX</u> 20.0	2 3	2 1	3 3						
<u>D3S1278HEX</u> 17.2	1 4	1 3	2 4						
<u>D3S1292NED</u> 12.3	1 2	2 2	1 2						
<u>D3S1569FAM</u> 9.6	2 3	1 3	1 2						
<u>D3S1279FAM</u> 22.2	2 2	2 2	1 2	2 2	2 2	2 2	2 2	1 2	2 2
<u>D3S1565FAM</u> 22.5	1 2	2 2	1 2						
<u>D3S1580FAM</u> 17.0	2 3	2 1	4 3						
<u>D3S1311FAM</u>	1 1	1 1	1 2						

weiter Tabelle 9: Segregationsdaten von Chromosom 3-22

Chromosom 4	1. ■		2. ■		3. ●		4. ○		5. ○		6. □		7. ○		8. □		9. □	
Locus/ genet. Distanz	1	2	3	4	3	4	4	○	5	○	6	□	7	○	8	□	9	□
<u>D4S412HEX</u> 9.0	1	2	3	4	3	4												
<u>D4S2935HEX</u> 13.0	1	1	1	2	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	2	2	2	2
<u>D4S403FAM</u> 9.3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2
<u>D4S419 NED</u> 12.0	1	1	1	2	1	2												
<u>D4S391HEX</u> 14.0	1	2	1	2	1	2												
<u>D4S405HEX</u> 14.0	2	2	1	2	2	2												
<u>D4S1592HEX</u> 10.0	1	2	4	3	1	3												
<u>D4S392FAM</u> 10.0	1	3	1	2	1	3												
<u>D4S2964HEX</u> 18.3	1	3	1	2	1	3												
<u>D4S1572FAM</u> 17.1	1	2	1	2	1	2												
<u>D4S402FAM</u> 20.7	1	1	1	2	1	1												
<u>D4S424HEX</u> 10.8	1	2	1	2	1	1												
<u>D4S413FAM</u> 23.1	1	2	1	3	1	3												
<u>D4S1539FAM</u> 16.4	1	2	2	3	2	3												
<u>D4S1535NED</u> 14.2	2	2	1	2	1	2												
<u>D4S426NED</u>	1	3	1	2	1	2												

weiter Tabelle 9: Segregationsdaten von Chromosom 3-22

Chromosom 5									
Locus/ genet. Distanz	1. ■	2. ■	3. ●	4. ○	5. ○	6. □	7. ○	8. □	9. □
<u>D5S406NED</u> 7.6	1 3	1 3	1 2						
<u>D5S630HEX</u> 21.7	1 3	1 4	2 4						
<u>D5S419HEX</u> 26.0	2 4	2 1	3 1						
<u>D5S407FAM</u> 16.4	2 3	2 3	1 2						
<u>D5S424HEX</u> 23.4	1 2	1 1	3 1						
<u>D5S428HEX</u> 16.8	1 2	3 2	3 2						
<u>D5S2027FAM</u> 22.0	1 2	1 2	1 2						
<u>D5S2115HEX</u> 17.7	1 2	1 3	1 3						
<u>D5S410FAM</u> 21.1	2 3	1 3	2 3						
<u>D5S400NED</u> 19.0	2 3	1 3	1 2						
<u>D5S408FAM</u>	1 3	1 3	1 2						

weiter Tabelle 9: Segregationsdaten von Chromosom 3-22

Chromosom 6

Locus/ genet. Distanz	1. ■	2. ■	3. ●	4. ○	5. ○	6. □	7. ○	8. □	9. □
<u>D6S1574FAM</u> 10.0	1 2	2 2	1 2						
<u>D6S470 NED</u> 12.5	1 2	3 2	1 2						
<u>D6S289FAM</u> 6.2	1 1	1 1	2 2	1 1	2 2	2 2	1 2	1 1	1 1
<u>D6S422FAM</u> 7.9	1 2	1 2	2 3						
<u>D6S276FAM</u> 7.0	2 3	3 3	2 1						
<u>D6S1610FAM</u> 23.8	1 2	2 2	1 3						
<u>D6S257NED</u> 11.0	1 3	3 3	3 2						
<u>D6S460FAM</u> 19.3	1 2	2 3	2 3						
<u>D6S434HEX</u> 11.7	1 2	2 3	1 2						
<u>D6S287HEX</u> 14.9	2 2	1 1	2 2						
<u>D6S292HEX</u> 17.7	1 2	2 3	1 2						
<u>D6S441NED</u> 12.3	2 3	1 3	2 3						
<u>D6S1581FAM</u> 20.0	1 2	1 1	1 2						
<u>D6S446NED</u> 13.0	2 2	1 2	2 3						
<u>D6S281HEX</u>	1 1	1 2	1 1						

weiter Tabelle 9: Segregationsdaten von Chromosom 3-22

Chromosom 7									
Locus/ genet. Distanz	1. ■	2. ■	3. ●	4. ○	5. ○	6. □	7. ○	8. □	9. □
<u>D7S531NED</u> 3.9	1 3	2 3	1 3						
<u>D7S517FAM</u> 8.7	1 1	1 1	1 1	1 2	1 1	1 1	1 1	1 2	1 2
<u>D7S513NED</u> 18.1	1 2	2 3	2 3						
<u>D7S493HEX</u> 21.0	1 1	1 2	1 2						
<u>D7S484FAM</u> 17.5	1 1	1 2	1 1						
<u>D7S519FAM</u> 12.0	1 3	1 2	1 3						
<u>D7S502HEX</u> 22.0	1 3	1 2	1 3						
<u>D7S630HEX</u> 16.8	1 2	1 3	1 2						
<u>D7S515FAM</u> 13.2	2 3	1 2	2 3						
<u>D7S486FAM</u> 24.9	1 2	1 2	2 2						
<u>D7S684HEX</u> 23.0	1 2	1 1	1 2						
<u>D7S798HEX</u>	1 2	1 2	2 2						

weiter Tabelle 9: Segregationsdaten von Chromosom 3-22

Chromosom 8

<u>Locus/ genet. Distanz</u>	<u>1. ■</u>	<u>2. ■</u>	<u>3. ●</u>	<u>4. ○</u>	<u>5. ○</u>	<u>6. □</u>	<u>7. ○</u>	<u>8. □</u>	<u>9. □</u>
<u>D8S277HEX</u> 8.0	1 3	1 3	2 3						
<u>D8S550NED</u> 11.0	1 2	1 2	1 3	1 2	1 3	1 3	1 2	1 2	1 3
<u>D8S549HEX</u> 10.0	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1
<u>D8S258HEX</u> 10.0	2 3	2 3	2 1	2 3	2 1	2 1	4 3	2 3	4 1
<u>D8S1771NED</u> 10.0	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2
<u>D8S505HEX</u> 10.5	2 2	2 2	2 2	1 2	2 2	2 2	1 2	2 2	1 2
<u>D8S285NED</u> 8.3	1 3	1 3	1 3	1 4	1 3	2 3	1 4	1 3	2 4
<u>D8S260FAM</u> 24.1	2 3	2 3	2 3	1 3	2 3	2 1	1 3	2 3	1 1
<u>D8S270NED</u> 11.0	1 2	1 2	1 2	1 2	1 3	1 3	1 3	1 2	1 3
<u>D8S1784FAM</u> 13.0	1 2	1 2	2 3						
<u>D8S514NED</u> 12.5	1 2	1 2	1 2	1 1	1 2	1 2	1 2	1 1	1 1
<u>D8S284HEX</u>	1 1	1 1	1 2						

weiter Tabelle 9: Segregationsdaten von Chromosom 3-22

Chromosom 9

Locus/ genet. Distanz	1. ■	2. ■	3. ●	4. ○	5. ○	6. □	7. ○	8. □	9. □
<u>D9S286FAM</u> 24.1	1 3	2 3	2 4						
<u>D9S171NED</u> 7.1	1 2	1 2	1 2						
<u>D9S161FAM</u> 7.0	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1
<u>D9S1817FAM</u> 11.7	2 3	2 3	1 3						
<u>D9S175FAM</u> 13.9	1 2	1 2	2 3						
<u>D9S167NED</u> 21.1	1 3	1 3	1 2						
<u>D9S287HEX</u> 23.6	1 2	1 2	2 2						
<u>D9S1776HEX</u> 24.1	2 3	2 3	1 3						
<u>D9S164FAM</u>	2 3	1 3	1 3						

Chromosom 10

Locus/ genet. Distanz	1. ■	2. ■	3. ●	4. ○	5. ○	6. □	7. ○	8. □	9. □
<u>D10S591HEX</u> 17.1	1 1	1 2	1 2						
<u>D10S547HEX</u> 11.7	3 2	1 2	3 2						
<u>D10S1653HEX</u> 12.2	1 2	3 2	1 2						
<u>D10S197FAM</u> 19.0	2 3	1 3	2 3						
<u>D10S196HEX</u> 22.0	1 3	1 3	1 2						
<u>D10S537NED</u> 13.0	1 2	2 2	1 2						
<u>D10S1686HEX</u> 18.4	1 2	1 3	1 2						
<u>D10S192NED</u> 12.4	1 2	2 3	1 2						
<u>D10S1693HEX</u> 19.5	2 3	1 2	2 3						
<u>D10S217FAM</u>	2 4	3 1	2 1						

weiter Tabelle 9: Segregationsdaten von Chromosom 3-22

Chromosom 11

Locus/ genet. Distanz	1. ■	2. ■	3. ●	4. ○	5. ○	6. □	7. ○	8. □	9. □
<u>D11S902HEX</u> 24.8	1 2	1 2	1 2						
<u>D11S935FAM</u> 15.0	2 2	2 3	1 2						
<u>D11S4191HEX</u> 13.7	1 3	2 3	1 2						
<u>D11S1314HEX</u> 25.1	2 3	2 3	1 3						
<u>D11S898FAM</u> 20.5	3 2	3 4	1 4						
<u>D11S925NED</u> 9.4	3 4	2 1	3 1						
<u>D11S4151FAM</u>	1 2	1 2	1 2						

Chromosom 12

Locus/ genet. Distanz	1. ■	2. ■	3. ●	4. ○	5. ○	6. □	7. ○	8. □	9. □
<u>D12S352HEX</u> 13.8	1 2	1 2	1 2						
<u>D12S99NED</u> 18.1	1 2	1 2	1 3						
<u>D12S364FAM</u> 15.4	1 3	2 3	2 3						
<u>D12S1617NED</u> 18.3	1 1	1 2	1 2						
<u>D12S85FAM</u> 26.1	1 3	1 2	1 3						
<u>D12S326HEX</u> 26.8	1 1	1 2	1 1						
<u>D12S78FAM</u> 21.8	2 2	1 2	1 2						
<u>D12S86HEX</u> 22.5	1 2	1 2	1 2						
<u>D12S1659FAM</u>	1 1	1 1	1 2						

weiter Tabelle 9: Segregationsdaten von Chromosom 3-22

Chromosom 13

Locus/ genet. Distanz	1. ■	2. ■	3. ●	4. ○	5. ○	6. □	7. ○	8. □	9. □
<u>D13S217FAM</u> 17.3	1 2	1 1	3 2						
<u>D13S218FAM</u> 24.8	1 2	2 2	1 1						
<u>D13S156HEX</u> 24.8	1 3	1 2	1 2						
<u>D13S159FAM</u> 14.4	1 3	2 3	1 2						
<u>D13S173FAM</u> 6.0	2 3	1 3	2 3						
<u>D13S1265FAM</u> 12.0	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1
<u>D13S285HEX</u>	1 2	3 2	1 2						

Chromosom 14

Locus/ genet. Distanz	1. ■	2. ■	3. ●	4. ○	5. ○	6. □	7. ○	8. □	9. □
<u>D14S283HEX</u> 26.1	2 3	1 3	1 3						
<u>D14S70HEX</u> 14.8	1 3	1 3	2 3						
<u>D14S276TET</u> 14.3	2 3	2 3	1 2						
<u>D14S63HEX</u> 17.9	2 4	2 4	3 1						
<u>D14S74HEX</u> 16.7	1 2	1 2	2 2						
<u>D14S280FAM</u> 22.8	2 2	2 3	1 3						
<u>D14S78HEX</u>	1 1	1 2	1 2						

weiter Tabelle 9: Segregationsdaten von Chromosom 3-22

Chromosom 15

Locus/ genet. Distanz	1. ■	2. ■	3. ●	4. ○	5. ○	6. □	7. ○	8. □	9. □
<u>D15S1002HEX</u> 23.0	2 2	1 2	1 1						
<u>D15S1012HEX</u> 14.0	2 3	1 1	1 1						
<u>D15S978HEX</u> 23.2	1 2	4 3	1 3						
<u>D15S131HEX</u> 9.4	2 2	1 3	2 3						
<u>D15S205FAM</u> 7.9	1 2	3 2	3 2						
<u>D15S127NED</u> 12.7	1 2	3 4	3 4						
<u>D15S130FAM</u>	2 3	1 2	2 2						

Chromosom 16

Locus/ genet. Distanz	1. ■	2. ■	3. ●	4. ○	5. ○	6. □	7. ○	8. □	9. □
<u>D16S404HEX</u> 25.0	2 2	1 2	1 2						
<u>D16S3046FAM</u> 9.0	1 2	1 1	1 1						
<u>D16S3068FAM</u> 19.0	2 3	1 4	1 4						
<u>D16S415FAM</u> 8.0	2 4	3 4	2 1						
<u>D16S503HEX</u> 11.2	2 4	1 4	2 3						
<u>D16S515FAM</u> 10.4	1 1	1 1	1 1	1 2	1 2	1 1	1 2	1 1	1 1
<u>D16S516NED</u> 11.0	1 2	1 3	1 2						
<u>D16S3091NED</u>	1 2	2 3	2 3						

weiter Tabelle 9: Segregationsdaten von Chromosom 3-22

Chromosom 17

Locus/ genet. Distanz	1. ■	2. ■	3. ●	4. ○	5. ○	6. □	7. ○	8. □	9. □
<u>D17S938FAM</u> 7.4	1 2	1 2	1 2						
<u>D17S945FAM</u> 10.4	1 2	1 2	2 2						
<u>D17S799HEX</u> 17.6	1 2	1 2	1 2						
<u>D17S925HEX</u> 5.9	1 2	3 2	1 2						
<u>D17S798HEX</u> 22.0	1 2	1 1	1 2						
<u>D17S787TET</u> 17.0	1 2	1 2	1 2						
<u>D17S949FAM</u> 25.5	3 4	3 1	2 4						
<u>D17S784HEX</u>	1 2	1 2	2 2						

Chromosom 18

Locus/ genet. Distanz	1. ■	2. ■	3. ●	4. ○	5. ○	6. □	7. ○	8. □	9. □
<u>D18S52HEX</u> 23.0	1 2	1 2	1 2						
<u>D18S464FAM</u> 22.1	2 2	1 2	1 2						
<u>D18S478FAM</u> 17.0	1 2	1 2	3 2						
<u>D18S474FAM</u> 25.8	1 2	3 4	1 2						
<u>D18S68TET</u> 20.2	2 3	2 3	1 3						
<u>D18S469TET</u>	1 1	1 1	1 2						

weiter Tabelle 9: Segregationsdaten von Chromosom 3-22

Chromosom 19

Locus/ genet. Distanz	1. ■	2. ■	3. ●	4. ○	5. ○	6. □	7. ○	8. □	9. □
<u>D19S216HEX</u> 25.7	1 2	1 3	2 3						
<u>D19S226TET</u> 26.0	1 2	2 3	1 3						
<u>D19S420TET</u> 27.0	3 3	2 3	3 1						
<u>D19S418HEX</u>	2 3	2 3	1 3						

Chromosom 20

Locus/ genet. Distanz	1. ■	2. ■	3. ●	4. ○	5. ○	6. □	7. ○	8. □	9. □
<u>D20S95FAM</u> 23.9	1 2	2 3	1 2						
<u>D20S118FAM</u> 24.1	1 2	3 2	1 1						
<u>D20S119FAM</u> 21.8	1 2	4 2	1 3						
<u>D20S100HEX</u>	1 1	1 2	1 2						

Chromosom 21

Locus/ genet. Distanz	1. ■	2. ■	3. ●	4. ○	5. ○	6. □	7. ○	8. □	9. □
<u>D21S1253HEX</u> 14.3	2 3	1 3	1 3						
<u>D21S1252TET</u>	3 3	1 2	1 2						

Chromosom 22

Locus/ genet. Distanz	1. ■	2. ■	3. ●	4. ○	5. ○	6. □	7. ○	8. □	9. □
<u>D22S420HEX</u> 15.3	2 2	1 2	1 2						
<u>D22S315FAM</u> 24.9	3 2	1 2	1 2						
<u>D22S423HEX</u>	1 3	1 2	1 3						

3.3 Berechnung der Zweipunkt-LOD-Scores

Die aus den Segregationsdaten der Stammbäume aus Kap. 3.2 gewonnenen Ergebnisse ergaben folgende Tabellen mit Zweipunkt-LOD-Scores der 4 bzw. 6 homozygoten Markerallele auf Chromosom 1 bzw. 2 (s. Tab. 8).

Unter der Annahme einer Verwandtschaft der Eltern als Cousin-Cousine zweiten Grades und bei einer Rekombinationsfraktion von $\theta = 0,00$ wurden die höchsten LOD-Scores erzielt. Ähnliche Ergebnisse fanden sich auch bei erst-, dritt- und viergradigen Cousin-Cousine-Verwandtschaftsverhältnissen.

Tabelle 8: Lod-Scores der Markerallele auf Chromosom 1

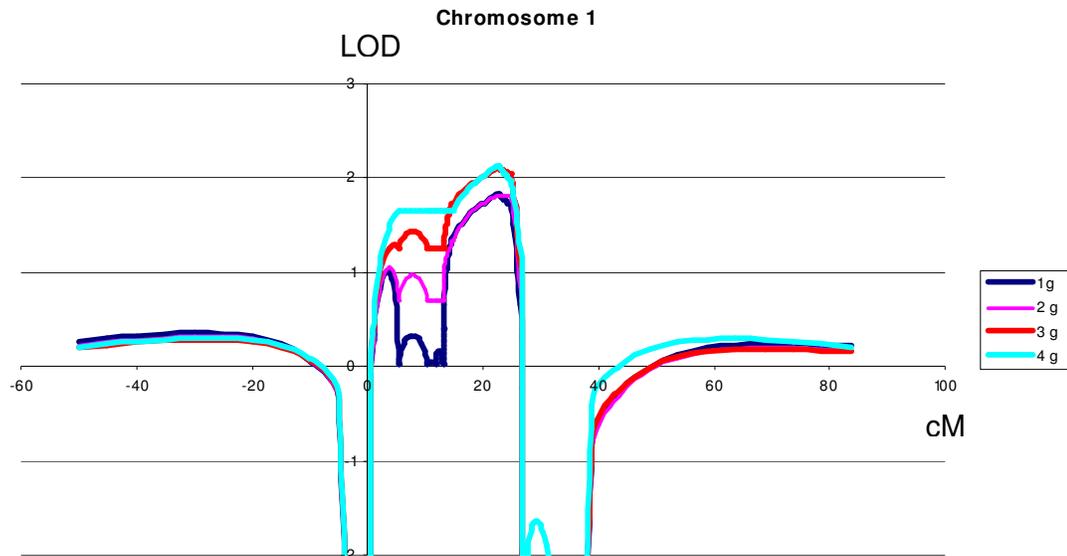
Locus	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40	θ_{\max}	Z_{\max}
<i>D1S213</i>	-infini	-1.04	0.14	0.46	0.51	0.34	0.12	0.16	0.54
<i>D1S459</i>	0.70	0.97	1.24	1.22	0.92	0.52	0.15	0.07	1.25
<i>D1S2800</i>	-0.81	-0.50	-0.09	0.08	0.15	0.10	0.03	0.15	0.18
<i>D1S179</i>	0.70	0.97	1.24	1.22	0.92	0.52	0.15	0.07	1.25
<i>D1S2649</i>	-0.21	0.09	0.45	0.56	0.50	0.31	0.10	0.12	0.56
<u><i>D1S235</i></u>	2.27	2.22	2.01	1.75	1.22	0.69	0.22	0.00	<u>2.27</u>
<u><i>D1S2850</i></u>	2.25	2.20	1.99	1.73	1.20	0.68	0.21	0.00	<u>2.25</u>
<u><i>D1S2670</i></u>	2.56	2.50	2.24	1.93	1.31	0.72	0.23	0.00	<u>2.56</u>
<u><i>D1S2785</i></u>	2.40	2.34	2.12	1.84	1.28	0.73	0.24	0.00	<u>2.40</u>
<i>D1S321</i>	-infini	-2.19	-1.07	-0.61	-0.23	-0.08	-0.02	0.50	0.00
<i>D1S2842</i>	-0.21	0.09	0.45	0.56	0.50	0.31	0.10	0.12	0.56
<i>D1S1609</i>	-infini	-1.33	-0.12	0.24	0.38	0.28	0.11	0.19	0.38

weiter Tabelle 8: Lod-Scores der Markerallele auf Chromosom 2

Locus	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40	θ_{\max}	Z_{\max}
<i>D2S165</i>	-infini	-0.74	0.21	0.49	0.50	0.30	0.08	0.15	0.54
<i>D2S367</i>	0.68	0.95	1.20	1.16	0.85	0.45	0.12	0.06	1.21
<i>D2S391</i>	0.71	0.95	1.19	1.16	0.84	0.44	0.11	0.06	1.20
<u><i>D2S1352</i></u>	0.73	0.71	0.64	0.54	0.36	0.20	0.06	0.00	<u>0.73</u>
<u><i>D2S2153</i></u>	2.54	2.48	2.24	1.95	1.35	0.77	0.26	0.00	<u>2.54</u>
<u><i>D2S2352</i></u>	1.46	1.42	1.29	1.12	0.78	0.45	0.16	0.00	<u>1.46</u>
<u><i>D2S1337</i></u>	1.31	1.29	1.17	1.02	0.71	0.41	0.14	0.00	<u>1.31</u>
<u><i>D2S337</i></u>	2.74	2.67	2.41	2.07	1.42	0.79	0.25	0.00	<u>2.74</u>
<u><i>D2S285</i></u>	2.59	2.53	2.27	1.96	1.33	0.74	0.24	0.00	<u>2.59</u>
<i>D2S441</i>	-infini	-1.05	-0.06	0.26	0.35	0.23	0.07	0.17	0.36
<i>D2S358</i>	-infini	-1.02	-0.04	0.28	0.37	0.25	0.08	0.17	0.38
<i>D2S291</i>	-infini	-2.50	-1.35	-0.83	-0.37	0.15	-0.04	0.50	0.00
<i>D2S1394</i>	-infini	-2.56	-0.86	-0.22	0.17	0.19	0.07	0.25	0.21

3.4 Berechnung der Mehrpunkt-LOD-Scores

Die anschließend durchgeführte Berechnung der Mehrpunkt-LOD-Scores blieb für die Markerloci auf Chromosom 1 unter der statistisch signifikanten Schwelle von 3. Für Chromosom 2 wurden jedoch LOD-Scores von über 3 erzielt, und zwar für alle vier angenommenen Verwandtschaftsgrade der Eltern (s. Abb. 26 und 27).

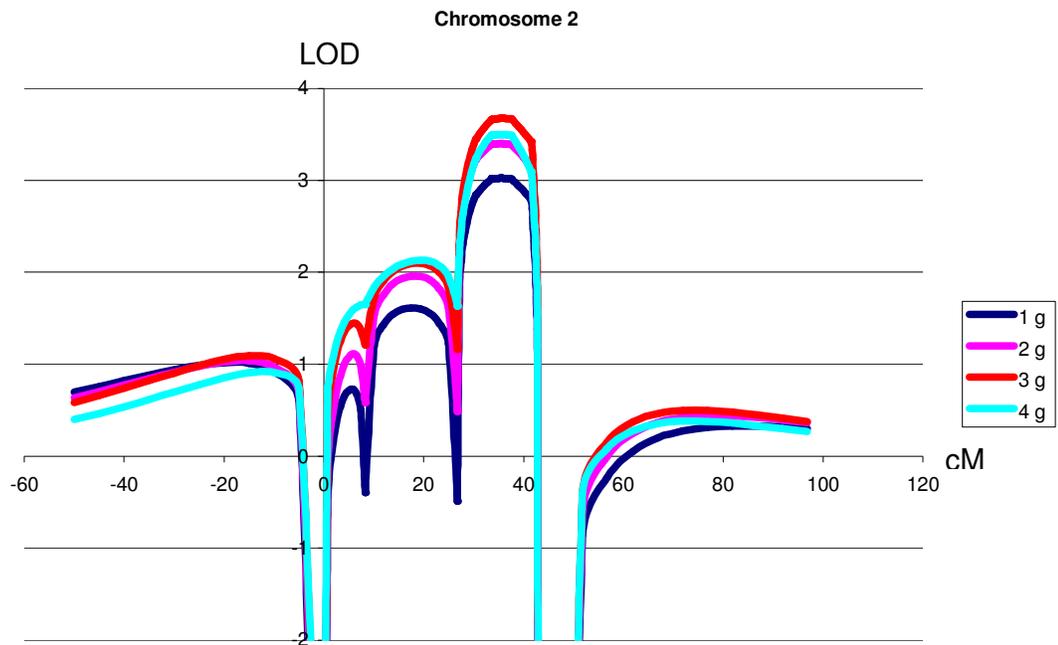


Maximal erreichte LOD-Scores:

cM	1g	2g	3g	4g
22,5613	1,832	1,812	2,11	2,136
22,5613	1,832	1,812	2,11	2,136
22,7863	1,821	1,812	2,103	2,121

Abbildung 26:

Chromosom 1, Mehrpunkt-LOD-Score-Graphen für vier verschiedene elterliche Verwandtschaftsgrade. Die LOD-Scores sind gegen die auf einer cM-Skala befindlichen Markerloci aufgetragen. Keiner der Graphen erreicht einen LOD-Score von über 3. Benutzte Marker: S. S. 61.



Maximal erreichte LOD-Scores:

<u>cM</u>	<u>1g</u>	<u>2g</u>	<u>3g</u>	<u>4g</u>
35,1642	3,022	3,397	3,672	3,496
35,3571	3,023	3,398	3,674	3,497
35,5501	3,024	3,399	3,675	3,498
35,5501	3,024	3,399	3,675	3,498
35,7441	3,023	3,398	3,675	3,497
35,9381	3,022	3,397	3,674	3,496

Abbildung 27:

Chromosom 2, Mehrpunkt-LOD-Score-Graphen für vier verschiedene elterliche Verwandtschaftsgrade. Die LOD-Scores sind gegen die auf einer cM-Skala befindlichen Markerloci aufgetragen und erreichen Werte von über 3. Benutzte Marker: S. S. 62.

4 Diskussion

4.1 Einleitung

Die Retinitis pigmentosa (RP) ist eine genetische Erkrankung der Netzhaut, die auch als Syndrom mit Defekten an anderen Organen vorkommen kann. Es sind u.a. autosomal rezessive, autosomal dominante, X-chromosomale, maternale und digenische Erbgänge bei der RP beobachtet worden.

Ihr Verlauf und ihre Pathomechanismen sind verschieden, wobei deren Gemeinsamkeit darin besteht, dass durch die Apoptose von retinalen Sinneszellen das Sehvermögen abnimmt. Diese Zelldegeneration wird bei der autosomal rezessiven Form der RP von Mutationen in 17 bereits bekannten Genen verursacht, welche u.a. die Phototransduktionskaskade der Stäbchenzellen oder den Vitamin E- und A-Metabolismus stören (s. Kap. 1.2.3).

Die klinische Diagnostik stützt sich auf die Elektroretinographie, die Perimetrie und die Funduskopie. Zusätzlich ist die Familienanamnese wichtig, da diese Hinweise auf ein erbliches Geschehen und dessen Vererbungsmodus gibt.

Als Therapieoptionen bieten sich z.Zt. nur symptomatische Behandlungen, wie z.B. Sehhilfen oder verschiedene Augenoperationen, an.

4.2 Homozygosity Mapping

Die Suche nach den genetischen Loci autosomal rezessiver Erkrankungen, welche selten vorkommen und in Familien mit blutsverwandten Eltern gefunden werden, kann z.B. mit dem sogenannten Homozygosity Mapping durchgeführt werden. Es werden Allele von Markerloci untersucht. Homozygotien von bestimmten Loci dürfen nur den von der Krankheit Betroffenen gemein sein. So liefern sie einen wichtigen Hinweis auf die Lokalisation des Gens der Erkrankung innerhalb der jeweiligen Familie.

Es ist erst in den letzten Jahren einfacher geworden, eine solche „Homozygotie-suche“ durchzuführen, weil immer mehr chromosomale Markerloci beschrieben wurden. Man erwartet, bei einem elterlichen Verwandtschaftsgrad von Cousin-Cousine ersten Grades, Homozygotie von Markerallelen in einer Region von 28 cM um den Krankheitslocus herum (Hamida et al. 1993). Dies erklärt, dass die

dichtere chromosomale Kartierung einen großen Vorteil birgt und eine zu weitmaschige Suche ein falsch negatives Ergebnis riskiert.

Das Homozygoty Mapping besteht auf der praktischen Seite aus der Durchführung einer Segregationsanalyse. Ziel ist es hierbei, Markerloci zu finden, deren Allele nur bei den erkrankten Personen homozygot vorhanden sind. Dann wird geprüft, ob der Locus dieses Markers mit dem Krankheitslocus, kosegregiert oder nicht.

Falsche Ergebnisse können durch falsche Werte der Häufigkeit des rezessiv vererbten Krankheitsallels in der Bevölkerung, der Heterozygotie des Markers und des Verwandtschaftsgrades der Eltern entstehen. Je seltener Mutationen des gesuchten Genes der Erkrankung in einer Bevölkerung sind, desto unwahrscheinlicher wird es, dass sich eine zweite Mutation durch nicht blutsverwandte Partner in die Genome der Nachkommenschaft einschleicht. Auch die Auswahl des DNA-Markers ist wichtig, da seine Informativität bestimmt, wie viele verschiedene Allele es für seinen Locus in der Bevölkerung gibt und wie oft diese jeweils vorkommen. Hieraus ergibt sich die mittlere Heterozygotie an einem Markerlocus als Wert für dessen Informativität. Eine höhere Anzahl von den Krankheitslocus umgebenden Markern erhöht die Aussagekraft einer Segregationsanalyse (Ott et al. 1995). Schließlich ist der Verwandtschaftsgrad der Eltern zu berücksichtigen. Je entfernter sie blutsverwandt sind, desto kleiner ist der Teil des Genoms, den die betroffenen Indexpersonen mit dem gemeinsamen Vorfahren gemein haben und umso signifikanter wird eine Kopplung von (homozygotem) Markerlocus und vermutetem Genlocus.

Andere Fehlerquellen, welche die Suche nach einem autosomal rezessiven Genlocus betreffen können, liegen u.a. in der Veränderung des Phänotyps durch Modifier Gene. So fand sich bei einer Familie mit Usher-Syndrom bei gleichzeitigem Vorhandensein einer homozygoten USH3-Mutation und eines mutierten MYO7A-Allels der gravierendere Phänotyp eines Typ I Usher-Syndroms, während ohne MYO7A-Mutation ein moderateres Typ III Usher-Syndrom vorlag. Die alleinige MYO7A-Mutation hat bei dieser Familie keine phänotypischen Folgen (Adato et al. 1999).

4.3 Ergebnisse in dieser Familie

In dieser Arbeit wurden neun Geschwister aus einer deutschen Familie mit blutsverwandten Eltern untersucht. Drei dieser Geschwister zeigten den Phänotyp der RP, die Elterngeneration war fremdanamnestic gesund geblieben.

Die DNA der drei betroffenen Geschwister wurde zunächst auf die damals bekannten Gene der arRP untersucht. Nach deren indirektem Ausschluss durch ausgewählte Markerloci wurde das gesamte Genom der drei Betroffenen im Rahmen des Homozygoty Mapping auf Kopplung des zu ermittelnden Genlocus und verschiedenen Markerloci hin untersucht. Hierzu wurden 200 DNA-Marker benutzt. Es ergaben sich homozygote Bereiche, die nur den betroffenen Geschwistern gemein sind, auf Chromosom 1q zwischen den Markern *D1S2649-D1S321* und 2p zwischen den Markern *D2S391-D2S441*. Für diese Marker wurden Zweipunkt-LOD-Scores unter der Annahme der elterlichen Verwandtschaft als Cousin-Cousine ersten, zweiten, dritten und vierten Grades errechnet. Die LOD-Scores mit den vier berücksichtigten Verwandtschaftsgraden waren alle positiv, wenn auch noch unter der Grenze einer statistisch abgesicherten Kopplung von 3,00. Anschließend wurde unter gleichen Voraussetzungen und mit den gleichen Markern eine Mehrpunkt-Kopplungsanalyse in den betreffenden Chromosomenarealen 1q43-q44 und 2p14-p16.1 durchgeführt. Während auf Chromosom 2 die Mehrpunkt-LOD-Scores den Wert 3 überschritten, blieben diese für Chromosom 1 unter dieser statistischen Schwelle.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen verschiedene Interpretationsmöglichkeiten zu:

Im Chromosomenabschnitt zwischen *D2S391* und *D2S441* (ca. 15 cM) könnte ein bisher unbekanntes Gen für die autosomal rezessive Retinitis pigmentosa liegen.

Mittlerweile wurde von Gu et al. (1999) die Region 2p11-p15 als eine mit dem Genort RP28 in einer indischen Familie veröffentlicht. Die durch die dort genannten Marker (*D2S1337-D2S286*) bestimmte Region überschneidet sich auf einem Intervall von 9 cM mit der von uns gefundenen, so dass es möglich ist, dass wir den Locus RP28 weiter eingrenzen konnten (s. Abb. 28 und 29). Die hohe genetische Heterogenität der arRP lässt auch alternative Theorien zu, da es durchaus vorstellbar ist, dass auf Chromosom 2 gleich zwei RP verursachende Gene zwischen 2p16.1 und p11 zu finden sein könnten.

Ebenfalls möglich ist, dass auf dem Abschnitt auf Chromosom 1 (*D12649-D1321*), neben dem auf Chromosom 2, ein weiterer Genort für die arRP liegt, welcher im Rahmen einer digenischen Vererbung PR verursacht.

Ein möglicher zweiter Genort der arRP auf Chromosom 1 könnte auch als Modifier Gen für den Phänotyp in dieser Familie fungieren.

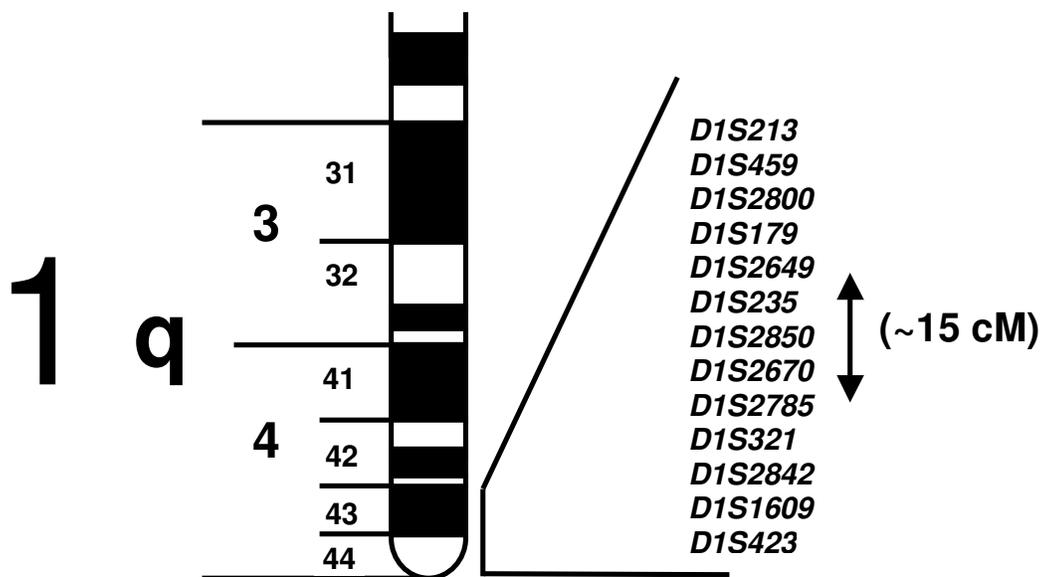


Abbildung 28:

Genetische Karte von Chromosom 1q mit Markern, für die die größten LOD-Scores ermittelt wurden. Dieses Intervall beträgt 15 cM.

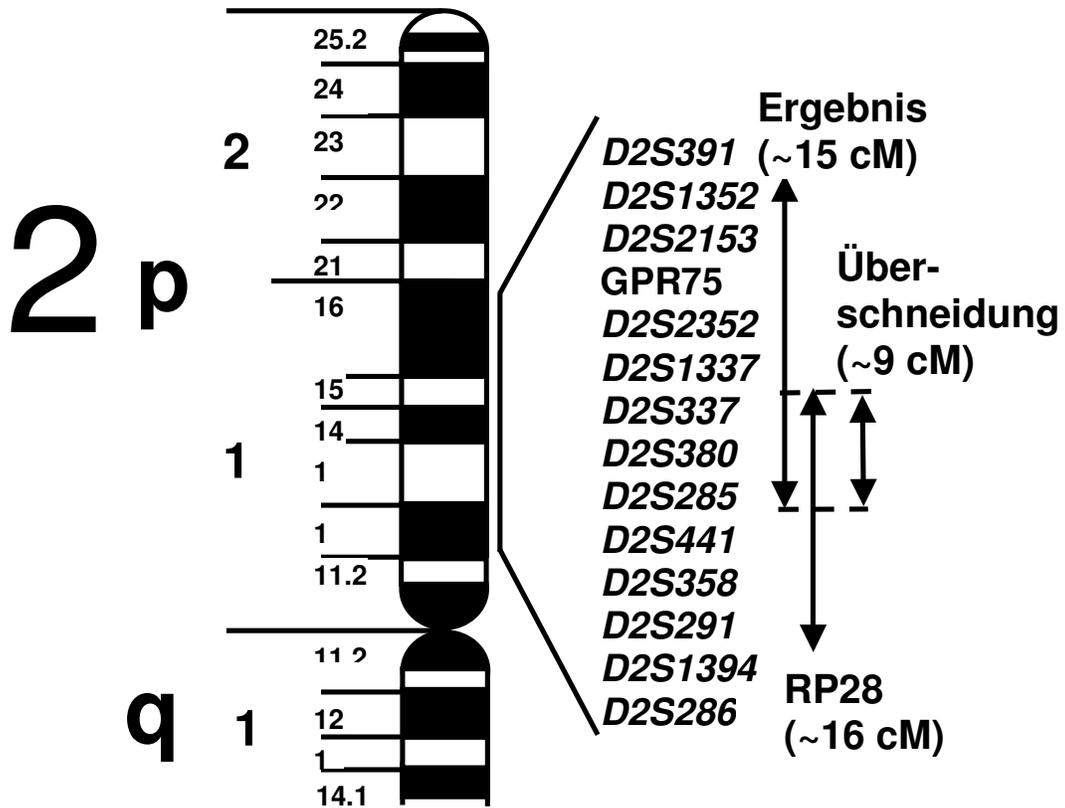


Abbildung 29:

Genetische Karte von Chromosom 2p. Die arRP-Region in unserer Familie und die von RP28 überschneiden sich auf einem Intervall von 9 cM.

4.4 Kandidatengen-Ausschluss und Suche nach weiteren Kandidatengen

Der nächste Schritt in der Untersuchung des eingegrenzten Chromosomenabschnitts lag in der Suche nach in ihm liegenden Kandidatengen.

Allgemein können Kandidatengene nach ihrer Funktion oder ihrer Lokalisation gewählt werden. Sinnvoll ist eine Kombination beider Suchkriterien, da sonst der Umfang der zu untersuchenden Gene zu groß wird. Wie im vorliegenden Fall wird zuerst ein Genlocus durch Markerloci eingegrenzt. In diesem Chromosomenareal müssen nun beschriebene Gene ermittelt werden, die durch ihre Produkte am pathophysiologischen Entstehungsprozess der Krankheit beteiligt sein könnten. Es wären noch Gene zu nennen, deren Transkription im von der Erkrankung betroffenen Organ nachgewiesen wurde. Eine unspezifischere Suche nach mutierten Genen könnte durch die Untersuchung von bereits beschriebenen ESTs oder cDNA-Sequenzen erfolgen. Da es davon aber bereits sehr viele gibt und diese für bisher unbekannte Gene codieren, ist ihre Untersuchung aufwendig. Ein weiterer Ansatz ist die Berücksichtigung von bekannten krankheitsrelevanten Genen bei der Maus. Der Rückschluss auf das konservierte, homologe und noch unbekannte Gen beim Menschen ist oft möglich. Sowohl der Rückschluss auf das menschliche Gen als auch die Wahl der Marker können von diesem Tiermodell aus getroffen werden.

Wenn es gelingt, in einem Kandidatengen eine Veränderung nachzuweisen, so muss diese mit einer Kontrollgruppe verglichen werden. Das Kandidatengen muss bei allen Erkrankten gleicher Weise verändert sein. Auch muss man durch die Art der Veränderung unterscheiden, ob man wirklich eine krankheitsrelevante Mutation gefunden hat, oder ob es sich nur um eine Normvariante handeln könnte.

Einer der damals für diese Arbeit in Frage kommenden Kandidaten war das Gen für GPR75, welches auf Chromosom 2p16 zwischen *D2S2251* und *D2S2352* kartiert wurde. GPR75 gehört zu den sogenannten G-Protein-bindenden Rezeptoren, die eine Rolle bei der Neurotransmission sowie dem Geruchs- und Geschmacksinn spielen. Außerdem wurde GPR75-RNA-Transkription im menschlichen Gehirn und retinalen Pigmentepithel nachgewiesen (Tartelin et al. 1999), so dass eine fehlerhafte Funktion dieses Proteins mit der Retinopathie der von uns untersuchten Patienten hätte in Verbindung gebracht werden können. Mittels SSCP wurden zwei betroffene und zwei gesunde Geschwister aus der Familie unter-

sucht. Anschließend wurde das Gen des dritten Betroffenen sequenziert. Bei den Untersuchten konnte keine Veränderung des Kandidatengens nachgewiesen werden (P. Gyurus, persönliche Mitteilung).

4.5 Mögliche Bedeutung dieser Arbeit für Diagnostik und Therapie

Mit der Beschreibung neuer Gene für die arRP könnte es in Zukunft möglich sein, den gesunden Familienangehörigen von erkrankten Personen häufiger Aufklärung darüber zu verschaffen, ob diese homozygote und noch asymptotische Träger einer arRP verursachenden Mutation sind oder nicht. Je mehr Gene für diese Erkrankung identifiziert werden, desto häufiger kann man möglicherweise Patienten über eine genetische Risikokonstellation aufklären. Dieses wird mit jedem gefundenen Gen ein wenig wahrscheinlicher. Die Konsequenzen für den Patienten wären die Einführung engmaschiger augenärztlicher Kontrolluntersuchungen, um eventuelle pathologische Prozesse frühzeitig zu erkennen und, wenn auch nur symptomatisch, behandeln zu können (s. Kap. 1.2.2).

Für die Therapie der Retinitis pigmentosa liegt der Nutzen dieser Arbeit noch weit in der Zukunft. Nachdem ein Kandidatengen gefunden worden ist, muss seine Funktion in der Physiologie der Netzhaut und somit auch pathophysiologisch erforscht werden. Ist diese aufwendige Arbeit getan, stehen verschiedene Therapieansätze zur Auswahl. Die medikamentös substituierende, hemmende oder einen bestimmten Prozess im Körper aktivierende Behandlung verspricht zur Zeit die größten Erfolge.

Weniger erfolgversprechend, da in der Vergangenheit enttäuschend, sind die verschiedenen Methoden der Gentherapie: Der in vivo oder ex vivo durchgeführte Gentransfer in die Patientenzelle zum Zwecke der Expression, Korrektur oder Inhibition von Genen. Noch ist der Gentransfer mangels zuverlässiger Vektoren für die Einschleusung und Insertion, welche nicht vorherzusagen und deshalb risikoreich ist, nicht ausgereift genug. Wenn die technischen Probleme gelöst sind, stellen sich der Gesellschaft ethische Fragen, z.B. bezüglich der Gefahr des Missbrauchs zur genetischen Aufwertung, der Regelung der Verfügbarkeit und der Anwendungsindikationen.

Zuletzt seien noch die Erprobung der Transplantation von retinalem Pigmentepithel und die retinale Implantation von Phototransduktions-Mikrochips genannt, welche beide vielversprechend sind, jedoch noch nicht ausgereift genug sind, um einen bleibenden Therapieerfolg zu ermöglichen.

5 Zusammenfassung

Die Retinitis pigmentosa (RP) ist eine genetisch heterogene Degeneration der Netzhaut. Auch Vererbungsmodus, Phänotyp und Penetranz sind äußerst heterogen. Die verschiedenen Pathomechanismen münden in eine Apoptose der retinalen Sinneszellen und einer fortschreitenden Abnahme des Sehvermögens bis zu Erblindung.

Diese Arbeit untersucht eine deutsche Familie mit der autosomal rezessiven Form der RP (arRP). Die Familie besteht aus neun Geschwistern, von denen drei erkrankt sind und deren Eltern miteinander blutsverwandt sind.

Die zu dem Zeitpunkt bereits bekannten arRP-Gene wurden untersucht und als Ursache der RP in dieser Familie mittels Segregationsanalyse ausgeschlossen. Es folgte ein genomweites Screening mit Mikrosatellitenmarkern. Das Ergebnis dieser Suche waren Homozygotie für Loci auf Chromosom 1q43-44 zwischen *D1S2694* und *D1S321* und auf Chromosom 2p14-16.1 zwischen *D2S391* und *D2S441* mit positiven Zweipunkt-LOD-Scores. Der maximale LOD-Score für den Locus auf Chromosom 1q betrug 2,56 bei *D1S2670*. Der maximale LOD-Score für den Locus auf Chromosom 2p betrug 2,74 bei *D2S337*.

Die anschließend durchgeführte Mehrpunkt-LOD-Score Berechnung ergab für den Krankheitslocus auf Chromosom 2p einen Wert von über 3 bei verschiedenen angenommenen Verwandtschaftsgraden der Elterngeneration. Der höchste LOD-Score betrug 3,675 für den Verwandtschaftsgrad der Eltern von Cousin-Cousine dritten Grades. Die LOD-Scores für den Locus 1q erreichten Werte von maximal 2,136.

In dem entsprechenden Bereich auf Chromosom 2, nämlich auf 2p16 zwischen *D2S2251* und *D2S2352*, wurde bereits das Gen GPR75 kartiert, welches eine Rolle in der Signalübertragung in der menschlichen Retina spielen könnte. Mittels SSCP bzw. Sequenzierung wurde dieses Kandidatengen in dieser Familie untersucht und dabei keine Mutation gefunden.

Der ca. 15 cM umfassende Intervall des von uns gefundenen Locuses auf 2p überschneidet sich auf 9 cM mit dem 1999 beschriebenen Locus RP28 zwischen *D2S1337-D2S286*. Es kann sich also, bei der genetischen Heterogenität der Retinitis pigmentosa, entweder um einen neuen arRP-Genort zwischen *D2S391* und *D2S337* handeln oder es gelang eine weitere Eingrenzung von RP28 zwischen *D2S285* und *D2S286*.

Die Bedeutung dieser Arbeit für die Diagnostik der RP könnte in der Verbesserung der Aussichten bei einer Genotypisierung anderer Familien liegen. Nach einer Aufklärung der pathophysiologischen Wirkungen der bis jetzt gefundenen Gene könnten in Zukunft auch neue Therapieoptionen entstehen.

6 Literaturverzeichnis

Adato A., Kalinski H., Weil D., Chaib H., Korostishevsky M., Bonne-Tamir B. (1999) Possible Interaction between USH1B and USH3 Gene Products as Implied by Apparent Digenic Deafness Inheritance. *Am. J. Hum. Genet.* 1999, 65: 261-265

Ahmed Z.M., Riazuddin S., Bernstein S.L., Ahmed Z., Khan S., Griffith A.J., Morell R.J., Friedman T.B., Riazuddin S., Wilcox E.R. (2001) Mutations of the protocadherin gene PCDH15 cause Usher syndrome type 1F. *Am. J. Hum. Genet.* 2001, 69: 25-34

Allikmets R., Singh N., Sun H., Shroyer N.F., Hutchinson A., Chidambaram A., Gerrard B., Baird L., Stauffer D., Pfeiffer A., Rattner A., Smallwood P., Li Y., Anderson K.L., Lewis R.A., Nathans J., Leppert M., Dean M., Lupski J.R. (1997) A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat. Genet.* 1997, 15: 236-246

Ardell M.D., Bedsole D.L., Schoborg R.V., Pittler S.J. (2000) Genomic organization of the human rod photoreceptor cGMP-gated cation channel beta-subunit gene. *Gene* 2000, 245: 311-318

Banerjee P., Lewis C.A., Kleyn P.W., Shugart Y.Y., Ross B.M., Penchaszadeh G.K., Ott J., Jacobson S.G., Gilliam T.C., Knowles J.A. (1998) Homozygosity and physical mapping of the autosomal recessive retinitis pigmentosa locus (RP14) on chromosome 6p21.3. *Genomics* 1998, 48: 171-177

Bareil C., Hamel C.P., Delague V., Arnaud B., Demaille J., Claustres M. (2001) Segregation of a mutation in CNGB1 encoding the beta-subunit of the rod cGMP-gated channel in a family with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Hum. Genet.* 2001, 108: 328-334

Bayes M., Goldaracena B., Martinez-Mir A., Iragui-Madoz M.I., Solans T., Chivelet P., Bussaglia E., Ramos-Arroyo M.A., Baiget M., Vilageliu L., Balcells S., Gponza-

les-Duarte R., Grinberg D. (1998) A new autosomal rezessive retinitis pigmentosa locus maps on chromosome 2q31-q33. *J. Med. Genet.* 1998, 35: 141-145

Berson E.L., Rosner B., Sandberg M.A., Hayes K.C., Nicholson B.W., Weigel-DiFranco C. et al. (1993) A randomized trial of vitamin A and vitamin E supplementation for retinitis pigmentosa. *Arch. Ophthalmol.* 1993, 111: 761-772

Berson E.L. (1996) Retinitis pigmentosa: Unfolding its mystery. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1996, 93: 4526-4528

Bolz H., Gal A. (2002) Genetik des Usher-Syndroms. *Medgen* 2002, 14: 10-14

Chen X.N., Korenberg J.R., Jiang M., Shen D., Fong H.K. (1996) Localization of the human RGR opsin gene to chromosome 10q23. *Hum. Genet.* 1996, 97: 720-722

Cremers F.P.M., van de Pol D.J.R., van Driel M., den Hollander A.I., van Haren F.J.J., Knoers N.V.A.M., Tijmes N., Bergen A.A.B., Rohrschneider K., Blankenagel A., Pinckers A.J.L.G., Deutman A.F., Hoyng C.B. (1998) Autosomal recessive retinitis pigmentosa and cone-rod dystrophy caused by splice site mutations in the Stargardt's disease gene ABCR. *Hum. Mol. Genet.* 1998, 7: 355-362

D'Cruz P.M., Yasumura D., Weir J., Matthes M.T., Abderrahim H., LaVail M.M., Vollrath D. (2000) Mutation of the receptor tyrosine kinase gene *Mertk* in the retinal dystrophic RCS rat. *Hum. Mol. Genet.* 2000, 9: 645-651

Dhallan R.S., Macke J.P., Eddy R.L., Shows T.B., Reed R.R., Yau K.W., Nathans J. (1992) Human rod photoreceptor cGMP-gated channel: amino acid sequence, gene structure, and functional expression. *J. Neurosci.* 1992, 12: 3248-3256

Donders F., (1857) Beiträge zur pathologischen Anatomie des Auges. 2. Pigmentbildung in der Netzhaut. *Arch. Fr. Ophthalmol.* 1857, 3: 139-165

Dryja T.P., McGee T.L., Reichel E., Hahn L.B., Cowley G.S., Yandell D.W., et al. (1990) A point mutation of rhodopsin gene in one form of retinitis pigmentosa. *Nature* 1990, 343: 364-366

Dryja T.P., Li T. (1995) Molecular genetics of retinitis pigmentosa. *Hum. Mol. Genet.* 1995, 4: 1739-1743

Dryja T.P., Finn J.T., Peng Y.-W., McGee T.L., Berson E.L., Yau K.W. (1995) Mutations in the gene encoding the alpha subunit of the rod cGMP-gated channel in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92: 10177-10181

Dryja T.P., Rucinski D.E., Chen S.H., Berson E.L. (1999) Frequency of mutations in the gene encoding the alpha subunit of rod cGMP-phosphodiesterase in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1999, 40: 1859-1865

Farrall M. (1993) Homozygosity mapping: familiarity breeds debility. *Nat. Genet.* 1993, 5: 107-108

Flannery J., Lem J., Simon M, Applebury M., Li T., Bowes C. et al. (1992) Transgenic rescue of the rd/rd mouse. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1992, 33: 945

Finckh U., Xu S., Kumaramanickavel G., Schürmann M., Mukkadan J.K., Fernandez T., John S., Weber J.L., Denton M.J., Gal A. (1998) Homozygosity mapping of autosomal recessive retinitis pigmentosa locus (RP22) on chromosome 16p12.1-p12.3. *Genomics* 1998, 48: 341-345

Fuchs S., Nakazawa M., Maw M., Tamai M., Oguchi Y., Gal A. (1995) A homozygous 1-base pair deletion in the arrestin gene is a frequent cause of Oguchi disease in Japanese. *Nat. Genet.* 1995, 10: 360-362

Gal A., Li Y., Thompson D.A., Weir J., Orth U., Jacobson S.G., Apfelstedt-Sylla E., Vollrath D. (2000) Mutations in MERTK, the human orthologue of the RCS rat retinal dystrophy gene, cause retinitis pigmentosa. *Nat. Genet.* 2000, 26: 270-271

Gerber S., Rozet J.-M., Takezawa S.-I., dos Santos L.C., Lopes L., Gribouval O., Penet C., Perrault I., Ducroq D., Souied E., Jeanpierre M., Romana S., Frézal J., Ferraz F., Yu-Umesono R., Munnich A., Kaplan J. (2000) The photoreceptor cell-specific nuclear receptor gene (PNR) accounts for retinitis pigmentosa in the Crypto-Jews from Portugal (Marranos), survivors from the Spanish Inquisition. *Hum. Genet.* 2000, 107: 276-284

Gu S., Thompson D.A., Srisailapathy Srikumari C.R., Lorenz B., Finckh U., Nicoletti A., Murthy K.R., Rathmann M., Kumaramanickavel G., Denton M.J., Gal A. (1997) Mutations in RPE65 cause autosomal recessive childhood-onset severe retinal dystrophy. *Nature Genetics* 1997, 17: 194-197

Gu S., Kumaramanickavel G., Srikumari C.R., Denton M.J., Gal A. (1999) Autosomal recessive retinitis pigmentosa locus RP28 maps between *D2S1337* and *D2S286* on chromosome 2p11-p15 in an indian family. *J. Med. Genet.* 1999, 36: 705-707

Hagstrom S.A., North M.A., Nishina P.M., Berson E.L., Dryja T.P. (1998) Recessive mutations in the gene encoding the tubby-like protein TULP1 in patients with retinitis pigmentosa. *Nat. Genet.* 1998, 18: 174-176

Hameed A., Khaliq S., Ismail I.M., Anwar K., Mehdi S.Q., Bessant D., Payne A.M., Bhattacharya S.S. (2001) A new locus for autosomal recessive retinitis pigmentosa (RP29) mapping to chromosome 4q32-q34 in a Pakistani family. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2001, 42: 1436-1438

Hamida C. Ben, Doerflinger N., Belal S., Linder C., Reutenauer L., Dib C., Gyapay G., Vignal A., Paslier D. Le, Cohen D., Pandolfo M., Mokini V., Novelli G., Hentati F., Hamida M. Ben, Mandel J.-L., Koenig M. (1993) Localization of Friedreich ataxia phenotype with selective vitamin E deficiency to chromosome 8q by homozygosity mapping. *Nat. Genet.* 1993, 5: 195-200

Hauswirth W.W., LaVail M.M., Flannery J.G., Lewin A.S. (2000) Ribozyme gene therapy for autosomal dominant retinal disease. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2000, 38: 147-153

den Hollander A.I., ten Brink J.B., de Kok Y.J.M., van Soest S., van den Born L.I., van Driel M.A., van De Pol D.J.R., Payne A.M., Bhattacharya S.S., Kellner U., Hoyng C.B., Westerveld A., Brunner H.G., Bleeker-Wagemakers E.M., Deutman A.F., Heckenlively J.R., Cremers F.P.M., Bergen A.A.B. (1999) Mutations in a human homologue of *Drosophila* crumbs cause retinitis pigmentosa (RP12). *Nat. Genet.* 1999, 23: 217-221

Hoyng C.B., Poppelaars F., van de Pol T.J.R., Kremer H., Pinckers A.J.L.G., Deutman A.F., Cremers F.P.M. (1996) Genetic fine mapping of the gene for recessive Stargart disease. Veröfentlichtes Paper. Kontaktadresse: F.P.M. Cremers, Department of Human Genetics, University Hospital Nijmegen, P.O. Box 9101, 6500 HB Nijmegen, The Netherlands.

Huang S.H., Pittler S.J., Huang X., Oliveira I., Berson E.L., Dryja T.P. (1995) Autosomal recessive retinitis pigmentosa caused by mutations in the α subunit of rod cGMP phosphodiesterase. *Nat. Genet.* 1995, 11: 468-471

Inglehearn C.F. (1998) Molecular genetics of human retinal dystrophies. *Eye* 1998, 12: 571-579

Jurklic B., Zrenner E., Wessing A. (1997) Retinitis pigmentosa- klinische, genetische und pathophysiologische Aspekte. *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* 1997, 210: 1-18

Kellner U. (2003) Die hereditären Netzhautdystrophien. *Medgen* 2003, 15: 101-104

Khaliq S., Hameed A., Ismail M., Mehdi S.Q., Bessant D.A., Payne A.M., Bhattacharya S.S. (1999) Refinement of the locus for autosomal recessive retinitis pigmentosa (RP25) linked to chromosome 6q in a family of Pakistani origin. *Am. J. Hum. Genet.* 1999, 65: 571-574

Kobayashi M., Takezawa S., Hara K., Yu R.T., Umesono Y., Agata K., Taniwaki M., Yasuda K., Umesono K. (1999) Identification of a photoreceptor cell-specific nuclear receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 27: 4814-4819

Lathrop G.L., Lalouel J.M., Julier C., Ott J. (1984) Strategies for multilocus linkage analysis in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1984, 81: 3443-3446

LaVail M.M., Li L., Turner J.E., Yasmura D. (1992) Retinal pigment epithelial cell transplantation in RCS rats, normal metabolism in rescued photoreceptors. *Exp. Eye Res.* 1992, 55: 555-562

Leutelt J., Oehlmann R. (1995) Autosomal recessive retinitis pigmentosa locus maps on chromosome 1q in a large consanguineous family from Pakistan. *Clin. Genet.* 1995, 47: 122-124

Maeda T., Van Hooser J.P., Driessen C.A., Filipek S., Janssen J.J., Palczewski K. (2003) Evaluation of the role of the retinal G protein-coupled receptor (RGR) in the vertebrate retina in vivo. *J. Neurochem.* 2003, 85: 944-956.

Martínez-Mir A., Bayés M., Vilageliu L., Grinberg D., Ayuso C., del Rio T., García-Sandoval B., Bussaglia E., Baiget M., González-Duarte R., Balcells S. (1997) A new locus for autosomal recessive retinitis pigmentosa (RP19) maps to 1p13-1p21. *Genomics* 1997, 40: 142-146

Martínez-Mir A., Paloma E., Allikmets R., Ayuso C., del Rio T., Dean M., Vilageliu L., González-Duarte R., Balcells S. (1998) Retinitis pigmentosa caused by a homozygous mutation in the Stargardt disease gene ABCR. *Nat. Genet.* 1998, 18: 11-12

Massof R.W., Finkelstein D. A two-stage hypothesis for the natural course of retinitis pigmentosa. In: Zrenner E., Krastel H., Goebel H.H., editors (1987) *Advances in the biosciences* 1987, 62: 29-58

Maw M.A., Kennedy B., Knight A., Bridges R., Roth K.E., Mani E.J., Mukkadan J.K., Nancarrow D., Crabb J.W., Denton M.J. (1997) Mutation of the gene encoding cellular retinaldehyde-binding protein in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nat. Genet.* 1997, 17: 198-200

McLaughlin M.E., Sandberg M.A., Berson E.L., Dryja T.P. (1993) Recessive mutations in the gene encoding the beta-subunit of rod phosphodiesterase in patients with retinitis pigmentosa. *Nat. Genet.* 1993, 4: 130-134

Morimura H., Fishman G.A., Grover S.A., Fulton A.B., Berson E.L., Dryja T.P. (1998) Mutations in the RPE65 gene in patients with autosomal retinitis pigmentosa or leber congenital amaurosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95: 3088-3093

Morimura H., Saindelle-Ribeauveau F., Berson E.L., Dryja T.P. (1999) Mutations in RGR, encoding a light-sensitive opsin homologue, in patients with retinitis pigmentosa. *Nat. Genet.* 1999, 23: 393-394

Mullis K.B., Faloona F.A. (1987) Specific synthesis of dna in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 1987, 155: 335-350

Nadig M.N. (1999) Development of a silicon retinal implant: cortical evoked potentials following focal stimulation of the rabbit retina with light and electricity. *Clin. Neurophysiol.* 1999, 110: 1545-1553

Nakazawa M., Wada Y., Tamai M. (1998) Arrestin gene mutations in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Arch. Ophthalmol.* 1998, 116: 498-501

Nicoletti A., Wong D.J., Kawase K., Gibson L.H., Yang-Feng T.L., Richards J.E., Thompson D.A. (1995) Molecular characterization of the human gene encoding an abundant 61 kDa protein specific to the retinal pigment epithelium. *Hum. Mol. Genet.* 1995, 4: 641-649

Ott J. (1995) How do you compute a lod score? *Nat. Genet.* 1995, 11: 354-355

Palczewski K., Rispoli G., Detwiler P.B. (1992) The influence of arrestin (48 K protein) and rhodopsin kinase on visual transduction. *Neuron* 1992, 8: 117-126

Pittler S.J., Baehr W., Wasmuth J.J., McConnell D.G., Champagne M.S., van Tuinen P., Ledbetter D., Davis R.L. (1990) Molecular characterization of human

and bovine rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase alpha-subunit and chromosomal localization of the human gene. *Genomics* 1990, 6: 272-283

Radtke N.D., Aramant R.B., Seiler M., Petry H.M. (1999) Preliminary report: indications of improved visual function after retinal sheet transplantation in retinitis pigmentosa patients. *Am. J. Ophthalmol.* 1999, 128: 384-387

Redmond T.M., Yu S., Lee E., Bok D., Hamasaki D., Chen N., Goletz P., Ma J.X., Crouch R.K., Pfeifer K. (1998) Rpe65 is necessary for production of 11-cis-vitamin A in the retinal visual cycle. *Nat. Genet.* 1998, 20: 344-351

Rivolta C., Sweklo E.A., Berson E.L., Dryja T.P. (2000) Missense mutation in the USH2A gene associated with recessive retinitis pigmentosa without hearing loss. *Am. J. Hum. Genet.* 2000, 66: 1975-1978

Rivolta C., Sharon D., De Angelis M. M., Dryja T. P., (2002) Retinitis pigmentosa and allied diseases: numerous diseases, genes, and inheritance patterns. *Hum. Mol. Genet.* 2002, 11: 1219-1227

Rosenfeld P.J., Cowley G.S., McGee T.L., Sandberg M.A., Berson E.L., Dryja T.P. (1992) A null mutation in the rhodopsin gene causes rod photoreceptor dysfunction and autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nat. Genet.* 1992, 1: 209-213

Ruiz A., Borrego S., Marcos I., Antiñolo G. (1998) A major locus for autosomal recessive retinitis pigmentosa on 6q, determined by homozygosity mapping of chromosomal regions that contain gamma-aminobutyric acid-receptor clusters. *Am. J. Hum. Genet.* 1998, 62: 1452-1459

Ruiz A., Winston A., Lim Y.H., Gilbert B.A., Rando R.R., Bok D. (1999) Molecular and biochemical characterization of lecithin retinol acyltransferase. *J. Biol. Chem.* 1999, 274: 3834-3841

Sobel E., Lange K. (1996) Descent graphs in pedigree analysis: applications to haplotyping, location scores, and marker sharing statistics. *Am. J. Hum. Genet.* 1996, 58: 1323-1337

Takahashi M., Miyoshi H., Verma I.M., Gage F.H. (1999) Rescue from photoreceptor degeneration in the rd mouse by human immunodeficiency virus vector-mediated gene transfer. *J. Virol.* 1999, 73: 7812-7816

Tarttelin E.E., Kirschner L.S., Bellingham J., Baffi J., Taymans S.E., Gregory-Evans K., Csaky K., Stratakis C.A., Gregory-Evans C.Y. (1999) Cloning and characterization of a novel orphan G-protein-coupled receptor localized to human chromosome 2p16. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999, 260: 174-180

Thompson D.A., Li Y., McHenry C.L., Carlson T.J., Ding X., Sieving P.A., Apfelstedt-Sylla E., Gal A. (2001) Mutations in the gene encoding lecithin retinol acyltransferase are associated with early-onset severe retinal dystrophy. *Nat. Genet.* 2001, 128: 123-124

Valverde D., Seminagoo R., del Rio E., Ayuso C., García-Sandoval B., del Rio T., Bayés M., Balcells S., Gonzalez-Duarte R., Baiget M. (1995) An homozygous G to A transition in exon 13 of the beta subunit of rod phosphodiesterase in two RP patients of a consanguineous family. *Am. J. Hum. Genet.* 1995, 57: 230

Voaden M.J. (1988) Retinitis pigmentosa and its models. *Progr. in Retinal Res.* 1988, 7: 293-331

Vollrath D., Feng W., Duncan J. L., Yasumura D., D'Cruz P.M., Chappelow A., Matthes M. T., Kay M. A., LaVail M.M. (2001) Correction of the retinal dystrophy phenotype of the RCS rat by viral gene transfer of Mertk. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001, 98: 12584-12589

Wada Y., Nakazawa M., Fuchs S., Gal A., Tamai M. (1996) Phenotypic characteristics of patients with Oguchi's disease associated with frequent 1147del a mutation in the arrestin gene. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1996, 37: 995

Weber B., Riess O., Hutchinson G., Collins C., Lin B.Y., Kowbel D., Andrew S., Schappert K., Hayden M.R. (1991) Genomic organization and complete sequence

of the human gene encoding the beta-subunit of the cGMP phosphodiesterase and its localisation to 4p16.3. *Nuc. Acids Res.* 1991, 19: 6263-6268

Weeda G., van Ham C.A., Vermeulen W., Bootsma D., van der Eb A.J., Hoeijmakers J.H.J. (1990) A presumed DNA helicase encoded by ERCC-3 is involved in the human repair disorders xeroderma pigmentosum and cockayne's syndrome. *Cell* 1990, 62: 777-791

Yokota T., Shiojiri T., Gotoda T., Arai H. (1996) Retinitis pigmentosa and ataxia caused by a mutation in the gene for the α -tocopherol-transfer protein. *N. Engl. J. Med.* 1996, 335: 1770-1771

Lebenslauf

Name: Bahmann Moazami-Benab

Anschrift: Barsbütteler Str. 34, 22043 Hamburg

Telefon: 040-6534426
0176-20597330

E-Mail: b.moazami@gmx.de

Geburtsdatum: 24.05.1975

Geburtsort: Hamburg, Deutschland

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung: 1981-1985 Grundschule Öjendorfer Damm
1985-1994 Gymnasium Marienthal
1994 Hochschulreife

Hochschule: Immatrikulation an der Universität Hamburg,
Fachbereich Medizin im Sommersemester 1995

Ärztliche Vorprüfung im Frühjahr 1997

1. Staatsexamen im Frühjahr 1998

Beginn einer Dissertation am Institut für Humangenetik
der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf im Sommerse-
mester 1998

2. Staatsexamen im Herbst 2000

Praktisches Jahr mit Wahlfach Neurologie: April 2001-
März 2002

3. Staatsexamen im Mai 2002

Klinik: Arzt im Praktikum im Allgemeinen Krankenhaus Wands-
bek in Hamburg, 1. Medizinische Abteilung: 01.06.2002-
30.11.2003

Assistenzarzt in der Kardiologischen Gemeinschaftspraxis
Schloßgarten 7 in Hamburg: 01.12.2003-31.05.2005

Assistenzarzt im Krankenhaus Mariahilf in Hamburg, Ab-
teilung für Innere Medizin: Seit 01.06.2005

8 Danksagung

Hiermit möchte ich meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Andreas Gal danken. Er hat mir als Leiter des Instituts für Humangenetik des Universitätskrankenhauses Eppendorf in Hamburg ermöglicht, diese Dissertation unter seiner Leitung zu erstellen.

Ferner schulde ich Frau Ulrike Orth und Herrn Dr. Peter Gyurus Dank für die freundliche Einweisung in die Methodik und die unmittelbare Betreuung während der Durchführung dieser Arbeit.

Privatdozent Dr. Müller-Myhsok habe ich für die Durchführung der Zwei- und Mehrpunkt-Kopplungsanalysen zu danken, welche einen zentralen Teil dieser Arbeit ausmachen.

Ich möchte nicht zuletzt meiner Familie danken, die mich immer rückhaltlos und auf allen Gebieten unterstützte.

Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.
