Aus dem Zentrum für Humangenetik

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Karl-Heinz Grzeschik
Arbeitsgruppe für Molekulare Analyse erblicher Erkrankungen
Leiterin: Prof. Dr. med. Manuela C. Koch

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

Kandidatengenanalyse
in einer Familie mit Kamptodaktylie

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Jörg Schott aus Mannheim
Marburg 2008

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 04.09.2008,
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Rothmund
Referentin: Prof. Dr. med. Manuela C. Koch
Korreferent: Prof. Dr. med. U.-M. Bauer

Ich widme diese Arbeit meinem Vater Werner Schott

(1945 – 1997)

Inhaltsverzeichnis

1	**Einleitung**	**1**
1.1	Klassifikation der Hand- und Fußfehlbildungen	1
1.2	Definition und klinische Manifestation der Kamptodaktylie	1
1.3	Ätiologie und Pathogenese der Kamptodaktylie	3
1.4	Prävalenz der Kamptodaktylie	4
1.5	Therapie der Kamptodaktylie	4
1.6	Kamptodaktylie assoziiert mit anderen Symptomen	4
1.7	Kamptodaktylie als syndromales Symptom	5
1.8	Differentialdiagnose der Kamptodaktylie	6
1.8.1	Sklerodermie	6
1.8.2	Morbus Dupuytren	6
1.9	Kandidatengene für Kopplungsanalysen	8
1.10	Fragestellung in der vorliegenden Arbeit	10
2	**Material und Methoden**	**11**
2.1	Materialien	11
2.1.1	Geräte und Zubehör	11
2.1.2	Chemikalien und Lösungen	12
2.1.2.1	DNA-Extraktion	12
2.1.2.2	PCR-Reagenzien	12
2.1.2.3	Fertigsysteme (Kits)	12
2.1.2.4	Oligonukleotidprimer	12
2.1.2.5	Ladepuffer	13
2.1.2.6	DNA-Größenstandards	13
2.1.2.7	Agarosegel	13
2.1.2.8	Polyacrylamid-Harnstoffgel	13
2.2	Methoden	14
2.2.1	Labormethoden	14
2.2.1.1	DNA-Extraktion aus Blutleukozyten	14
2.2.1.2	DNA-Konzentrationsbestimmung	15
2.2.1.3	Polymerasekettenreaktion	15
2.2.1.4	Standard-PCR-Bedingungen	16
2.2.1.5	Agarosegelelektrophorese und Fotodokumentation	16

2.2.1.6	GeneScan-Analyse	17
2.2.1.7	Vorbereitung der Daten für die Kopplungsanalysen	19
2.2.2	Statistische Methoden	20
2.2.2.1	Genetische Marker	20
2.2.2.2	Zweipunktanalyse und Berechnung der LOD-Werte	20
2.2.2.3	Multimarkeranalyse	22
2.2.2.4	Haplotypanalyse	22
2.2.3	Computerauswertung	22
2.2.3.1	Software	23
2.2.3.2	Datenbanken	23
3	**Kasuistik**	**24**
3.1	Familie mit Kamptodaktylie	24
3.2	Klinische Untersuchung	25
3.2.1	Untersuchung der Hände	25
3.2.2	Untersuchung der Füße	27
3.2.3	Klassifikation des Phänotyps bei den Familienmitgliedern	28
3.2.4	Die klinische Untersuchung der Familie im Überblick	29
3.3	Vererbung der Kamptodaktylie in der Familie	29
4	**Ergebnisse**	**30**
4.1	LOD-Wert-Simulationen für den Stammbaum der Familie	30
4.2	Chromosom 1	33
4.2.1	Testung des Kandidatengenlocus 1q24-25	33
4.2.2	Genotypisierung des gesamten Chromosoms 1	34
4.2.2.1	Mikrosatellitenmarker mit positiven LOD-Werten $Z_{max} > 0.00$	34
4.2.2.2	Mikrosatellitenmarker mit LOD-Werten zwischen 0.00 und –2.00	36
4.2.2.3	Mikrosatellitenmarker mit LOD-Werten $Z_{max} < -2.00$	36
4.2.2.4	Haplotypanalyse für Chromosom 1	37
4.2.2.5	Multimarkeranalyse für Chromosom 1	39
4.2.3	Identifikation eines Kandidatenlocus auf Chromosom 1	40
4.2.4	Zusammenfassung der Analyse des Chromosoms 1	41
4.3	Chromosom 2	42
4.3.1	Testung der Kandidatengenloci 2q31 und 2q34-36	42
4.3.2	Genotypisierung des gesamten Chromosoms 2	44
4.3.2.1	Mikrosatellitenmarker mit positiven LOD-Werten $Z_{max} > 0.00$	45
4.3.2.2	Mikrosatellitenmarker mit LOD-Werten zwischen 0.00 und –2.00	45

4.3.2.3	Mikrosatellitenmarker mit LOD-Werten $Z_{max} < –2.00$	46
4.3.2.4	Haplotypanalyse für Chromosom 2	47
4.3.2.5	Multimarkeranalyse für Chromosom 2	50
4.3.3	Zusammenfassung der Analyse des Chromosoms 2	51
4.4	Exemplarische Darstellung der Gewinnung von Genotypdaten durch Mikrosatellitenmarker	52
4.5	Chromosom 3	55
4.5.1	Testung des Kandidatengenlocus 3p21.31	55
4.5.2	Genotypisierung des gesamten Chromosoms 3	56
4.5.2.1	Mikrosatellitenmarker mit positiven LOD-Werten $Z_{max} > 0.00$	56
4.5.2.2	Mikrosatellitenmarker mit LOD-Werten zwischen 0.00 und –2.00	59
4.5.2.3	Mikrosatellitenmarker mit LOD-Werten $Z_{max} < -2.00$	59
4.5.2.4	Haplotypanalyse für Chromosom 3	60
4.5.2.5	Multimarkeranalyse für Chromosom 3	62
4.5.3	Identifikation eines Kandidatenlocus auf Chromosom 3	63
4.5.4	Zusammenfassung der Analyse des Chromosoms 3	64
4.6	Chromosom 10	65
4.6.1	Testung des Kandidatengenlocus 10p15	65
4.6.2	Genotypisierung des gesamten Chromosoms 10	66
4.6.2.1	Mikrosatellitenmarker mit positiven LOD-Werten $Z_{max} > 0.00$	67
4.6.2.2	Mikrosatellitenmarker mit LOD-Werten zwischen 0.00 und –2.00	67
4.6.2.3	Mikrosatellitenmarker mit LOD-Werten $Z_{max} < –2.00$	67
4.6.2.4	Haplotypanalyse für Chromosom 10	68
4.6.2.5	Multimarkeranalyse für Chromosom 10	70
4.6.3	Zusammenfassung der Analyse des Chromosoms 10	71
4.7	Chromosom 17	72
4.7.1	Testung des Kandidatengenlocus 17q12-21	72
4.7.2	Genotypisierung des gesamten Chromosoms 17	73
4.7.2.1	Mikrosatellitenmarker mit positiven LOD-Werten $Z_{max} > 0.00$	73
4.7.2.2	Mikrosatellitenmarker mit LOD-Werten zwischen 0.00 und –2.00	73
4.7.2.3	Mikrosatellitenmarker mit LOD-Werten $Z_{max} < –2.00$	73
4.7.2.4	Haplotypanalyse für Chromosom 17	74
4.7.2.5	Multimarkeranalyse für Chromosom 17	76
4.7.3	Zusammenfassung der Analyse des Chromosoms 17	78
5	**Diskussion**	**79**
5.1	Phänotyp und Stammbaum der Familie	79

5.2	Labormethoden und Datenverwaltung	82
5.3	Kopplungsanalysen	87
5.4	Testung der Kandidatengene	89
5.5	Identifikation zweier Kandidatenloci	92
5.6	Ausblick	97
6	**Zusammenfassung**	**98**
7	**Abkürzungen und Symbole**	**100**
7.1	Abkürzungen	100
7.2	Symbole	101
8	**Literaturverzeichnis**	**102**
9	**Anhang**	**104**
9.1	Sequenzen der Oligonukleotidprimer	104
9.1.1	Chromosom 1	104
9.1.2	Chromosom 2	105
9.1.3	Chromosom 3	106
9.1.4	Chromosom 10	107
9.1.5	Chromosom 17	107
9.2	Verzeichnis der akademischen Lehrer	108
9.2.1	Universität zu Köln	108
9.2.2	Justus-Liebig-Universität Gießen	108
9.2.3	Philipps-Universität Marburg	108
9.3	Curriculum Vitae	109
9.4	Danksagung	110
9.5	Ehrenwörtliche Erklärung	111

1 Einleitung

1.1 Klassifikation der Hand- und Fußfehlbildungen

Nach Temtamy und McKusick (1978) ist eine Unterteilung der Hand- und Fußfehlbildungen in fünf Gruppen möglich. Diese Klassifikation beruht auf anatomischen und genetischen Aspekten, wobei Überlappungen zwischen den einzelnen Gruppen vorkommen können. Die Gruppen sind in Untergruppen untergliedert.

Der Überbegriff Handfehlbildung bezieht sich dabei immer auf Hand- und Fußfehlbildungen. Die am häufigsten auftretende Fehlbildung ist die Syndaktylie, die durch zusammengewachsene Finger und/oder Zehen gekennzeichnet ist. Die isolierte, nicht syndromale Form der Syndaktylie lässt sich in acht Untergruppen aufgliedern. Als syndromale Form tritt die Syndaktylie beispielsweise beim Poland-Syndrom in Erscheinung.

Bei der Polydaktylie und der Brachydaktylie verhält es sich ähnlich, sie treten sowohl isoliert als auch im Rahmen von Syndromen auf. Die isolierten Fehlbildungen werden auch hier in weitere Untergruppen aufgegliedert. Als syndromale Manifestation der Polydaktylie lässt sich das Bardet-Biedl-Syndrom nennen. Die Brachydaktylie tritt häufig bei Knochendysplasien auf.

Anders als bei den bisher genannten Fehlbildungen verhält es sich bei den Kontrakturen, die nicht in weitere Untergruppen aufgegliedert werden. Unter dem Begriff Kontraktur werden vielmehr zwei unterschiedliche Krankheitsbilder zusammengefasst. Dies sind die Kamptodaktylie, die syndromal oder isoliert auftritt, und die Dupuytren-Kontraktur. Die Besonderheit der Kontrakturen besteht darin, dass sie zwar als Handfehlbildungen bezeichnet werden, eine knöcherne Beteiligung jedoch in den meisten Fällen fehlt (Abb. 1-1).

1.2 Definition und klinische Manifestation der Kamptodaktylie

Der Begriff Kamptodaktylie leitet sich aus dem Griechischen ab und bedeutet „gebogener Finger“. Die Ausdrücke Kamptodaktylie, Kampylodaktylie, Streblomikrodaktylie, Hammerfinger und kongenitale Fingerkontraktur werden häufig synonym verwandt. Erstmals wurde die Kamptodaktylie von Tamplin (1846) beschrieben.

Die Kamptodaktylie ist eine schmerzlose Beugekontraktur der Finger und Zehen. Der primäre Manifestationsort dieser Anomalie ist das proximale Interphalangealgelenk des Kleinfingers. Die Lokalisation im distalen Interphalangealgelenk des Kleinfingers oder in anderen Fingergelenken ist hingegen sehr viel seltener. Das Vorkommen der Fingerkontraktur im proximalen Fingergelenk des Ringfingers wurde vereinzelt beschrieben (Schallreuter und Reimlinger 1993). Die Zehen zeigen selten eine

Beteiligung bei der isolierten Form der Kamptodaktylie, sie kann jedoch im Rahmen von Syndromen auftreten.

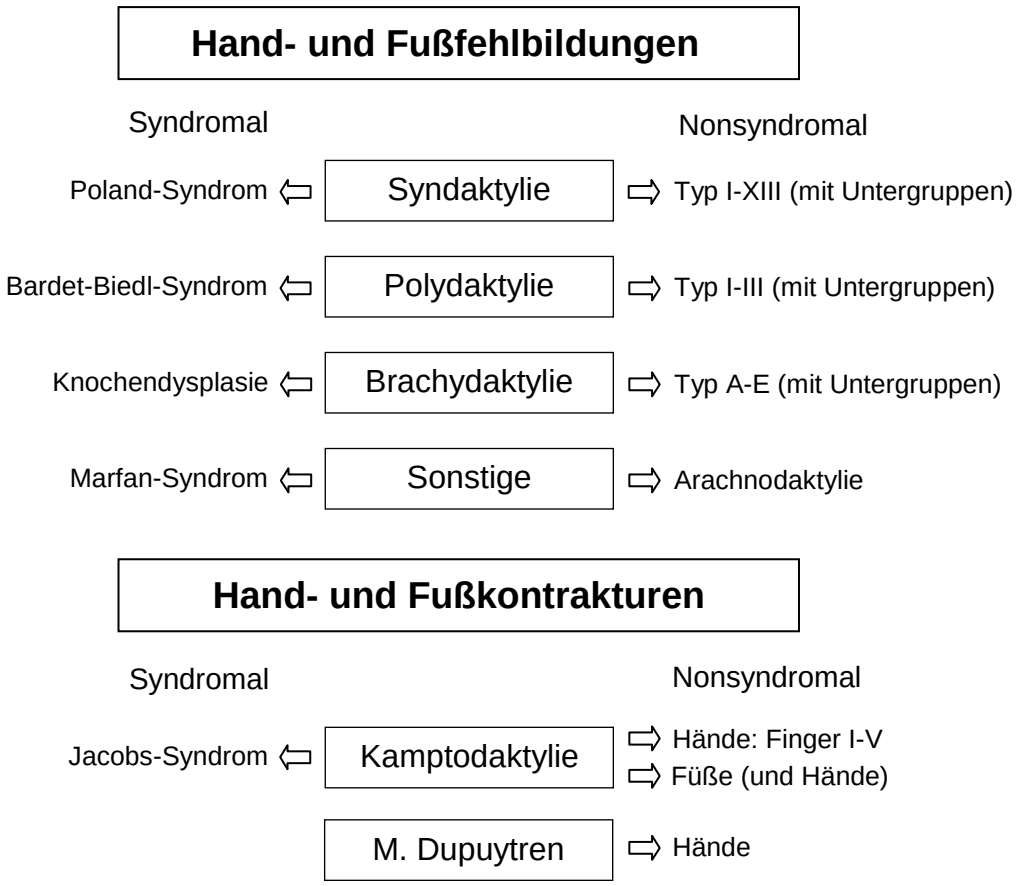

Abbildung 1-1: Klassifikation der Hand- und Fußfehlbildungen und der Hand- und Fußkontrakturen
Bei den Hand- und Fußfehlbildungen werden nur die isolierten Fehlbildungen in Untergruppen untergliedert. Bei den Kontrakturen wird zwischen der Kamptodaktylie und der Dupuytren-Kontraktur ohne weitere Aufgliederung in Untergruppen unterschieden

Das klinische Erscheinungsbild der Kamptodaktylie imponiert als Hammerfinger. Das proximale Interphalangealgelenk, meist des Kleinfingers, befindet sich in Beugestellung, während die metacarpophalangealen und distalen Fingergelenke unbeteiligt sind. Die kontrakten Finger können nicht ausgestreckt werden, eine weitere Flexion ist jedoch ohne Einschränkungen möglich (Brites et al. 1998). Die Kontraktur ist immer schmerzlos, obwohl der Krümmungswinkel in schweren Fällen bis zu 180° betragen kann. Intra- oder periartikuläre Veränderungen der betroffenen Gelenke oder Veränderungen der knöchernen Strukturen der Finger werden nicht beobachtet, auch der Gelenkspalt lässt sich röntgenologisch regelrecht darstellen (Temtamy und McKusick 1978). Knöcherne Beteiligungen werden lediglich im Rahmen von syndromalen Kamptodaktylien, beispielsweise dem Freeman-Sheldon-Syndrom, beobachtet.

Neben der Fingerkontraktur finden sich bei der Kamptodaktylie weitere phänotypische Auffälligkeiten. In manchen Fällen zeigen die Betroffenen Gelenkpolster über den dorsalen Anteilen der Gelenke. Diese im englischen Sprachgebrauch als „knuckle-pads“ bezeichneten Strukturen werden häufig beim Morbus Dupuytren beobachtet. Des Weiteren wurden knotige subkutane Veränderungen auf der volaren Seite von betroffenen Gelenken sowie das Fehlen der für diesen Bereich typischen transversalen Hautfalten beobachtet (Temtamy und McKusick 1978).

1.3 Ätiologie und Pathogenese der Kamptodaktylie

Ätiologisch unterscheidet man zwischen der erworbenen und der hereditären Form der Kamptodaktylie. Die erworbene Form der Fingerkontraktur ist meist traumatischer Genese (tendogen, myogen, neurogen), ebenso sind dermatogene Kontrakturen durch Narbenbildung im Rahmen von Verbrennungen denkbar.

Der hereditären Form bei familiär gehäuftem Vorkommen liegt meist ein autosomal dominanter Erbgang mit hoher, aber unvollständiger Penetranz und variabler Expressivität zugrunde (Welch und Temtamy 1966, Temtamy und McKusick 1978). Wird die Kontraktur bei keinem weiteren Familienmitglied beobachtet, spricht man von sporadischer Manifestation der Kamptodaktylie. Die sporadischen Fälle werden vermutlich durch Neumutationen verursacht und autosomal dominant weitervererbt. Als andere Ursache für sporadische Fälle kann auch eine autosomal rezessiv vererbte Form der Kamptodaktylie nicht ausgeschlossen werden.

Beim familiären Auftreten der Kamptodaktylie wird zwischen einer frühen und einer späten Ausprägungsform unterschieden. Handelt es sich um eine kongenitale Kontraktur oder entwickelt sich die Fingeranomalie innerhalb der ersten zwölf Lebensmonate, handelt es sich um die frühe Form. Charakteristisch für diese Form ist die bilaterale Manifestation der Kontraktur, die aber auch asymmetrisch sein kann (Brites et al. 1998; Dautel 2003). Die späte Form entwickelt sich im frühen Kindes- und Jugendalter. Das Erscheinungsbild der späten Kamptodaktylie ist zunächst konstant, der Flexionswinkel verändert sich wenig. Erst ab dem zehnten Lebensjahr kommt es zu einem langsam progredienten Verlauf. Der Flexionsgrad der betroffenen Gelenke nimmt bis etwa dem 30. Lebensjahr kontinuierlich zu (Schallreuter und Reimlinger 1993).

Die Pathogenese der Kamptodaktylie wurde von einigen Autoren kontrovers diskutiert, sie ist jedoch bis heute unbekannt. Anatomisch-strukturelle Veränderungen, wie Sehnenverkürzungen oder Verhärtung und Schrumpfung der Palmaraponeurose mit konsekutiver Kontraktur von Fingergelenken wie beim Morbus Dupuytren, finden sich bei der Kamptodaktylie nicht. Auch eine artikuläre Pathogenese kann aufgrund fehlender intra- und periartikulärer Veränderungen ausgeschlossen werden. Als

mögliche Ursache wurde eine Verkürzung der Haut zwischen dem Fingergrundgelenk und dem proximalen Fingerknochen diskutiert (Tamplin 1846). Anderson beschrieb 1891 eine fehlerhafte longitudinale Entwicklung der Flexoren. Siegert und Mitarbeiter gingen jedoch von einer multifaktoriellen Genese aus (Siegert et al. 1990).

1.4 Prävalenz der Kamptodaktylie

Die genaue Prävalenz der Kamptodaktylie ist nicht bekannt. Die Angaben in der Fachliteratur schwanken stark, eine Prävalenz von 1: 100 000 ist jedoch realistisch. Die Diskrepanz in den Angaben zur Prävalenz beruht vermutlich auf unterschiedlichen Populationen und unzureichender Dokumentation. Die unzureichende Dokumentation ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass es sich bei der Kamptodaktylie um eine Fingeranomalie handelt, die schmerzlos ist und in den wenigsten Fällen zu Funktionseinschränkungen mit Behinderung und somit zum Aufsuchen eines Orthopäden führt. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die dokumentierten Fälle seltene, schwere Fälle oder Zufallsdiagnosen darstellen und somit nicht repräsentativ sind. Unter den Betroffenen zeigt die Kamptodaktylie eine deutliche Gynäkotropie (Schallreuter und Reimlinger 1993).

1.5 Therapie der Kamptodaktylie

Die durch die Kontraktur hervorgerufene Funktionseinschränkung ist in den meisten Fällen gering und bedarf keiner Intervention. Da der Finger noch gebeugt werden kann und die Kontraktur schmerzlos ist, sind die Betroffenen in der Regel beschwerdefrei. Lediglich bei extremer Beugestellung des Gelenkes kann es zu Funktionseinbußen und partiellen Funktionsverlusten kommen. In diesen Fällen stehen zwei Therapieoptionen zur Verfügung. Zunächst wird die konservative Therapie in Form einer Schienung angestrebt (Dautel 2003). Hierbei bewirkt eine individuell angefertigte Schiene eine langsame Dehnung und Streckung des kontrakten Gelenks. Die operative Therapie bleibt schweren, konservativ therapieresistenten Fällen vorbehalten.

1.6 Kamptodaktylie assoziiert mit anderen Symptomen

Die Streblodaktylie ist eine Fingeranomalie, bei der mehrere Finger von einer Flexionskontraktur betroffen sind. Es handelt sich dabei meist um die Finger zwei bis fünf. Diese Anomalie ist verbunden mit einer übermäßigen renalen Ausscheidung von Aminosäuren (Parish et al. 1963) und ist von der Kamptodaktylie abzugrenzen, bei der immer nur ein Finger kontrakt ist (Donofrio und Ayala 1983). Dennoch werden die beiden Begriffe Streblodaktylie und Kamptodaktylie häufig synonym verwandt.

In einer Untersuchung aus dem Jahre 1966 beschrieben Nevin und Mitarbeiter vier Familien mit autosomal dominant vererbter Kamptodaktylie. Die Flexionskontraktur trat bei den Betroffenen in Kombination mit einer vermehrten renalen Ausscheidung von Taurin auf. Der autosomal dominante Vererbungsmodus wurde aufgrund mehrerer Vater-Sohn-Vererbungen vermutet.

1.7 Kamptodaktylie als syndromales Symptom

Das Symptom Kamptodaktylie wird bei komplexen Syndromen, beispielsweise dem Jacobs-Syndrom, beobachtet. Die Tabelle 1-1 zeigt die wichtigsten Syndrome, bei denen die Kamptodaktylie als Symptom auftritt, im Überblick.

Tabelle 1-1: Kamptodaktylie im Rahmen definierter Syndrome

Syndrom	Synonym	OMIM
Jacobs-Syndrom	CACP-Syndrom	208250
Down-Syndrom	Trisomie 21	190685
Zellweger-Syndrom	Zerebrohepatorenales Syndrom	214100
Hecht-Syndrom	Trismus-Peudokamptodaktylie-Syndrom	158300
Kamptodaktylie Typ Goodman-Syndrom	Kamptodaktylie mit Bindegewebshyperplasie und Skelettdysplasie	211930
Freeman-Sheldon-Syndrom	Kraniokarpotarsale Dystrophie	193700
Kamptodaktylie Guadalajara Typ I-Syndrom	Faszioskelettales Syndrom	211910

1.8 Differentialdiagnose der Kamptodaktylie

Die Kamptodaktylie lässt sich differentialdiagnostisch von der Sklerodermie und der Dupuytren-Kontraktur abgrenzen.

1.8.1 Sklerodermie

Die Sklerodermie ist eine autoimmuninduzierte Multisystemerkrankung, die dem rheumatischen Formenkreis zugeordnet wird. Es wird eine zirkumskripte Sklerodermie ohne Beteiligung der Hände und der inneren Organe von der progressiven, systemischen Sklerodermie unterschieden. Die systemische Verlaufsform wird weiter untergliedert in eine diffuse Form mit generalisiertem Ödem, Sklerose und Beteiligung der inneren Organe sowie eine akrale, limitierte Verlaufsform (CREST-Syndrom; Calcinosis cutis, Raynaud-Syndrom, Ösophagusbeteiligung, Sklerodaktylie und Teleangiektasien). Infolge einer chronischen Entzündung kommt es zu einer gesteigerten Kollagensynthese, meist im Bereich der Akren. Der Überschuss an Kollagen führt in der Folge zur Fibrosierung der Haut, der Synovialmembran sowie diverser innerer Organe. Das klinische Bild der Sklerodaktylie im Rahmen eines CREST-Syndroms entsteht durch Sklerosierung und Schrumpfung der Haut und ist der Kamptodaktylie sehr ähnlich. Allerdings sind bei der Sklerodermie meist mehrere Finger von einer Beugekontraktur betroffen. Auch eine Sklerosierung der inneren Organe wird bei der Kamptodaktylie im Gegensatz zur Sklerodermie nicht beobachtet. Das Krankheitsbild der Sklerodermie beginnt häufig mit einer Raynaud-Symptomatik und diffusen Gelenk- und Muskelschmerzen und ist mit weiteren spezifischen Symptomen verbunden. So finden sich bei Sklerodermiepatienten häufig Mikronekrosen an den Fingerspitzen und Teleangiektasien im Gesicht. Diese Begleitsymptome sowie der serologische Nachweis von Autoantikörpern ermöglichen die differentialdiagnostische Abgrenzung der Sklerodermie zur Kamptodaktylie.

1.8.2 Morbus Dupuytren

Die Dupuytren-Kontraktur stellt eine Differentialdiagnose zur Kamptodaktylie und zur Sklerodermie dar. Die Ätiologie ist nicht bekannt, man geht jedoch davon aus, dass äußere Faktoren und Vererbung eine wesentliche Rolle spielen. Beim Morbus Dupuytren kommt es zu einer Bindegewebsproliferation in Form von Knoten und Strängen entlang der Palmaraponeurose der Hohlhand mit Verkürzung der Sehnen und Faszien. Durch diese Verkürzung entsteht eine Streckhemmung mit Beugekontraktur an den Fingern. Treten diese Veränderungen an der Plataraponeurose des Fußes auf, spricht man vom Morbus Ledderhose, die Manifestation am Penis mit konsekutiver Verkrümmung bezeichnet man als Morbus Peyronie.

Bei der Kamptodaktylie und den Dupuytren-Kontrakturen werden dermale Veränderungen in verschiedenen Formen beobachtet. Typische Hautindurationen und derbe, tastbare Knoten in der Hohlhand lassen sich beim Morbus Dupuytren, nicht jedoch bei der Kamptodaktylie feststellen. Daneben finden sich beim Morbus Dupuytren typischerweise subkutane Verdickungen über den dorsalen Anteilen der proximalen Interphalangealgelenke. Diese im Englischen als knuckle-pads (OMIM 149100) bezeichneten Verdickungen sind wesentlich seltener mit der Kamptodaktylie assoziiert. Zwischen den knuckle-pads und der Dupuytren-Kontraktur bestand nach Ansicht von McIndoe und Beare (1958) eine so enge Assoziation, dass sie die Anwesenheit von knuckle-pads diagnostisch mit einer sich entwickelnden Dupuytren-Kontraktur in Verbindung brachten.

Weitere wichtige differentialdiagnostische Kriterien sind das Manifestationsalter, die Geschlechterverteilung, der Verlauf der Krankheit und die Tatsache, dass bei der Kamptodaktylie nur ein Finger von einer Beugekontraktur betroffen ist, während sowohl bei der Sklerodermie als auch bei der Dupuytren-Kontraktur mehrere Finger beteiligt sind. Des Weiteren ist der Morbus Dupuytren typischerweise eine Erkrankung des Mannes, Männer sind im Vergleich zu Frauen dreimal häufiger betroffen (Hu et al. 2005), während die Kamptodaktylie kongenital ist oder in der frühen Kindheit entsteht und dabei eine deutliche Gynäkotropie zeigt (Schallreuter und Reimlinger 1993) (Tab. 1-2).

Tabelle 1-2: Differentialdiagnostische Kriterien der Kamptodaktylie

	Kamptodaktylie	**Morbus Dupuytren**	**Sklerodermie**
Alter	frühe Kindheit	Erwachsenenalter	Erwachsenenalter (<50 a)
Geschlecht	♀ > ♂	♀ < ♂	♀ > ♂
Lokalisation	Hände v. a. Kleinfinger	Hände Füße und Penis	Hände, Gesicht, Magen-Darm, Lunge, Niere, Herz, Gelenke
Symptomatik	Beugekontraktur der Finger ohne Veränderung des Bindegewebes, meist proximales Interphalangealgelenk	Beugekontraktur der Finger, Veränderungen des Bindegewebes, auch Metacarpophalangealgelenke	Sklerodaktylie, Raynaud-Symptomatik, besonders zu Beginn Mikronekrosen, weitere Organe von Sklerosierung betroffen
Diagnostik	klinisch	klinisch	serologisch, Auto-AK
Therapie	symptomatisch ggf. operativ	ggf. operativ	symptomatisch medikamentös

(a = Jahre, ♀ = weiblich, ♂ = männlich, Auto-AK = Autoantikörper)

1.9 Kandidatengene für Kopplungsanalysen

Als Kandidatengen kann allgemein jedes Gen bezeichnet werden, das aufgrund einer bekannten Eigenschaft an der Auslösung einer Krankheit oder der Ausprägung eines Symptoms beteiligt sein kann.

Die Kamptodaktylie ist eine klinisch heterogene Fingeranomalie. Da zwischen isolierter und syndromaler Form sowie früher und später Form unterscheiden wird, liegt die Vermutung nahe, dass Mutationen in verschiedenen Genen zur Ausprägung einer Kleinfingerkontraktur im Sinne einer Kamptodaktylie führen können (genetische Heterogenität).

Bislang konnte kein Gen für die isolierte Form der Kamptodaktylie lokalisiert werden. Für die syndromale Form mit dem Phänotyp Jacobs-Syndrom hingegen wurde mit dem *PRG4*-Gen (OMIM 604283) bereits ein Gen identifiziert. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass dieses Gen auch an der Pathogenese einer isolierten Form der Kamptodaktylie beteiligt ist, ist es als Kandidatengen einzustufen.

Die Gene *SDTY1*, *HOXD13* sowie der Locus ZD1 sind ebenfalls als Kandidatengene zu bewerten. Diese Gene sind assoziiert mit unterschiedlichen Formen der Syndaktylie. Es ist nicht auszuschließen, dass an diesen Loci weitere Gene liegen, die an der Entwicklung der Hände oder der Ausbildung einer anderen Fingeranomalie beteiligt sind.

Die Gene *KLF6* und *KRT9* stellen aufgrund der mit ihnen assoziierten Phänotypen Kandidatengene dar. Beide Krankheitsbilder können zu Kleinfingerkontrakturen führen, die dem Phänotyp der Kamptodaktylie ähnlich sind.

Ein Nukleotidpolymorphismus am nicht translatierten 3'-Ende des *KLF6*-Gens ist assoziiert mit dem Morbus Dupuytren. An Position 1140 kommt es zu einem Austausch von Adenin (Allel A) durch Guanin (Allel G). Eine Fall-Kontrollstudie mit 138 Personen mit Dupuytren-Kontraktur sowie 255 Kontrollen hat gezeigt, dass Personen mit dem Allel G (Guanin an Position 1140) gegenüber Personen mit dem Allel A (Adenin an Position 1140) ein erhöhtes Risiko aufweisen, eine Dupuytren-Kontraktur zu entwickeln (Odds Ratio = 1.9; Konfidenzintervall 95%; Bayat et al. 2003, a).

Mutationen im *KRT9*-Gen führen zur hereditären Palmoplantarkeratose. Bei dieser Erkrankung kommt es zu einer Hyperkeratose der Haut im Bereich der Handflächen und Fußsohlen. Diese Hyperkeratose kann in schweren Fällen zu Kontrakturen an Händen und Füßen führen (OMIM 144200).

In Abbildung 1-2 und Tabelle 1-3 sind die Kandidatengene im Überblick dargestellt.

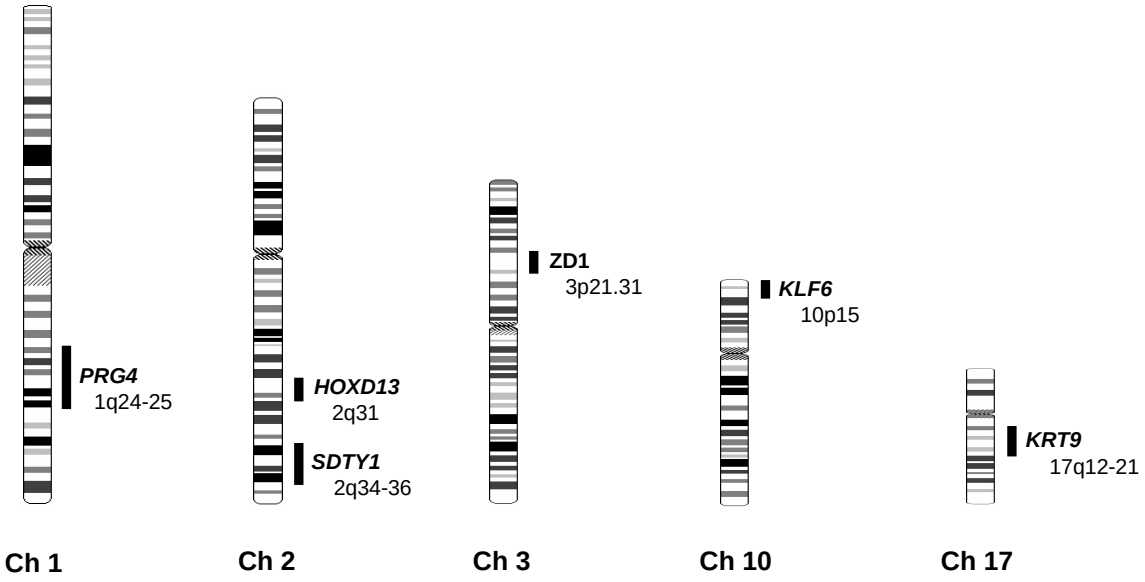

Abbildung 1-2: Kandidatengene

Tabelle 1-3: Kandidatengene

Lokalisation	Gen	Protein	Funktion/Phänotyp	Referenz Lokalisation
1q24-25	*PRG4*	Proteoglykan 4	**Funktion:** Megakaryozytenstimulierender Faktor, produziert von Chondrozyten in Gelenkknorpeln **Phänotyp:** Jacobs-Syndrom	Marcelino et al. (1999)
2q31	*HOXD13*	HOXD 13	**Phänotyp:** Synpolydaktylie	Muragaki et al. (1996)
2q34-36	*SDTY1*	?	**Phänotyp:** Syndaktylie Typ I	Bosse et al. (2000)
3p21.31	?	?	**Phänotyp:** Zygodaktylie	Malik et al. (2005)
10p15	*KLF6*	ZF 9	**Funktion/Phänotyp:** Transkriptionsfaktor, polymorphes Gen mit Allelen A und G. Das G-Allel ist assoziiert mit erhöhtem Risiko für Morbus Dupuytren (Odds Ratio = 1.9, Konfidenzintervall 95%)	Bayat et al. (2003 a)
17q12-21	*KRT9*	Keratin 9	**Funktion:** Intermediärfilament in Epidermiszellen von Hand- und Fußsohlen **Phänotyp:** Hereditäre Palmoplantarkeratose	Reis et al. (1992)

(? = nicht bekannt)

1.10 Fragestellung in der vorliegenden Arbeit

Die Aufgabe dieser Arbeit war es, in einer großen Familie mit einer nicht syndromalen, isolierten Kamptodaktylie mit autosomal dominantem Erbgang den Phänotyp mittels Kopplungsanalysen im Genom zu lokalisieren. Bei einer Kopplungsanalyse liegt der statistische Grenzwert für den Nachweis einer Kopplung zum Phänotyp bei $Z = 3.00$ bei einem Rekombinationswert von $\theta = 0.00$. Daher sollte zunächst eine LOD-Wert-Simulation erfolgen. Diese sollte zeigen, ob ein LOD-Wert nahe $Z = 3.00$ bei einem Rekombinationswert von $\theta = 0.00$ für den Stammbaum der Familie mit allen zum Zeitpunkt der Studie zur Verfügung stehenden Personen erreicht werden kann.

Da kein Anhalt für die Lokalisation des Krankheitslocus im Genom bestand, sollte in dieser Arbeit ein Kandidatengenansatz gewählt werden. Dieser Ansatz machte eine Literaturrecherche nach Kandidatengenen erforderlich, die eine Assoziation zu Phänotypen mit Fingeranomalien und Fingerkontrakturen zeigen. Für den Fall, dass die Testung dieser Kandidatengene keinen Hinweis auf die Lokalisation des symptom-verursachenden Gens in der Familie bringen sollte, sollten im Anschluss die Chromosomen, auf denen die Kandidatengene lokalisiert sind, insgesamt auf Kopplung getestet werden.

Für die Genotypisierung sollten Mikrosatellitenmarker in einem durchschnittlichen Intermarkerintervall von 10 cM auf den zu testenden Chromosomen ausgesucht werden. Mikrosatelliten sollten als genetische Marker eingesetzt werden, da diese aufgrund ihrer hohen Heterozygotie sowie ihrer großen Anzahl im Genom besonders gut für die Durchführung von Kopplungsanalysen geeignet sind.

Die mit der Methode der Polymerasekettenreaktion amplifizierten DNA-Fragmente der Mikrosatellitenmarker sollten in einem DNA-Sequenzierer nach ihrer Länge aufgetrennt und mittels GeneScan-Methode analysiert werden. Die Genotypdaten der Mikrosatellitenmarker sollten dann in Kopplungsanalysen auf Kopplung zur Kamptodaktylie in der Familie getestet werden.

Die statistische Auswertung der Kopplungsanalysen sollte mit den in der Humangenetik üblichen Computerprogrammen LINKAGE, MEGA2 und SIMWALK2 erfolgen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte und Zubehör

ABI Prism 377® DNA-Sequenzierer	Applied Biosystems, USA
Autoklav	Grössner, Hamburg
Milli-Q-Filtereinheit	Spectrum Laboratories
Magnetrührer IKAmag RH	Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik, Staufen
Mikrowellenofen	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe
pH-Meter	Schott, Hofheim
Photometer GeneQuant pro	Pharmacia Biotech, Cambridge, England
Präzisionswaage 2254	Sartorius, Göttingen
Rolator GFL 3025	GFL, Burgwedel
Thermoblock Techne DB 3	Kobe, Marburg
Vortex MS2 Minishaker IKA	Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik, Staufen

Zentrifugen:

Biofuge 13	Heraeus, Hanau
Kühlzentrifuge Sorvall RT 6000	Du Pont, Dreieich
Kühlzentrifuge Eppendorf 5415R	Eppendorf, Hamburg
Labofuge 400	Heraeus, Hanau
Sorvall RT 6000B	Du Pont, Dreieich
Sorvall GLC-2B	Du Pont, Dreieich

Spritze/Filter:

50 ml Luer-Lok Spritze	Becton Dickinson, Drogheda, Irland
Millex-GS 0.22 µm	Millipore, Billerica, Mass., USA

Gelelektrophorese:

Gelkammer BRL Series 1025	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
Elektrophoresis Power Supply PS 9009	Gibco BRL, Gaithersburg, USA

Geldokumentation:

Gel Documentation System E.A.S.Y. RH-3	Herolab, St. Leon Rot, Wiesloch
Transilluminator	Ultra-Violet Products
Transilluminator UVT-40M	Herolab, St. Leon Rot, Wiesloch
Digital Graphic Printer Sony UP-D895	Sony, Tokyo, Japan

Thermocycler:

GeneAmp PCR System 2400	Applied Biosystems, USA
GeneAmp PCR System 9600	Applied Biosystems, USA
iCycler™ Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Wasserbäder:

Wasserbad Typ 3042	Köttermann, Hänigsen
Wasserbad Typ 1083	GFL, Burgwedel

Reaktionsgefäße:

Falcon Tubes (50 ml)	Falcon, USA
Falcon Tubes (15 ml)	Falcon, USA
Micro Test Tubes (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Micro Test Tubes (0,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Micro PCR Strip-tubes	Star Lab, Ahrensburg

Pipetten (-spitzen):

Eppendorf Reference (10, 20, 100, 200, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf-Multikanal-Pipette 12	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
Biosphere Quality Tips (10, 200 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Natural Pipette Tips (101-1250 µl)	Star Lab, Ahrensburg

2.1.2 Chemikalien und Lösungen

2.1.2.1 DNA-Extraktion

RCLB-Puffer	10 mM Tris 5 mM MgCl2 10 mM NaCl; pH 7,6, mit HCL einstellen
SE-Puffer	75 mM NaCl 25 mM EDTA; pH 8,0 mit NaOH einstellen
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA; pH 8,0 mit 1 M HCL einstellen
SDS 10%	SDS, H_2O

2.1.2.2 PCR-Reagenzien

Taq-DNA-Polymerase	PeqLab, Erlangen
dNTPs	Clontech, USA
HPLC-H_2O	
10x PCR-Puffer	PeqLab, Erlangen
$MgCl_2$ (25 mM)	PeqLab, Erlangen
Formamid	
DMSO (Dimethylsulfoxid)	

2.1.2.3 Fertigsysteme (Kits)

Ready-To-Go PCR Beads	Amersham Pharmacia Biotech, USA
QIAquick PCR Purification kit	Quiagen, Hilden

2.1.2.4 Oligonukleotidprimer

Die Primer für die DNA-Amplifikation der Mikrosatellitenmarker wurden von den Firmen SIGMA-Genosys (England) und GENSET (Frankreich) bezogen. Die optimale Annealingtemperatur wurde mit der Onlinesoftware Primer3 errechnet und auf einem Gradientencycler getestet. Die Primersequenzen und erforderlichen Daten über Lokalisation, Allelgrößen, Heterozygotie und Allelfrequenz wurden der Onlinedatenbank des Marshfield Medical Center und der Genome Database entnommen (Tab. 2-4). Alle Primer sind am 5'-Ende mit einem der Fluoreszenzfarbstoffe 6-FAM, TET oder HEX markiert. Den Tabellen 9-1 bis 9-5 können die Sequenzen der Oligonukleotidprimer entnommen werden.

2.1.2.5 Ladepuffer

6x Agarosegel	15 % (w/v) Ficoll 0,05 % Bromphenolblau 0,05 % Xylencyanol
GeneScan	Dextran (blau), EDTA, Formamid (Applied Biosystems, Warrington, UK)

2.1.2.6 DNA-Größenstandards

50 bp DNA-Größenstandard	Gibco BRL, Eggenstein
100 bp DNA-Größenstandard	Gibco BRL, Eggenstein
GeneScan™ 500 TAMRA	Applied Biosystems, Warrington, UK

2.1.2.7 Agarosegel

Agarose Ultra Qualität
EtBr (Ethidiumbromid)

2.1.2.8 Polyacrylamid-Harnstoffgel

Long Ranger XL Gel Solution	Cambrex Bio Science Rockland Inc., USA
Harnstoff	
Rotiphorese 10x TBE Puffer	
APS (Ammoniumpersulfat 10%)	
TEMED (Tetramethylendiamid)	Serva Reinbiochemica, Heidelberg

2.2 Methoden

2.2.1 Labormethoden

Die Abbildung 2-1 gibt einen Überblick über die Abfolge der Arbeitsschritte von der Vorbereitung bis zur Durchführung der Kopplungsanalysen.

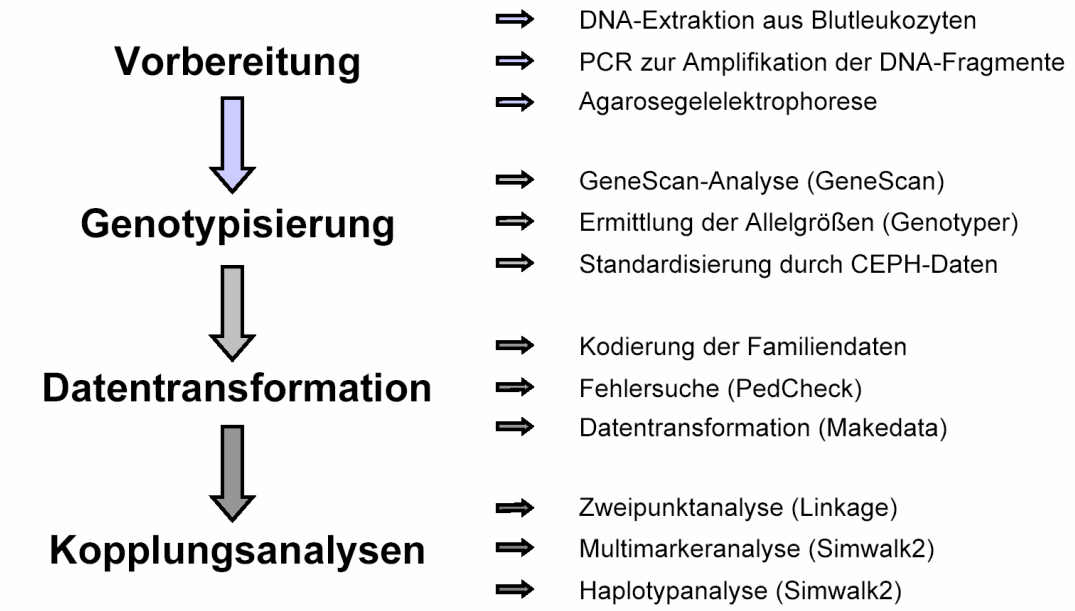

Abbildung 2-1: Abfolge der Arbeitsschritte einer Kopplungsanalyse
In Klammern stehen die angewendeten Softwareprogramme

2.2.1.1 DNA-Extraktion aus Blutleukozyten

Die Extraktion der DNA aus zellkernhaltigen Blutleukozyten wird nach der Standard-Aussalzmethode durchgeführt (Miller et al. 1988). Nach Entfernung der zellkernlosen Erythrozyten werden die Leukozyten lysiert. Anschließend werden die freigesetzten Proteine unter Einwirkung des Enzyms Pronase und dem anionischen Detergens SDS abgebaut. Danach kann die DNA durch alkoholische Aufreinigung isoliert und ausgefällt werden.

Zur Extraktion der DNA aus Leukozyten wird 10 ml venöses EDTA-Blut mit 30 ml kaltem Red-cell-lysis-buffer (RCLB) versetzt und 15 Minuten lang auf Eis inkubiert, um die kernlosen Erythrozyten durch osmotischen Schock zu lysieren. Durch die anschließende zehnminütige Zentrifugation bei 4°C und 3000 rpm sedimentieren die nicht lysierten Leukozyten. Die im Überstand gelösten und zerstörten Erythrozyten werden verworfen. Das Sediment wird mit 25 ml RCLB-Puffer resuspendiert und für weitere 10 Minuten bei 4°C und 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen

und ein Zellpellet bleibt zurück. Diesem setzt man 5 ml SE-Puffer, 2,5 µl Pronase (Proteinase K) sowie 500 µl 10%ige SDS-Lösung zu.

Der Ansatz wird im Schüttelwasserbad bei 55°C für drei Stunden oder bei 37°C über Nacht inkubiert, um eine möglichst vollständige Lyse der Leukozyten zu erreichen. Die freigesetzten Proteinbestandteile der Zellen werden durch Zugabe von 2,5 ml 5 M NaCl sowie kurzes Vortexen dehydriert und ausgefällt. Durch zehnminütige Zentrifugation bei Raumtemperatur und 3000 rpm sedimentieren diese. Im Überstand verbleibt die gelöste DNA. Durch Dekantieren in ein neues Falconröhrchen und Zugabe von 40 ml eiskaltem Ethanol (96%) wird die DNA gefällt. Sie erscheint als weißes Fadenknäuel, das mit einer sterilen Pasteurpipette entnommen, erneut in Ethanol (70%) gewaschen und anschließend in 300 bis 600 µl TE-Puffer auf einem Rolator für 12 bis 24 Stunden bei 4°C gelöst wird. Die Lagerung der genomischen DNA erfolgt ebenfalls bei 4°C.

2.2.1.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von DNA wird mit einem Spektralphotometer gemessen. Doppelsträngige DNA mit einer Dichte von 50 ng/µl besitzt bei 260 nm Wellenlänge eine Extinktion von 1 (Sambrook et al. 1989). Die Konzentration der gemessenen DNA kann also folgendermaßen berechnet werden:

[DNA (µg/ml)] = E_{260} x 50 x Verdünnungsfaktor (µg/ml)

Die DNA wird über einen Wellenlängenbereich von 200-300 nm gemessen. Eine mögliche Verunreinigung durch Proteine wird durch Ermittlung des Absorptionsmaximums bei 280 nm festgestellt. Der Quotient aus E_{260} und E_{280} ist ein Maß für die Verunreinigung der DNA, er sollte zwischen 1,8 und 1,9 liegen. Ein Wert größer 1,95 weist auf RNA-Rückstände hin, ein Wert kleiner 1,7 auf Proteinverunreinigungen.

2.2.1.3 Polymerasekettenreaktion

Die DNA-Fragmente der Mikrosatellitenmarker werden mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Mit dem PCR-Verfahren kann definierte Ziel-DNA in relativ kurzer Zeit in vitro vervielfältigt werden (Mullis 1985). Hierzu benötigt man Oligonukleotidprimer, die komplementäre Sequenzen zu den Randbereichen der zu amplifizierenden DNA-Region aufweisen. Nach Hybridisierung der Primer an die einzelsträngige DNA (Matrize) kann eine hitzestabile DNA-Polymerase die dem Ansatz zugefügten Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) entsprechend dem Matrizenstrang aneinanderfügen (Elongation). Die neu synthetisierten Stränge stehen im nächsten Zyklus wieder als Matrize zur DNA-Synthese zur Verfügung. Auf diese Weise können in 30 Zyklen etwa 10^5 Kopien der gewünschten DNA-Zielsequenz synthetisiert werden. Die PCR kann mit industriellen PCR-Beads (*Taq*-Polymerase, dNTPs, Pufferionen)

oder mit einem Standardansatz (Tab. 2-1) durchgeführt werden. Zur Optimierung der PCR-Reaktion können Zusätze wie DMSO oder Formamid eingesetzt werden.

Bei einer PCR wird zunächst der DNA-Doppelstrang bei 94°C in beide Einzelstränge aufgetrennt (Denaturierung). Anschließend erfolgt die Hybridisierung der Primer an die Matrize. Die Temperatur dieses auch als Annealing bezeichneten Schrittes ist abhängig von der Primersequenz. Die Annealingtemperatur kann anhand der Onlinesoftware Primer3 errechnet oder in einem Gradientencycler experimentell ermittelt werden. Ausgehend von den Primern synthetisiert die DNA-Polymerase bei 72°C die komplementären Stränge in 5'→3'-Richtung (Elongation). Dieser Zyklus aus Denaturierung-Hybridisierung-Elongation wird 28-35 mal wiederholt. Schließlich erfolgt eine Abschlusssynthese bei 72°C für 5 Minuten, um die vollständige Polymerisierung aller DNA-Fragmente sicherzustellen (Tab. 2-2).

Tabelle 2-1: Reaktionsansatz einer Standard-PCR

HPLC-H_2O	Puffer (10x)	$MgCl_2$ (25 mM)	dNTPs (0,125 µl)	*Taq*-Polymerase (5 U/µl)	Primer* (5 pM/µl)	DNA (50 ng/µl)
19,25 µl	2,5 µl	1 µl	0,125 µl	0,125 µl	1 µl	1 µl

(*Mix aus Vorwärts- und Rückwärtsprimern)

Tabelle 2-2: Reaktionsschritte einer Standard-PCR

Reaktionsschritt	Temperatur ℃	Dauer	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	94 ℃	5 min.	1
Denaturierung	94 ℃	15 sec.	28-35
Hybridisierung	52-64 ℃	15 sec.	
Elongation	72 ℃	30 sec.	
Elongation	72 ℃	5 min.	1

2.2.1.4 Standard-PCR-Bedingungen

PCR-Reaktionsansätze werden auf Eis pipettiert, um vorzeitige, unspezifische Syntheseschritte durch die *Taq*-Polymerase zu vermeiden. Bei jeder PCR sollte ein Leerwert mitgeführt werden. Der Leerwert ist ein Ansatz ohne DNA-Zugabe und somit ein Indikator für die mögliche Kontamination des Reaktionsansatzes mit fremder DNA. Die Amplifikation der Reaktionsansätze erfolgt in Thermocyclern mit beheizbarem Deckel. Dies verhindert die Kondensation der Reagenzien.

2.2.1.5 Agarosegelelektrophorese und Fotodokumentation

Die quantitative Darstellung der DNA-Fragmente aus den PCR-Reaktionen erfolgt in 2%igen Agarosegelen. Als Laufpuffer wird 0,5x TBE verwendet. Die PCR-Produkte

werden vor dem Auftragen mit Ladepuffer vermischt, um später die Laufweite im Gel abschätzen zu können. Zur Überprüfung der richtigen Produktgröße wird ein Größenstandard mitgeführt.

Vor dem Gießen werden die Gele mit Ethidiumbromid (EtBr) versetzt, um die DNA unter UV-Licht sichtbar machen zu können. Hierzu setzt man 2 µl der EtBr-Stammlösung (10 mg/ml) auf 100 ml Agarosegel ein. Zur Dokumentation werden die Gele unter UV-Licht digital fotografiert, die Verwaltung der Bilder erfolgt dann mit der Software EasyWin 32 (Herolab).

2.2.1.6 GeneScan-Analyse

Die Fragmentlängenanalyse der fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente erfolgt mithilfe eines DNA-Sequenzierers (ABI Prism 377®), welcher an einen MacIntosh-Computer angeschlossen ist. Dieser DNA-Sequenzierer wird durch die Software GeneScan (Version 3.1.2) gesteuert. Aus den ermittelten Rohdaten können mithilfe der Software Genotyper (Version 2.0) die korrekten Allellängen (Genotypdaten) berechnet werden.

Als Matrix wird ein denaturierendes Harnstoff-Polyacrylamid-Gel (7%) verwendet. Analysiert werden für jeden Mikrosatellitenmarker elf Patientenproben sowie eine Referenzprobe. Als Referenzwert dient die DNA einer Person aus der CEPH-Datenbank. Die CEPH-Datenbank (Centre d'Etude du Polymorphism Humain, Frankreich) hält genomische DNA mit bekannten Genotypdaten für genetische Studien bereit. Dies ermöglicht die Standardisierung von Allelgrößen. Zur semiautomatischen Größenbestimmung der PCR-Produkte wird der interne Längenstandard TAMRA^{500} mitgeführt.

Um möglichst viele Mikrosatellitenmarker gleichzeitig zu testen, wird die Multiplex-Methode eingesetzt. Bei dieser Methode trennt man zur optimalen Ausnutzung der Gelkapazität mehrere PCR-Produkte in der gleichen Gelspur auf. Es ist hierbei jedoch darauf zu achten, dass die PCR-Produkte eine Größendifferenz von mindestens 20-30 bp aufweisen und mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Diesen Vorgang bezeichnet man als Pooling. Zum Beladen des Gels stehen Sägezahnkämme mit 48 Zacken zur Verfügung. Werden zwölf DNA-Proben analysiert, können vier Pools mit jeweils drei bis vier Markern gebildet werden. Somit können pro GeneScan-Lauf bis zu 16 Marker gleichzeitig analysiert werden.

Bei der GeneScan-Analyse fährt ein Argonlaser in konstantem Abstand über das Gel und regt die Fluoreszenzfarbstoffe der Primer an, die daraufhin Licht unterschiedlicher Wellenlänge emittieren. Die Verwendung eines hochauflösenden Gels ermöglicht dabei die Fragmentlängenauswertung mit der Präzision einer Base. Die Fluoreszenzdaten werden von einem MacIntosh-Computer digitalisiert und zur weiteren Auswertung

gespeichert (GeneScan-Software). Die anschließende Auswertung der Daten erfolgt mit der Software Genotyper. Dieses Programm transformiert die DNA-Fragmente des Gelbildes aus dem GeneScan-Lauf in Elektropherogramme und unterdrückt Störsignale fehlerhafter PCR-Produkte. Dies erleichtert die Interpretation der DNA-Fragmente und die Bestimmung der exakten Allellängen. Die ermittelten Genotypdaten werden vom MacIntosh-Computer (MacOs-Betriebssystem) auf einen PC (Windows-Betriebssystem) importiert und mit der Software Excel verwaltet und gespeichert. Abbildung 2-2 zeigt exemplarisch die DNA-Fragmente des Tetranukleotidmarkers D1S1592 (GeneScan-Software) und die entsprechenden Elektropherogramme der DNA-Fragmente 1 – 6 (Genotyper Software).

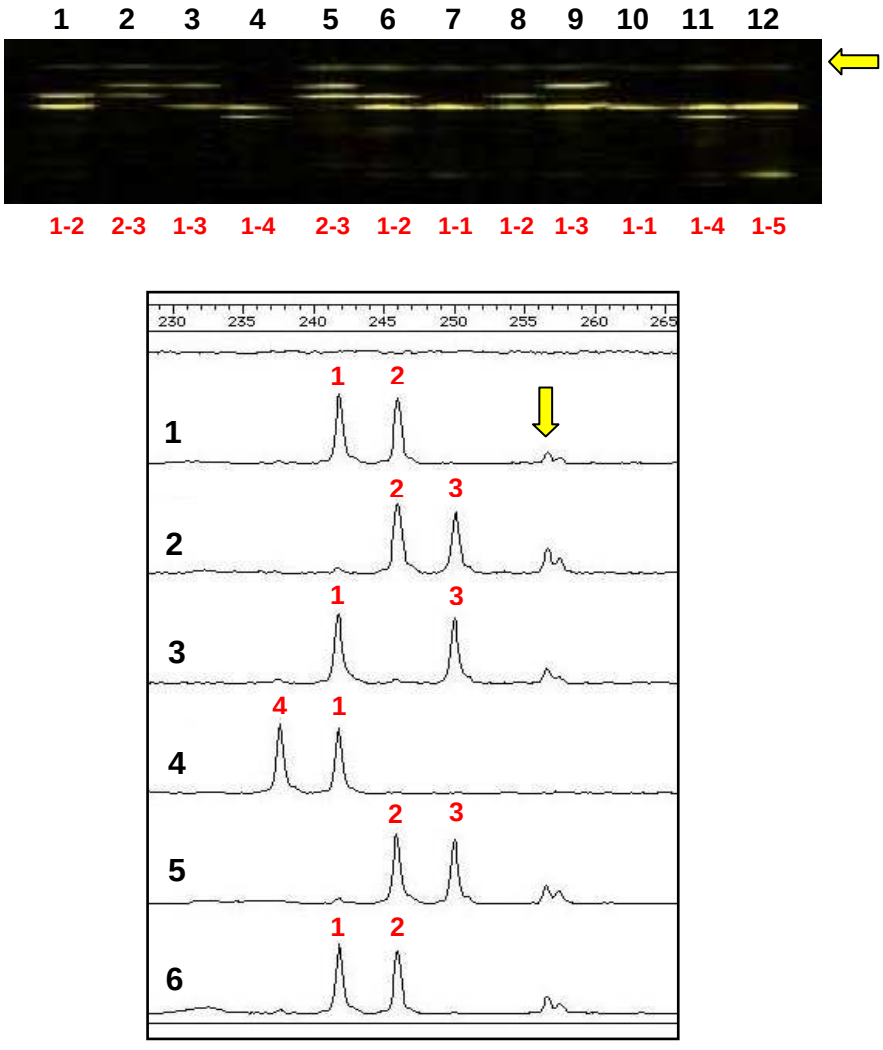

Abbildung 2-2: DNA-Fragmente und Elektropherogramme des Tetranukleotidmarkers D1S1592
Oben: DNA-Fragmente von 12 DNA-Proben in einem mit der Software GeneScan erstellten Gelbild. Die gelben Pfeile zeigen unspezifische Artefakte.
Unten: Elektropherogramme der DNA-Proben 1-6 (schwarze Zahlen). Allele werden als einstellige Ziffern kodiert (rot). Fehler bei der Amplifikation der PCR-Produkte stellen sich als Artefakte dar (gelbe Pfeile). Diese sind aufgrund ihrer unterschiedlichen Höhe und Morphologie klar von den Allelen abzugrenzen (Software Genotyper)

2.2.1.7 Vorbereitung der Daten für die Kopplungsanalysen

Als Eingabedatei für die Kopplungsanalysen benötigt man eine Datei, die die Genotypdaten und Familiendaten kombiniert. Unter Familiendaten werden die Verwandtschaftsbeziehungen der Familienmitglieder zueinander sowie Geschlecht und Krankheitsstatus (betroffen oder nicht betroffen) zusammengefasst. Diese Daten werden in Form von Ziffern verschlüsselt. Für die Datentransformation durch die Software MAKEDATA wird folgende Kodierung benötigt:

- Kodierung der Individuen (Spalte D); diese werden entsprechend der Anordnung im Stammbaum fortlaufend durchnummeriert
- Kodierung der Eltern (Spalte E und F) ergibt sich aus Spalte D (0 = unbekannt)
- Geschlecht: ♂ = 1; ♀ = 2; unbekannt = 0 (Spalte G)
- Status: nicht betroffen = 1; betroffen = 2; unbekannt = 0 (Spalte H)
- Genotypdaten exemplarisch für zwei Mikrosatellitenmarker (D10S1435, D10S189) von Chromosom 1 (Spalten I bis L)

In Abbildung 2-3 ist eine mit der Software Excel erstellte Eingabedatei abgebildet.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1													
2		**Eingabedatei**											
3													
4													
5	Nummer	Name	**Familie**	**Individuum**	**Vater**	**Mutter**	**Geschlecht**	**Status**	D10S1435		D10S189		
6	1		1	101	0	0	1	1	0	0	0	0	
7	2		1	102	0	0	2	1	0	0	0	0	
8	3		1	201	0	0	1	1	0	0	0	0	
9	4		1	202	101	102	2	2	0	0	0	0	
10	5		1	203	101	102	2	2	0	0	0	0	
11	6		1	204	101	102	1	2	0	0	0	0	
12	7	*******	1	301	0	0	1	1	262	262	181	185	
13	8	*******	1	302	201	202	2	2	258	258	181	181	
14	9	*******	1	303	201	202	2	2	258	258	179	181	
15	10		1	304	0	0	1	1	0	0	0	0	
16	11	*******	1	305	204	205	1	2	258	258	179	185	
17	12		1	306	0	0	2	1	0	0	0	0	
18	13	*******	1	401	0	0	1	1	0	0	0	0	
19	14	*******	1	402	301	302	2	2	258	262	181	185	
20	15	*******	1	403	301	302	1	2	258	262	181	181	
21	16	*******	1	404	0	0	2	1	262	266	181	185	
22	17	*******	1	405	304	303	2	0	258	262	181	181	
23	18		1	406	305	306	1	1	0	0	0	0	
24	19		1	407	305	306	1	1	0	0	0	0	
25	20	*******	1	501	401	402	1	1	262	266	181	185	
26	21	*******	1	502	401	402	2	2	258	262	185	185	
27	22	*******	1	503	403	404	1	1	262	262	181	181	
28	23	*******	1	504	403	404	2	2	0	0	0	0	
29	24		1	205	0	0	2	0	0	0	0	0	
30													

Abbildung 2-3: Eingabedatei für die Kopplungsanalysen
Die Spalten C-H zeigen die in Ziffern kodierten Familiendaten. In den Spalten I-L sind exemplarisch die Genotypdaten für die Marker D10S1435 und D10S189 dargestellt

2.2.2 Statistische Methoden

2.2.2.1 Genetische Marker

Als genetischer Marker kann jede beliebige DNA-Sequenz mit bekannter Lokalisation dienen, die nach Mendelschen Regeln vererbt wird. Die Informativität eines Markers ist abhängig von der Anzahl der beobachteten Allele (Polymorphismus) und der Verteilung in der getesteten Population (Allelfrequenz). Je mehr Allele ein Marker aufweist und je gleichmäßiger diese in der Population verteilt sind, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein Individuum heterozygot und die Meiose informativ ist.

2.2.2.2 Zweipunktanalyse und Berechnung der LOD-Werte

Um das Krankheitsgen zu lokalisieren oder zumindest auf eine Kandidatenregion einzugrenzen, bedient man sich der Kopplungsanalyse. Dazu wird die Segregation der Markerallele im Stammbaum untersucht und statistisch geprüft, ob eine Kopplung des Markers zum Phänotyp vorliegt. Liegen Marker und Krankheitslocus nah beieinander, ist die Wahrscheinlichkeit gering, dass sie durch eine Rekombination getrennt werden, sie werden gekoppelt vererbt ($\theta = 0.00$). Die Rekombinationsrate θ ist definiert als die Wahrscheinlichkeit einer Rekombination zwischen zwei Loci. Je weiter zwei Loci auf einem Chromosom voneinander entfernt liegen, um so größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass sie durch ein Crossing-over-Ereignis während der Meiose getrennt werden. Liegen zwei Loci nicht synthän, befinden sich also auf unterschiedlichen Chromosomen, so rekombinieren sie frei und die Rekombinationsrate erreicht einen maximalen Wert von $\theta = 0.50$.

Anhand der Höhe des LOD-Werts Z ist es möglich, eine Aussage darüber zu treffen, ob eine Kopplung vorliegt, ausgeschlossen ist oder ob keine genaue Aussage über eine Kopplung getroffen werden kann. Der von Morton 1955 eingeführte LOD-Wert Z wird berechnet als Logarithmus der Chancen, dass bestimmte Loci eher gekoppelt als ungekoppelt vorliegen.

In kleinen Stammbäumen ist es häufig nicht möglich, bei Kopplung einen signifikanten LOD-Wert von 3.00 ($\theta = 0.00$) oder höher zu erreichen. Von Vorteil ist hier die Möglichkeit, Kopplungsergebnisse aus zwei oder mehreren kleinen Familien mit identischem Phänotyp und Vererbungsmuster zusammenzurechnen. Die Gesamtwahrscheinlichkeit berechnet sich als Produkt aus den Wahrscheinlichkeiten jeder einzelnen Familie. Da LOD-Werte logarithmisch sind, kann durch Addition der nichtsignifikanten LOD-Werte ein signifikanter LOD-Wert erreicht werden.

Bei der Berechnung der LOD-Werte werden wie bei anderen statistischen Testverfahren zwei Hypothesen aufgestellt. Nach der Nullhypothese H_0 werden Marker und Erkrankung voneinander unabhängig vererbt, während sie nach der Alternativhypothese H_1 gekoppelt vererbt werden:

$$H_0: \theta = 0{,}5$$
$$H_1: \theta < 0{,}5$$

Die Wahrscheinlichkeit für das Zutreffen jeder Hypothese errechnet sich als Wahrscheinlichkeit, mit der bei ihrer Gültigkeit die Beobachtungsdaten zu erwarten sind:

$$L(H0) = L(\theta = 0{,}5) = P(\text{Daten} \mid H0)$$
$$L(H1) = L(\theta = \theta 1) = P(\text{Daten} \mid H1)$$

Daraus wird die relative Kopplungswahrscheinlichkeit (R = Odds Ratio) gebildet:

$$R = L(H1) / L(H0)$$

Der dezimale Logarithmus von R ist der LOD-Wert Z (Z = Logarithm of the Odds Ratio; Morton 1955):

$$Z(\theta_1) = \log_{10}(R)$$

Trifft die Nullhypothese zu und Marker- und Krankheitslocus werden unabhängig voneinander vererbt, ist die Wahrscheinlichkeit für Kopplung und Nichtkopplung gleich groß und der LOD-Wert gleich Null:

$$\theta = 0{,}5$$
$$\Rightarrow L(H1) = L(H0) = L(\theta = 0{,}5)$$
$$Z(\theta 1) = \log_{10}(L(H1)/L(H0)) = \log_{10}(1) = 0$$

Wenn dagegen H_1 zutrifft und Marker und Krankheitsgen gekoppelt vererbt werden, wird $L(H_1) > L(H_0)$ und $Z(\theta_1)$ nimmt größere Werte an.

Die LOD-Werte werden für Rekombinationsraten zwischen 0 und 0,5 berechnet. Um über Annahme oder Ablehnung der Hypothesen zu entscheiden, sind statistische Grenzwerte für Z festgelegt.

- Wenn $Z_{max} > 3.00$ ist, wird das Testergebnis für signifikant erklärt und die Nullhypothese kann verworfen werden (Morton 1955). Das entspricht einem Wahrscheinlichkeitsverhältnis Kopplung : Nichtkopplung von 1000 : 1, d.h. es ist tausendmal wahrscheinlicher, die gegebenen Daten zu erhalten, wenn H_1 zutrifft, als wenn H_0 zutrifft. Die Zahl dieses Werts ergibt sich aus der gewünschten Falschpositiv-Rate von 5% und der Berücksichtigung A-priori-Wahrscheinlichkeit, mit der zwei zufällig ausgewählte Loci gekoppelt vorliegen. Sie wird auf 1 : 50 geschätzt, sodaß nur noch ein Verhältnis von 20 : 1 für Kopplung resultiert, was dem üblichen Grenzwert für Signifikanz ($\alpha = 0{,}05$) entspricht (Ott 1991).

- Ist $Z_{max} < -2.00$, muss die Kopplungshypothese verworfen werden.

- Für Werte von Z_{max} zwischen –2.00 und +3.00 sind keine Aussagen möglich.

2.2.2.3 Multimarkeranalyse

Bei der Multimarkeranalyse werden gleichzeitig mehrere Marker getestet und die Daten von mehr als zwei Loci analysiert. Ein solcher Block von Markerallelen wird auch als Haplotyp bezeichnet. Haplotypen eng benachbarter Marker können wie Allele eines einzelnen hochpolymorphen Locus behandelt werden. Dadurch lässt sich die Informativität der Marker stark erhöhen. Der wichtigste Unterschied zur Zweipunktanalyse besteht darin, dass die Reihenfolge der Marker und ihre Abstände zueinander eine wichtige Rolle spielen. Das Ergebnis der Multimarkeranalyse ist eine Kurve von LOD-Werten, die gegen die Kartenposition (cM) aufgetragen werden. Die LOD-Werte werden für jeden möglichen Locus des Krankheitsgens berechnet. Wenn Marker mit dem Krankheitslocus rekombinieren, werden die LOD-Werte hier stark negativ. Der höchste Punkt der erstellten Ergebniskurve zeigt die wahrscheinlichste Position für den Krankheitslocus an.

2.2.2.4 Haplotypanalyse

Bei Haplotypen handelt es sich um linear angeordnete Allelblöcke auf einem Chromosom. Diese Allelblöcke werden zur graphischen Abbildung der Haplotypen in Stammbäume übertragen. Die Haplotypanalyse ermöglicht es, die Segregation von Haplotypen in einem Stammbaum nachzuvollziehen und durch farbliche Kennzeichnung bildlich darzustellen. Die Haplotypanalyse ist darüber hinaus die einzige Möglichkeit zur Identifikation von Rekombinationsereignissen. Je häufiger zwei Chromosomen in einem Stammbaum rekombinieren, desto genauer kann ein Krankheitslocus eingegrenzt werden.

2.2.3 Computerauswertung

Die Datenformatierung wurde mit der Software MAKEDATA (Dr. Yurii Aulchenko, Rotterdam) durchgeführt, Widersprüchlichkeiten innerhalb des Stammbaums und Fehler in den Genotypdaten wie beispielsweise das Fehlen von elterlichen Allelen bei den Kindern, wurden mithilfe der Software PedCheck Version 1.1 (O'Connell und Weeks 1998) aufgespürt. Die LOD-Werte der Zweipunktanalysen wurden mithilfe der Programme MLINK aus dem LINKAGE Software Paket Version 5.1 (Lathrop et al. 1984), FASTLINK Version 4.1 (Cottingham et al. 1993) sowie den unterstützenden Programmen LSP, LCP, MAKEPED und PREPLINNK berechnet. Für die Erstellung der Haplotypen wurden die Programme MEGA2 und SIMWALK2 Version 2.83 (Mukhopadhyay et al. 1996; Sobel und Lange 1996) verwendet.

2.2.3.1 Software

Einen Überblick über die verwendeteten Softwareprogramme und Internetdatenbanken geben die Tabellen 2-3 und 2-4.

Tabelle 2-3: Verwendete Softwareprogramme

Anwendung und Software	Quelle
Textverarbeitung: Word 2000	Microsoft
Datenverwaltung: Excel 2000	Microsoft
Literaturverwaltung: Endnote 6.0	Niles Software
Grafiken:	
PowerPoint 2000	Microsoft
Photoimpact 10	Ulead
Photoshop 6.0	Adobe
Acrobat Destiller 2001	Adobe
Acrobat Reader 2001	Adobe
Onlinesoftware Primer3	http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi
Gel Dokumentation: EasyWin 32	Herolab, St. Leon Rot, Wiesloch
DNA-Fragment-Analyse:	
GeneScan Version 3.1.2	Applied Biosystems, USA
Genotyper Version 2.0	Applied Biosystems, USA
LOD-Wert Simulationen:	
SLINK Version 2.61	Lathrop et al. (1984)
MSIM 2.51	Lathrop et al. (1984)
Kopplungsanalysen:	
MAKEDATA	Dr. Yurii Aulchenko, Rotterdam
MEGA2	Mukhopadhyay et al. (1999)
LINKAGE-Softwarepaket	
MLINK Version 5.1	Lathrop et al. (1984)
FASTLINK Version 4.1	Cottingham et al. (1993)
SIMWALK2 Version 2.83	Sobel und Lange (1996)

2.2.3.2 Datenbanken

Tabelle 2-4: Verwendete Internet-Datenbanken

Datenbank	Internetadresse
PubMed	http:/www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez
Marshfield Medical Center	http://www.research.marshfieldclinic.org
OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man)	http:/www.ncbi.nlm.nih.gov/
NCBI (National Center for Biotechnology Information)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
UCSC (Genome Bioinformatics)	http://www.genome.ucsc.edu/
GDB (Genome Database)	http://gdb.org/
CEPH (Centre d'Etude du Polymorphism Humain)	http://www.cephb.fr/

3 Kasuistik

3.1 Familie mit Kamptodaktylie

In dieser Arbeit wurde eine Familie aus einem Dorf in Hessen untersucht, in der mehrere Familienmitglieder mit einer autosomal dominanten Kleinfingerkontraktur bekannt sind. Die Indexpatientin (Person 302) hatte sich wegen dieser in ihrer Familie auftretenden Fingerkontraktur an ihre Hausärztin gewandt und wurde an das Zentrum für Humangenetik in Marburg verwiesen.

Die Familie wurde besucht und mündlich über die Intention der Studie aufgeklärt. Zusätzlich wurde ein Informationsblatt ausgehändigt. Die Familienmitglieder wurden um die Teilnahme an der Studie gebeten und nach schriftlicher Einverständniserklärung in diese aufgenommen. Der Familie wurde ausführlich erklärt, wie eine Kopplungsanalyse mit Mikrosatellitenmarkern die Lokalisation eines Krankheitsgens innerhalb eines Stammbaums ermöglicht. Es wurde darauf hingewiesen, dass die Aussagekraft der Ergebnisse von der Anzahl der teilnehmenden Familienmitglieder abhängig ist und mit steigender Teilnehmerzahl zunimmt. Da die Genlokalisation leichter ist, wenn auch nicht betroffene Familienmitglieder und eingeheiratete Personen mit in die Studie aufgenommen werden, wurde um die Teilnahme aller anwesenden Familienmitglieder gebeten (Abb. 3-1). Die Studie wurde in der Ethikkommission der Philipps-Universität Marburg vorgestellt. Es bestanden keine Einwände gegen das Studiendesign.

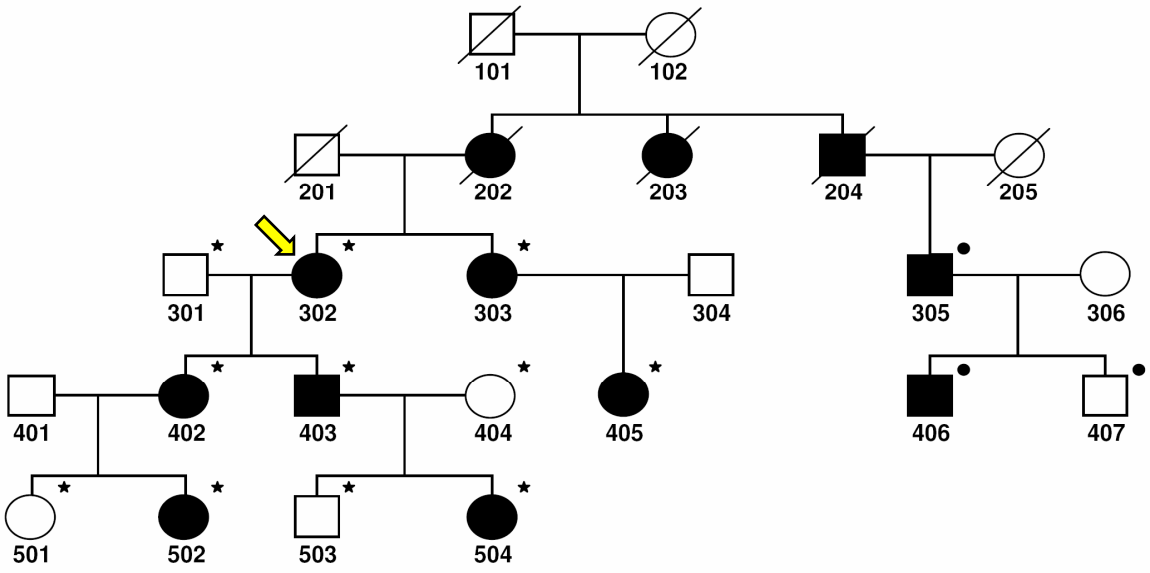

Abbildung 3-1: Stammbaum der Familie
Gelber Pfeil = Indexpatientin, ★ = körperlich untersucht, ● = nicht körperlich untersucht, von den Händen dieser Personen lagen Photos vor
schwarz = Kleinfingerkontraktur, weiß = nicht betroffen

3.2 Klinische Untersuchung

Insgesamt wurden elf Familienmitglieder untersucht. Die Person 305 wurde nicht untersucht. Sieben Personen weisen eine Kontraktur auf. Das jüngste Familienmitglied war zum Zeitpunkt des Besuchs 15 Jahre (Person 504), das älteste 80 Jahre alt (Person 301) (Abb. 3-2).

3.2.1 Untersuchung der Hände

Das Hauptaugenmerk wurde zunächst auf die für die Kamptodaktylie typischen Flexionskontrakturen in den proximalen Kleinfingergelenken (PIP-Gelenk = proximales Interphalangealgelenk) gelegt. Bei der Untersuchung der Familienmitglieder fiel auf, dass der Ausprägungsgrad der Kontrakturen der Kleinfinger unter den Betroffenen der Familie stark variiert. Bei allen Betroffenen sind die Kontrakturen auf die proximalen Interphalangealgelenke der Kleinfinger beschränkt. Manifestationen in anderen Gelenken des Kleinfingers oder anderen Fingern finden sich bei dieser Familie nicht. Bei keinem der betroffenen Familienmitglieder wurden die Kleinfingerkontrakturen operativ korrigiert.

Alle betroffenen Personen zeigen bilaterale Kontrakturen der Kleinfinger. Das Manifestationsalter lag bei fast allen Betroffenen um das 20. Lebensjahr. Ausnahmen hiervon stellen die Personen 302 und 504 dar, bei denen die Fingerkontrakturen bereits im Kindesalter aufgetreten waren. Die Untersuchung der Handinnenflächen ergab eine besonders auffällige Koinzidenz der Kleinfingerkontrakturen mit bisher in diesem Zusammenhang nicht beschriebenen polsterartigen, subkutanen Verdickungen in den Handinnenflächen (Tab. 3-1). Diese sind von weicher Konsistenz und liegen interdigital, proximal der Metacarpophalangealgelenke. Im Folgenden werden sie als Palmarknoten bezeichnet (Abb. 3-2).

Tabelle 3-1: Koinzidenz von Kontraktur und Palmarknoten

	302	303	305	402	403	405	502	504
Kleinfingerkontrakturen	++	++	+	+	–	(+)	+	++
Palmarknoten	+	–	–	+	+	–	+	+

(+/– = Kontraktur vorhanden/nicht vorhanden, ++ = starke und (+) = geringe Ausprägung der Kleinfingerkontraktur)

Bemerkenswert ist das Vorhandensein von Palmarknoten und das Fehlen von Kontrakturen bei der Person 403. Im Vergleich dazu weist seine Tochter (504) auffallend starke Kontrakturen in den PIP-Gelenken beider Kleinfinger auf. Das Vorhandensein von Palmarknoten ohne Kontraktur bei Person 403 lässt den Schluss zu, dass die Kontrakturen in dieser Familie nicht mit vollständiger Penetranz auftreten.

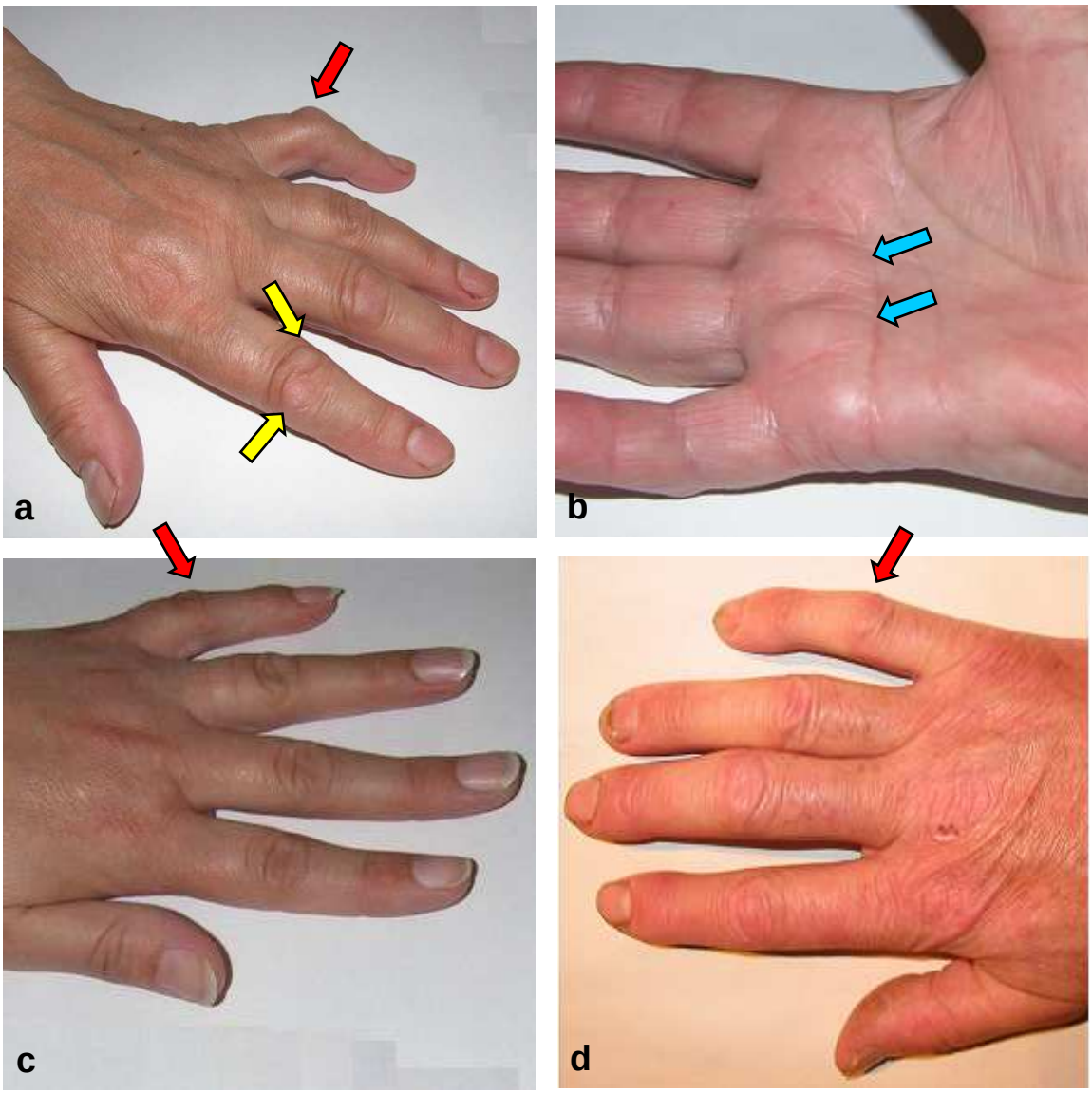

Abbildung 3-2: Phänotypen der Familie

rote Pfeile:	Kontrakturen in den proximalen Interphalan-gealgelenken
blaue Pfeile:	Palmarknoten
gelbe Pfeile:	Gelenkpolster
Photos a und b:	Indexpatientin 302
Photo c:	Person 405 mit sehr geringer Ausprägung der Kontraktur im Kleinfinger
Photo d:	betroffene Person 305 (Privatphoto)
Photo e:	betroffene Person 402

Zwei der untersuchten Personen (302 und 402) weisen, ähnlich den Palmarknoten, kleine Verdickungen im Bereich der Fingergrundgelenke auf den Handrücken auf. Außerdem finden sich bei einigen der untersuchten Personen Gelenkpolster (engl. = knuckle-pads; OMIM 149100), wie sie im Zusammenhang mit dem Morbus Dupuytren (OMIM 126900) und den hereditären Palmoplantarkeratosen (OMIM 144200) in der Literatur beschrieben sind. Es handelt sich hierbei um subkutane Knoten über den dorsalen Anteilen der proximalen Interphalangealgelenke (Skoog 1948). Eine leichte Klinodaktylie weisen zwei Familienmitglieder auf. Hierbei handelt es sich um die Deviation eines Fingers, meist des Kleinfingers radialwärts. Bei Person 405 findet sich diese am Kleinfinger, bei Person 402 am Zeigefinger.

3.2.2 Untersuchung der Füße

Die Untersuchung der Füße und Zehen zeigte weder Kontrakturen noch Palmarknoten oder Gelenkpolster, wie sie an den Händen beobachtet wurden. Die weitere Untersuchung der Zehen ergab jedoch bei zwei Familienmitgliedern (302 und 402) eine leichte Form der Syndaktylie zwischen den Zehen 2 und 3. Diese Form wird als Zygodaktylie bezeichnet. Die Anamnese ergab bei zwei Familienmitgliedern kongenitale Fußfehlstellungen. Die Person 501 wurde mit Klumpfüßen und Person 502 mit Sichelfüßen geboren.

3.2.3 Klassifikation des Phänotyps bei den Familienmitgliedern

Die phänotypische Ausprägung der Kamptodaktylie dieser Familie ist charakterisiert durch die Kleinfingerkontrakturen, die Palmarknoten und die Gelenkpolster. Der Phänotyp variiert innerhalb der Familie von starken Kontrakturen in den PIP-Gelenken der Kleinfinger mit Palmarknoten und Gelenkpolstern (Person 302) bis hin zu isoliertem Auftreten von Palmarknoten ohne Fingerkontraktur und ohne Gelenkpolster als Ausdruck verringerter Penetranz bei Person 403. Aufgrund der phänotypischen Variabilität können die betroffenen Familienmitglieder in drei Gruppen eingeteilt werden:

Gruppe I: Starke Ausprägung der Kleinfingerkontrakturen mit Palmarknoten und/oder Gelenkpolster

Diese Gruppe repräsentiert den charakteristischen Phänotyp der Kamptodaktylie mit ausgeprägten Kontrakturen der PIP-Gelenke der Kleinfinger. Bei allen Personen dieser Gruppe treten die Kleinfingerkontrakturen in Verbindung mit Palmarknoten und/oder Gelenkpolstern auf. Dieser Gruppe gehören die sechs betroffenen Individuen 302, 303, 305, 402, 502 und 504 an.

Gruppe II: Sehr geringe Ausprägung der Kleinfingerkontrakturen ohne Palmarknoten oder Gelenkpolster

In diese Gruppe gehört die Person 405 mit sehr geringer Ausprägung der Kleinfingerkontrakturen als Ausdruck einer variablen Expressivität. Diese Person zeigt weder Palmarknoten noch Gelenkpolster in Verbindung mit den Kleinfinger-kontrakturen.

Gruppe III: Palmarknoten ohne Kleinfingerkontraktur

Diese Gruppe ist charakterisiert durch verringerte Penetranz der phänotypischen Ausprägung. Nur eine Person (403) zeichnet sich durch das isolierte Auftreten von Palmarknoten ohne Kleinfingerkontraktur und Gelenkpolster aus. Dieser Phänotyp stellt die Minimalvariante der Kamptodaktylie dar.

3.2.4 Klinische Untersuchung der Familie im Überblick

Die folgende Tabelle 3-2 gibt Auskunft über die Art und den Umfang der klinischen Untersuchung.

Tabelle 3-2: Untersuchung der Familie

Person	untersucht	Kleinfinger-kontrakturen	Palmar-knoten	Gelenk-polster	Daten	DNA	Photos
301	+	-	-	-	+	+	-
302	+	+	+	+	+	+	+
303	+	+	-	+	+	+	-
304	-	-	-	-	-	-	-
305	-	+	?	?	+	+	+
306	-	-	-	-	-	-	-
401	-	-	-	-	-	-	-
402	+	+	+	+	+	+	+
403	+	-	+	-	+	+	-
404	+	-	-	-	+	+	-
405	+	+	-	-	+	+	+
406	-	-	?	?	-	-	+
407	-	-	?	?	-	-	+
501	+	-	-	-	+	+	-
502	+	+	+	+	+	+	-
503	+	-	-	-	+	+	-
504	+	+	+	+	+	-	-

(? = nicht bekannt; + = vorhanden; - = nicht vorhanden)

3.3 Vererbung der Kamptodaktylie in der Familie

Die Kamptodaktylie wird in dieser Familie autosomal dominant vererbt. Im Stammbaum der Familie sprechen folgende Kriterien für diesen Vererbungsmodus:

- beide Geschlechter sind betroffen
- der Phänotyp wird von beiden Geschlechtern übertragen
- der Phänotyp wird vom Vater auf den Sohn übertragen (Personen 204, 305)
- zeigt ein Elternteil die Anomalie, ist das Kind mit einer Wahrscheinlichkeit von 50 % ebenfalls Genträger

Aus dem Stammbaum der Familie geht ferner hervor, dass es sich um einen autosomal dominanten Erbgang mit unvollständiger Penetranz handelt. Der Betroffene 403 zeigt keine Kontrakturen, ist aber obligater Genträger, da dessen Tochter den Phänotyp zeigt und damit ebenfalls Genträgerin sein muss. Die variable Expressitivät des Phänotyps in dieser Familie wird an folgendem Beispiel deutlich: die Personen 302 und 504 zeigen stärkste Kontrakturen, während die Kontrakturen bei Probandin 405 nur sehr gering ausgeprägt sind.

4 Ergebnisse

4.1 LOD-Wert-Simulationen für den Stammbaum der Familie

Durch LOD-Wert-Simulationen ist es möglich, eine Aussage darüber zu treffen, wie hoch der in der Zweipunktanalyse für einem Stammbaum maximal erreichbare LOD-Wert ist und wie sich dieser durch Hinzunahme weiterer Personen erhöhen lässt. Bei einer Kopplungsanalyse ist die Höhe des maximal erreichbaren LOD-Werts abhängig von der Familienstruktur, der Zahl der Meiosen, der Informativität des Mikrosatellitenmarkers, dem Vererbungsmodus sowie der Penetranz des Phänotyps.

Die Familienstruktur eines Stammbaums wird definiert durch die Anzahl der Generationen, die Anzahl der betroffenen und nicht betroffenen Individuen und die verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den beteiligten Personen. Große Familien mit vier oder mehr Generationen und vielen betroffenen sowie nicht betroffenen Nachkommen eignen sich daher besonders gut für Kopplungsanalysen, da mit der Zahl der Kinder die Zahl der Meiosen zunimmt. Idealerweise finden sich in einem solchen Stammbaum unter den Betroffenen auch entfernte Verwandtschaftsgrade wie Cousins oder Cousinen. Nicht betroffene Individuen sind deshalb von Bedeutung, weil diese das Krankheitsallel nicht tragen. Somit erlauben sie den Ausschluss von in Frage kommenden Allelen als Krankheitsallele.

Bei autosomal dominanten Erbgängen erhöht jede Meiose den LOD-Wert um 0.30. Erst ein LOD-Wert von $Z_{max} > 3.00$ bei einem Rekombinationswert von $\theta = 0.00$ gilt als signifikant für die Kopplung eines Genlocus zu einem Krankheitslocus. Der Rekombinationswert (θ) ist ein Maß für den genetischen Abstand zwischen zwei Genloci. Je weiter zwei Loci auf einem Chromosomenabschnitt voneinander entfernt liegen, desto größer ist die Rekombinationshäufigkeit. Bei einem Rekombinationswert von $\theta = 0.00$ liegen die beiden Loci so nah beieinander, dass eine Rekombination zwischen diesen mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen ist. Sie werden gekoppelt vererbt. Erst ab einer Anzahl von zehn informativen Meiosen wird ein LOD-Wert von $Z_{max} > 3.00$ ($\theta = 0.00$) erreicht. Bei Stammbäumen mit weniger als zehn Meiosen ist es daher nicht möglich, einen signifikanten LOD-Wert von $Z_{max} > 3.00$ ($\theta = 0.00$) zu erreichen.

Die Informativität eines Mikrosatellitenmarkers hängt von der Anzahl der Allele und deren Allelfrequenzen ab. Je zahlreicher und je gleichmäßiger die Verteilung der Allele in der Bevölkerung ist, umso höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein Individuum heterozygot ist.

Die Software MSIM ermöglicht die Durchführung von LOD-Wert-Simulationen, mit deren Hilfe LOD-Werte für beliebige Stammbäume berechnet werden können. Anhand

einer Simulation lässt sich für jeden Stammbaum eine Aussage darüber treffen, wie hoch der maximal erreichbare LOD-Wert dieses Stammbaums in der Zweipunktanalyse ist und wie sich Z_{max} durch Hinzunahme weiterer Individuen (betroffen und nicht betroffen) verändern lässt. Dies ermöglicht beispielsweise in kleinen Stammbäumen mit weniger als zehn Meiosen eine Einschätzung darüber, wie viele weitere Personen typisiert werden müssten, um ein signifikantes Ergebnis zu erhalten.

Als Grundlage für diese LOD-Wert-Simulation dient allein die Stammbaumstruktur, nicht jedoch der Phänotyp (betroffen oder nicht betroffen) der einzelnen Familienmitglieder. In 100 Simulationsdurchläufen werden randomisierte Genotypdaten den Individuen im Stammbaum zugeordnet. Aus diesen Genotypdaten wird dann in jedem Durchlauf ein LOD-Wert errechnet, die Gesamtheit dieser LOD-Werte dient als Grundlage für die Ermittlung des maximalen, des mittleren und des minimalen LOD-Werts.

Für den in der vorliegenden Arbeit getesteten Stammbaum wurden drei Simulationen durchgeführt (Abb. 4-1). Die erste LOD-Wert-Simulation umfasst alle Familienmitglieder, die tatsächlich typisiert wurden. Die zweite Simulation wurde unter Hinzunahme einer weiteren Person (504), die zwar den Phänotyp zeigt, jedoch nicht typisiert wurde, durchgeführt. Die dritte Simulation errechnete Z_{max} unter Hinzunahme der betroffenen Person 504 sowie der Brüder 406 und 407, wobei der Bruder 406 ebenfalls betroffen ist.

Simulation 1: Alle Familienmitglieder, die für diese Kopplungsanalyse typisiert wurden

Simulation 2: Alle Familienmitglieder aus Simulation 1 unter Hinzunahme der betroffenen Person 504

Simulation 3: Alle Familienmitglieder aus Simulation 1 unter Hinzunahme der betroffenen Person 504 sowie der Geschwister 406 und 407. Die Person 406 ist ebenfalls betroffen

In Simulation 1 wurde ein maximaler LOD-Wert von $Z_{max} = 1.94$ ($\theta = 0.00$) ermittelt. Dieser LOD-Wert ist der maximale Wert, der für diesen Stammbaum in der Zweipunktanalyse mit den bislang zur Verfügung stehenden Personen erreicht werden kann.

Nach Hinzunahme einer weiteren Person 504 wurde in Simulation 2 ein maximaler LOD-Wert von $Z_{max} = 2.25$ ($\theta = 0.00$) erreicht. Die Erweiterung des Stammbaums um die Personen 504, 406 und 407 erzielte einen maximalen LOD-Wert von

Z_{max} = 2.68 (θ = 0.00) in Simulation 3. In der folgenden Abbildung 4-1 sind alle drei Simulationen und in Tabelle 4-1 die LOD-Werte der Simulationen dargestellt.

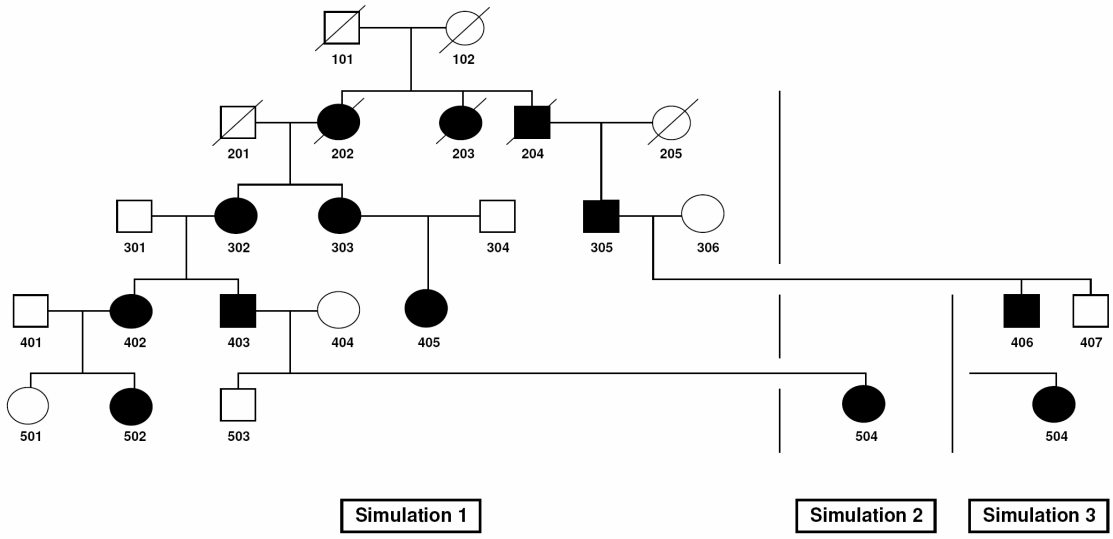

Abbildung 4-1: LOD-Wert-Simulationen
Die Simulation 1 umfasst alle Familienmitglieder, die in dieser Arbeit typisiert wurden. Die Simulationen 2 und 3 wurden nach Hinzunahme weiterer Familienmitglieder durchgeführt

Tabelle 4-1: Ergebnis der LOD-Wert-Simulationen

Simulation	LOD-Wert Z_{max} (θ = 0.00)	Mittlerer LOD-Wert (Ø)
1	1.94	1.37
2	2.25	1.61
3	2.68	1.97

Nach Hinzunahme aller weiteren bekannten Familienmitglieder (504, 406, 407 in Simulation 3) wurde ein LOD-Wert von Z_{max} = 2.68 (θ = 0.00) erreicht, welcher knapp unter der Signifikanzgrenze für den Nachweis einer Kopplung liegt.

Ein signifikant hoher LOD-Wert von Z_{max} > 3.00 (θ = 0.00) wäre durch Rekrutierung von zwei weiteren betroffenen Personen mit sehr großer Wahrscheinlichkeit erreichbar. Hierfür kämen beispielsweise Kinder der Personen 203 oder 502 als mögliche Kandidaten in Frage.

4.2 Chromosom 1

4.2.1 Testung des Kandidatengenlocus 1q24-25

Mutationen innerhalb des *PRG4*-Gens (OMIM 604283) führen zum Jacobs-Syndrom (OMIM 208250), welches als syndromales Krankheitsbild eine Kamptodaktylie zeigt. Das *PRG4*-Gen befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 1 auf 1q24-25 (Abb. 4-2). Dieser Locus wurde vor der Analyse des kompletten Chromosoms als in Frage kommender Krankheitslocus getestet.

Für den Locus 1q24-25 wurden die drei Marker D1S2799, D1S215 und D1S518 sowie je ein proximal und ein distal angrenzender Marker getestet (D1S1677, D1S1660). Die drei für den 1q24-25-Locus getesteten Marker zeigen signifikant negative LOD-Werte zwischen –5.98 und –7.73 ($\theta = 0.00$). Der angrenzende Marker D1S1677 erreichte einen LOD-Wert von $Z_{max} = 0.75$ ($\theta = 0.00$) (Tab. 4-2). Eine Kopplung des Phänotyps zu dem Locus 1q24-25 kann mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

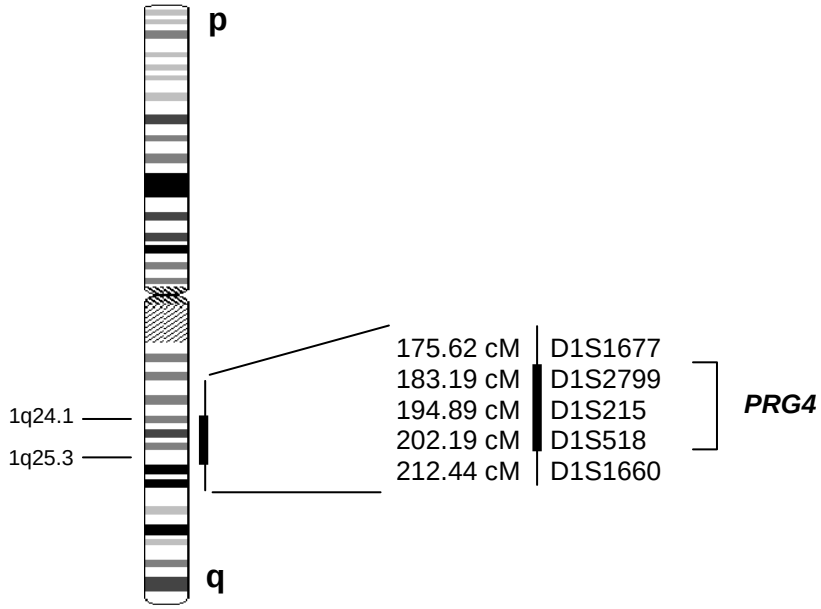

Abbildung 4-2: Chromosom 1
Für den Locus 1q24-25 wurden die drei Marker D1S2799, D1S215 und D1S518 getestet. Links neben den Markernamen ist die Lokalisation der Marker in cM angegeben

Tabelle 4-2: Chromosom 1. LOD-Werte für den **Locus 1q24-25**

Gen			Rekombinationswerte (θ)						
	cM	Marker	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
	175.62	D1S1677	0.75	0.73	0.66	0.57	0.38	0.22	0.09
	183.19	D1S2799	-6.59	-2.07	-0.80	-0.32	0.02	0.11	0.08
PRG4	194.89	D1S215	-5.98	-4.39	-2.43	-1.60	-0.83	-0.43	-0.18
	202.19	D1S518	-7.73	-4.40	-2.44	-1.61	-0.85	-0.45	-0.19
	212.44	D1S1660	-5.93	-4.39	-2.43	-1.60	-0.83	-0.43	-0.18

4.2.2 Genotypisierung des gesamten Chromosoms 1

Nach Ausschluss des 1q24-25-Locus wurde das gesamte Chromosom getestet, welches mit 288.29 cM das größte Chromosom des menschlichen Genoms ist. Insgesamt sollten 33 Mikrosatellitenmarker mit einem durchschnittlichen Intermarkerabstand von 10 cM getestet werden. Die Amplifikation der DNA-Fragmente gestaltete sich jedoch an einigen Loci äußerst schwierig und musste für viele Marker mehrfach wiederholt werden. Die anschließende GeneScan-Auswertung war dennoch für einige Marker nicht möglich. Insgesamt konnten für zehn Marker keine PCR-Produkte gewonnen werden. Daraus ergeben sich an sechs Loci Abstände von deutlich mehr als 10 cM. Der größte Intermarkerabstand befindet sich mit 27,3 cM am telomeren Ende des langen Arms zwischen den Markern D1S3462 und D1S1609.

Für die Kopplungsanalysen standen somit insgesamt 23 Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 1 zur Verfügung.

4.2.2.1 Mikrosatellitenmarker mit positiven LOD-Werten $Z_{max} > 0.00$

Von den außerhalb des Kandidatengenlocus 1q24-25 getesteten 20 Mikrosatellitenmarkern zeigen drei Marker positive LOD-Werte von $Z_{max} > 0.00$ ($\theta = 0.00$). Dabei handelt es sich um die Marker D1S1595 und D1S1677 am zentromeren Ende des langen Arms und um den Marker D1S441 auf dem kurzen Arm des Chromosoms (Tab. 4-3, Abb. 4-3). Der Marker D1S1677 grenzt an den Kandidatengenlocus 1q24-25 an.

Tabelle 4-3: Chromosom 1. Marker mit positiven LOD-Werten $Z_{max} > 0.00$

Chromosom			Rekombinationswerte (θ)						
	cM	Marker	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
1p	64.38	D1S441	0.29	0.28	0.24	0.19	0.11	0.04	0.01
1q	161.05	D1S1595	0.95	0.93	0.84	0.73	0.51	0.30	0.13
	175.62	D1S1677	0.75	0.73	0.66	0.57	0.38	0.22	0.09

Der Mikrosatellitenmarker D1S1595 zeigt in der getesteten Familie vier verschiedene Allele (281 bp, 285 bp, 289 bp, 293 bp), wobei das Allel 289 bp bei allen typisierten Betroffenen und bei keiner der nicht betroffenen Personen vorkommt (Abb. 4-3). Der in Simulation 1 ermittelte maximale LOD-Wert von $Z_{max} = 1.94$ ($\theta = 0.00$) konnte für diesen Marker jedoch nicht erreicht werden, da die Personen 305 und 501 bei der Typisierung dieses Markers noch nicht zur Verfügung standen. Somit wurde für diesen Marker ein LOD-Wert von $Z_{max} = 0.95$ ($\theta = 0.00$) ermittelt.

Der Marker D1S1677 zeigt unter den typisierten Familienmitgliedern ebenfalls vier Allele (188 bp, 192 bp, 196 bp, 200 bp). Die beiden Personen 305 und 501 wurden auch für diesen Marker nicht typisiert. Alle Personen, die den Phänotyp zeigen, tragen das Allel 196 bp. Die nicht betroffene Person 404 bringt das Allel 196 bp ebenfalls in den Stammbaum ein, sie ist wie ihr Ehemann 403 und ihr Sohn 503 heterozygot für die Allele 192 bp – 196 bp. Es ist daher keine Aussage darüber möglich, ob das Allel 196 bp von der Mutter oder vom Vater an den nicht betroffenen Sohn 503 weitergegeben wurde. Diese Meiose ist somit nicht informativ. Daher zeigt dieser Marker im Vergleich zu dem Marker D1S1595 einen niedrigeren LOD-Wert von $Z_{max} = 0.75$ ($\theta = 0.00$).

Die Abbildung 4-3 zeigt den Haplotyp der beiden Marker D1S1595 und D1S1677 mit den Genotypdaten für alle getesteten Familienmitglieder. Die mit 0 gekennzeichneten Personen 305 und 501 wurden nicht typisiert, da diese beiden Personen nicht zur Verfügung standen.

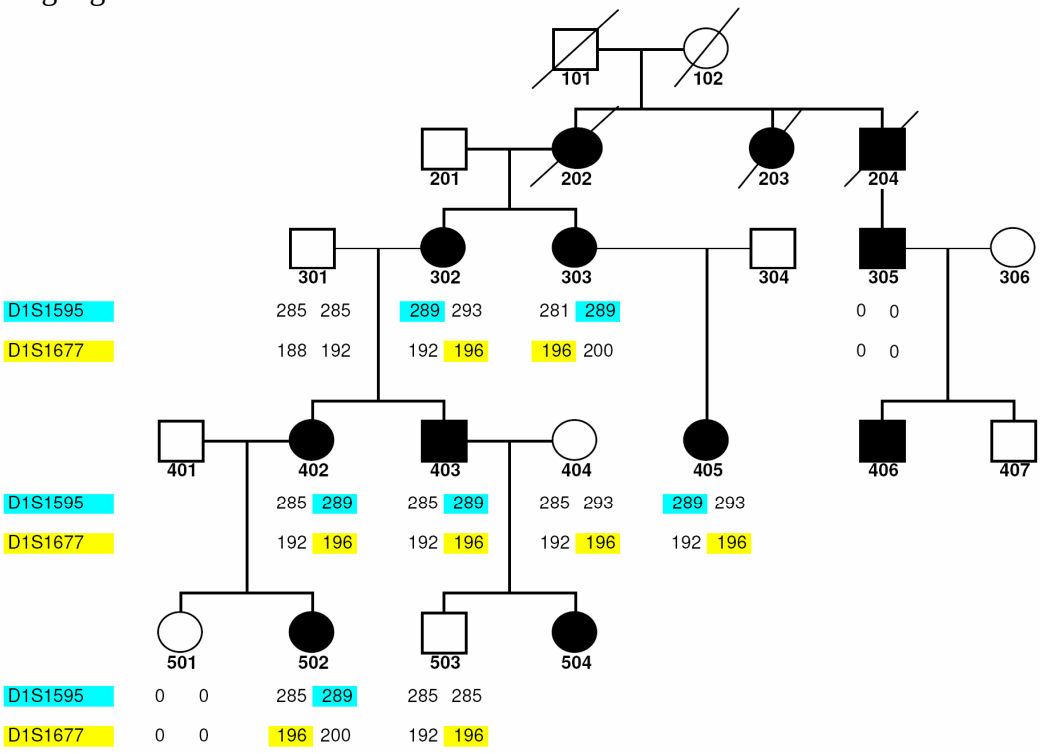

Abbildung 4-3: Haplotyp der Marker D1S1595 und D1S1677
Dargestellt sind die Genotypdaten der beiden Marker D1S1595 und D1S1677 auf Chromosom 1. Die mit 0 gekennzeichneten Personen wurden nicht typisiert

Für den Mikrosatellitenmarker D1S441, der einen LOD-Wert von $Z_{max} = 0.29$ ($\theta = 0.00$) erzielte, sind acht der elf Personen homozygot. Dieser Marker war daher nicht informativ und eine Aussage über Kopplung zum Phänotyp nicht möglich.

4.2.2.2 Mikrosatellitenmarker mit LOD-Werten zwischen 0.00 und –2.00

Zwei der getesteten Mikrosatellitenmarker zeigen LOD-Werte im Bereich zwischen 0.00 und -2.00 ($\theta = 0.00$). Der Marker D1S2739 zeigt einen LOD-Wert von $Z_{max} = -1.92$ ($\theta = 0.00$). Dieser Wert liegt nahe der Signifikanzgrenze zum Ausschluss einer Kopplung. Für den Marker D1S3462 fand sich ein leicht negativer LOD-Wert von $Z_{max} = -0.09$ ($\theta = 0.00$) (Tab. 4-4). Eine Aussage über Kopplung zum Phänotyp ist für diesen Marker nicht möglich.

Tabelle 4-4: Chromosom 1. Marker mit LOD-Werten zwischen 0.00 und –2.00

Chromosom			Rekombinationswerte (θ)						
	cM	Marker	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
1p	130.73	D1S2739	-1.92	-0.90	-0.30	-0.09	0.03	0.05	0.03
1q	247.23	D1S3462	-0.09	-0.09	-0.07	-0.05	-0.03	-0.01	-0.00

4.2.2.3 Mikrosatellitenmarker mit LOD-Werten $Z_{max} < -2.00$

LOD-Werte von $Z_{max} < -2.00$ bei einem Rekombinationswert von $\theta = 0.00$ gelten als signifikant für den Ausschluss einer Kopplung zum Krankheitslocus. Von den 23 getesteten Mikrosatellitenmarkern zeigen 16 Marker signifikant negative LOD-Werte von $Z_{max} < -2.00$ ($\theta = 0.00$). Die LOD-Werte bleiben auch bei einer Rekombinationshäufigkeit von $\theta = 0.40$ negativ bzw. nahe dem Wert 0.00.

Der kurze Arm des Chromosoms 1 kann aufgrund signifikant negativer LOD-Werte mit großer Wahrscheinlichkeit als Krankheitslocus ausgeschlossen werden. Lediglich für den Marker D1S441 ist keine Aussage über Kopplung möglich. Der lange Arm des Chromosoms 1 kann, mit Ausnahme der telomeren Region im Bereich der beiden Mikrosatellitenmarker D1S1595 und D1S1677, ebenfalls mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden (Tab. 4-5).

Tabelle 4-5: Chromosom 1. Marker mit negativen LOD-Werten $Z_{max} < -2.00$

Chromosom			Rekombinationswerte (θ)						
	cM	Marker	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
	10.78	D1S2132	-4.74	-1.08	-0.44	-0.20	-0.01	0.05	0.05
	20.61	D1S244	-2.18	-1.03	-0.43	-0.21	-0.07	-0.03	-0.01
	29.93	D1S1597	-4.79	-1.41	-0.72	-0.43	-0.17	-0.06	-0.01
	38.51	D1S1592	-4.15	-3.02	-1.66	-1.07	-0.52	-0.24	-0.09
1p	55.10	D1S1676	-4.40	-2.47	-1.20	-0.68	-0.24	-0.07	-0.01
	75.66	D1S2134	-2.39	-1.36	-0.74	-0.49	-0.28	-0.17	-0.08
	93.86	D1S473	-7.14	-4.20	-2.21	-1.36	-0.59	-0.22	-0.05
	100.39	D1S410	-5.37	-3.42	-2.06	-1.42	-0.78	-0.41	-0.16
	113.69	D1S551	-4.92	-3.18	-1.83	-1.23	-0.64	-0.32	-0.12
	183.19	D1S2799	-6.59	-2.07	-0.80	-0.32	0.02	0.11	0.08
	194.89	D1S215	-5.98	-4.39	-2.43	-1.60	-0.83	-0.43	-0.18
	202.19	D1S518	-7.73	-4.40	-2.44	-1.61	-0.85	-0.45	-0.19
	212.44	D1S1660	-5.93	-4.39	-2.43	-1.60	-0.83	-0.43	-0.18
1q	226.16	D1S1663	-2.27	-1.24	-0.63	-0.40	-0.22	-0.14	-0.08
	233.38	D1S2141	-2.03	-1.00	-0.41	-0.20	-0.08	-0.05	-0.03
	239.66	D1S549	-2.77	-1.73	-1.05	-0.74	-0.42	-0.23	-0.09
	245.05	D1S1656	-7.21	-2.86	-1.52	-0.95	-0.42	-0.16	-0.03
	274.53	D1S1609	-4.54	-2.54	-1.24	-0.72	-0.29	-0.10	-0.02

4.2.2.4 Haplotypanalyse für Chromosom 1

In Abbildung 4-4 ist das Ergebnis der Haplotypanalyse für Chromosom 1 dargestellt. Die beiden Haplotypen der Indexpatientin (302) sind farblich dargestellt, wobei der maternale Haplotyp rosa und der paternale Haplotyp blau unterlegt ist.

Die beiden betroffenen Kinder der Indexpatientin (302) zeigen für den kurzen Arm des Chromosoms, definiert durch die Marker D1S2132 – D1S2739, jeweils unterschiedliche Haplotypen. Die betroffene Tochter (402) hat den paternalen Haplotyp, der betroffene Sohn (403) den maternalen Haplotyp geerbt. Somit kann die Lokalisation des Krankheitslocus auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Betrachtet man die Haplotypen des langen Arms von Chromosom 1, so fällt ein gemeinsamer Haplotyp bei allen Betroffenen auf, den keine der nicht betroffenen Personen zeigt. Dieser Haplotyp wird durch die beiden Marker D1S1595 und D1S1677 gebildet. Dies ist in Abbildung 4-4 durch zwei waagerechte Linien dargestellt. Dieser gemeinsame Haplotyp bestätigt die positiven LOD-Werte von $Z_{max} = 0.95$ ($\theta = 0.00$) für den Marker D1S1595 und $Z_{max} = 0.75$ ($\theta = 0.00$) für den Marker D1S1677 aus der Zweipunktanalyse.

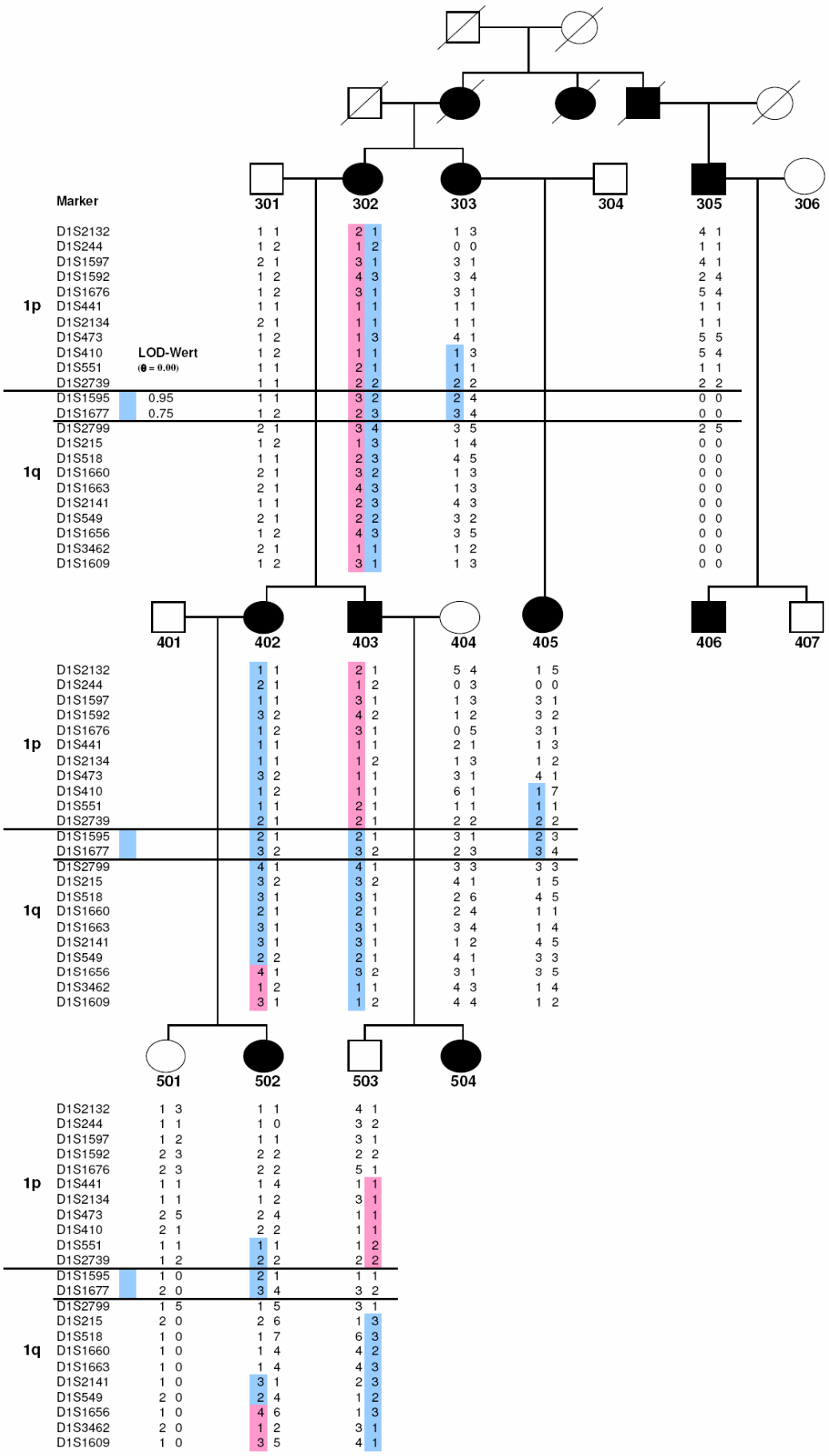

Abbildung 4-4: Haplotypanalyse für Chromosom 1
Nicht typisierte Personen sind mit 0 gekennzeichnet

4.2.2.5 Multimarkeranalyse für Chromosom 1

Die Multimarkeranalyse für Chromosom 1 zeigt positive LOD-Werte in einem Intervall zwischen Position 134 cM und 182 cM. Der maximale LOD-Wert von $Z_{max} = 1.21$ ($\theta = 0.00$) liegt bei 161 cM. Dies entspricht dem Marker D1S1595, für den auch in der Zweipunktanalyse der höchste LOD-Wert von $Z_{max} = 0.95$ ($\theta = 0.00$) gefunden wurde (Abb. 4-5).

Im Bereich von 230 cM zeigt die Multimarkeranalyse einen LOD-Wert von 0.00 ($\theta = 0.00$) Für diesen Locus ist eine Aussage über Kopplung zum Phänotyp nicht möglich. Die LOD-Werte aus der Zweipunktanalyse für die beiden Marker D1S1663 (226,16 cM) und D1S2141 (233,38 cM) schließen jedoch eine Kopplung dieser Region zum Krankheitslocus wegen ihrer signifikanten Negativität ($Z_{max} < -2.03$; $\theta = 0.00$) mit großer Wahrscheinlichkeit aus.

Eine Kopplung der Kamptodaktylie zum *PRG4*-Genlocus konnte durch signifikant negative LOD-Werte von $Z_{max} < -2.00$ ($\theta = 0.00$) ebenfalls mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

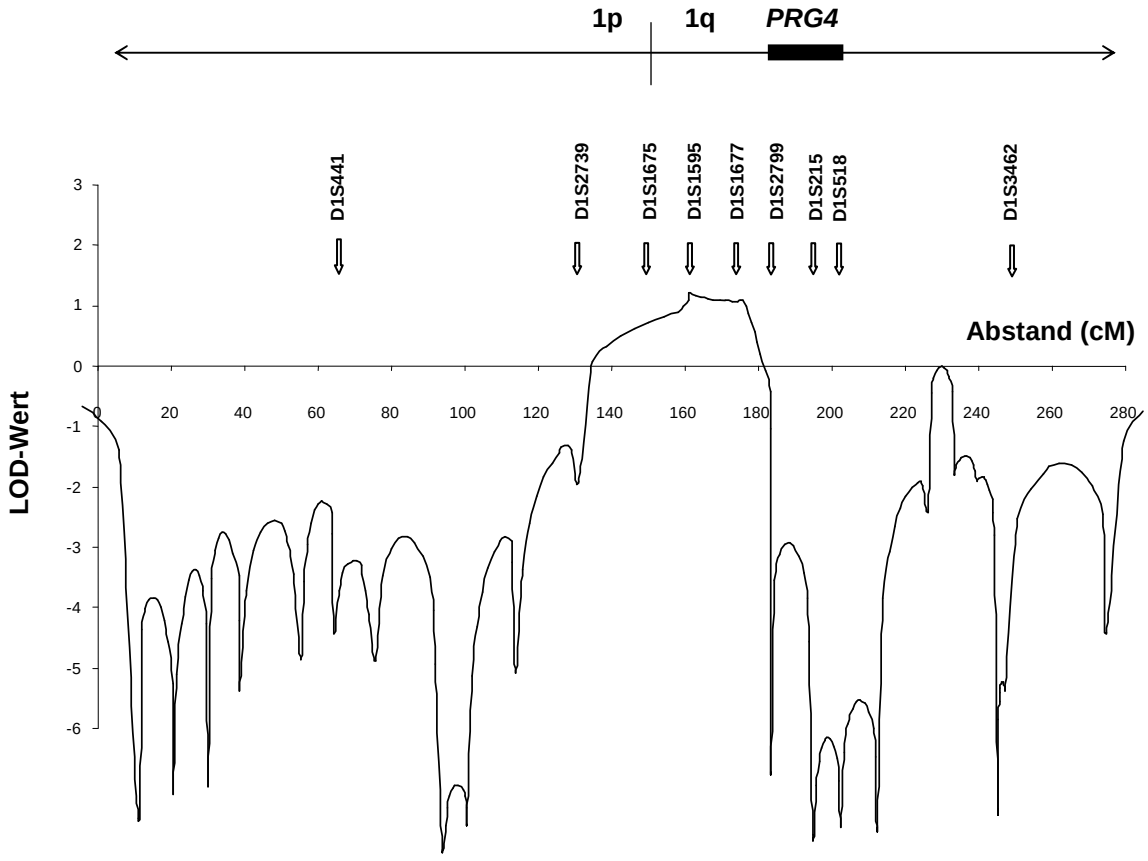

Abbildung 4-5: Multimarkeranalyse für Chromosom 1

4.2.3 Identifikation eines Kandidatenlocus auf Chromosom 1

In der Multimarkeranalyse für Chromosom 1 zeigte sich in der zentromeren Region des langen Arms ein Bereich positiver LOD-Werte, der sich über ein Intervall von 48 cM von Position 134 cM bis 182 cM erstreckt (Abb. 4-5). Den höchsten LOD-Wert zeigte die Multimarkeranalyse an Position 161 cM für den Marker D1S1595 (Z_{max} = 1.21; (θ = 0.00). Der benachbarte Marker D1S1677 erreichte einen LOD-Wert von Z_{max} = 1.08; (θ = 0.00) an Position 175 cM. In der Zweipunktanalyse erzielten diese beiden Marker weniger positive LOD-Werte von Z_{max} = 0.95 (D1S1595) und Z_{max} = 0.75 (D1S1677). Für angrenzende Marker konnten in der Zweipunktanalyse keine positiven LOD-Werte erreicht werden.

Die Haplotypanalyse zeigte unter allen getesteten Betroffenen (302, 303, 402, 403, 405, 502) einen gemeinsamen Haplotyp für diese beiden Marker, der bei keiner nicht betroffenen Person zu finden ist (Abb. 4-4). Hiervon ausgenommen werden müssen die beiden Personen 305 und 501, die zum Zeitpunkt der DNA-Amplifikation für die beiden Marker noch nicht zur Verfügung standen.

4.2.4 Zusammenfassung der Analyse des Chromosoms 1

In Tabelle 4-6 sind alle in dieser Arbeit für Chromosom 1 getesteten Marker zusammengefasst.

Tabelle 4-6: Marker auf Chromosom 1

Chromosom			Rekombinationswerte (θ)						
	cM	Marker	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
1p	10,78	D1S2132	-4.74	-1.08	-0.44	-0.20	-0.01	0.05	0.05
	20,61	D1S244	-2.18	-1.03	-0.43	-0.21	-0.07	-0.03	-0.01
	29,93	D1S1597	-4.79	-1.41	-0.72	-0.43	-0.17	-0.06	-0.01
	38,51	D1S1592	-4.15	-3.02	-1.66	-1.07	-0.52	-0.24	-0.09
	55,1	D1S1676	-4.40	-2.47	-1.20	-0.68	-0.24	-0.07	-0.01
	64,38	D1S441	0.29	0.28	0.24	0.19	0.11	0.04	0.01
	75,66	D1S2134	-2.39	-1.36	-0.74	-0.49	-0.28	-0.17	-0.08
	93,86	D1S473	-7.14	-4.20	-2.21	-1.36	-0.59	-0.22	-0.05
	100,39	D1S410	-5.37	-3.42	-2.06	-1.42	-0.78	-0.41	-0.16
	113,69	D1S551	-4.92	-3.18	-1.83	-1.23	-0.64	-0.32	-0.12
	130,73	D1S2739	-1.92	-0.90	-0.30	-0.09	0.03	0.05	0.03
1q	161,05	D1S1595	0.95	0.93	0.84	0.73	0.51	0.30	0.13
	175,62	D1S1677	0.75	0.73	0.66	0.57	0.38	0.22	0.09
	183,19	D1S2799	-6.59	-2.07	-0.80	-0.32	0.02	0.11	0.08
	194,89	D1S215	-5.98	-4.39	-2.43	-1.60	-0.83	-0.43	-0.18
	202,19	D1S518	-7.73	-4.40	-2.44	-1.61	-0.85	-0.45	-0.19
	212,44	D1S1660	-5.93	-4.39	-2.43	-1.60	-0.83	-0.43	-0.18
	226,16	D1S1663	-2.27	-1.24	-0.63	-0.40	-0.22	-0.14	-0.08
	233,38	D1S2141	-2.03	-1.00	-0.41	-0.20	-0.08	-0.05	-0.03
	239,66	D1S549	-2.77	-1.73	-1.05	-0.74	-0.42	-0.23	-0.09
	245,05	D1S1656	-7.21	-2.86	-1.52	-0.95	-0.42	-0.16	-0.03
	247,23	D1S3462	-0.09	-0.09	-0.07	-0.05	-0.03	-0.01	-0.00
	274,53	D1S1609	-4.54	-2.54	-1.24	-0.72	-0.29	-0.10	-0.02

4.3 Chromosom 2

4.3.1 Testung der Kandidatengenloci 2q31 und 2q34-36

Auf dem langen Arm von Chromosom 2 sind Loci für zwei unterschiedliche Syndaktylieformen bekannt. Der Genort für Synpolydaktylie = Syndaktylie Typ II (SPD-Locus; *HOXD13*-Gen) liegt auf Locus 2q31. Der Genort für Syndaktylie Typ I (SD1-Locus; *SDTY1*-Gen) befindet sich auf Locus 2q34-36 (Abb. 4-6). Diese beiden Loci wurden vor Analyse des kompletten Chromosoms auf Kopplung getestet.

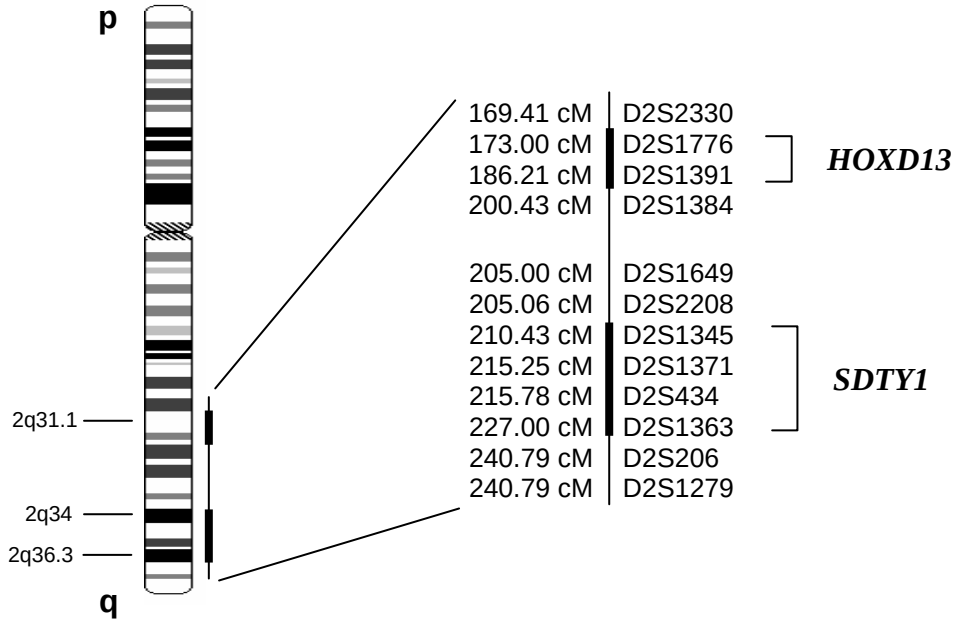

Abbildung 4-6: Chromosom 2
Die Abbildung zeigt die beiden Marker D2S1776 und D2S1391, die für das *HOXD13*-Gen getestet wurden, sowie die vier Marker D2S1345, D2S1371, D2S434 und D2S1363, die für das *SDTY1*-Gen getestet wurden. Beide Genloci werden durch proximale und distale Marker ergänzt. Links neben den Markernamen ist die Lokalisation der Marker in cM angegeben

Für den 2q31-Locus auf dem langen Arm von Chromosom 2 wurden die beiden Marker D2S1391 und D2S1776 sowie ein proximaler (D2S2330) und ein distaler Marker (D2S1384) getestet.

Der Mikrosatellitenmarker D2S1391 zeigt insgesamt fünf Allele (121 bp, 125 bp, 127 bp, 129 bp, 133 bp). Das Allel 125 bp ist bei allen getesteten Personen zu finden. Die Homozygotie der Personen 301, 303, 402, 403 und 503 für das Allel 125 bp macht eine Aussage über Kopplung des Markers zum Krankheitslocus trotz leicht positivem LOD-Wert von $Z_{max} = 0.42$ ($\theta = 0.00$) unmöglich. Die Genotypdaten dieses Markers sind in Abbildung 4-7 dargestellt.

Der zweite Marker, der für den Locus 2q31 getestet wurde (D2S1776) sowie die beiden flankierenden Marker D2S2330 und D2S1384 zeigen hingegen stark negative LOD-Werte zwischen $Z_{max} = –2.27$ und $Z_{max} = –10.47$ ($\theta = 0.00$). Eine Kopplung dieser drei Marker zum Krankheitslocus kann mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Die fehlende Informativität des Markers D2S1391 machte es trotz der negativen LOD-Werte der anderen getesteten Marker nicht möglich, den Locus 2q31 in der Zweipunktanalyse als Krankheitslocus auszuschließen (Tab. 4-7).

Tabelle 4-7: Chromosom 2. LOD-Werte im Bereich des **Locus 2q31**

Gen			Rekombinationswerte (θ)						
	cM	**Marker**	**0.00**	**0.01**	**0.05**	**0.10**	**0.20**	**0.30**	**0.40**
	169.41	D2S2330	-10.47	-6.06	-3.43	-2.31	-1.24	-0.67	-0.29
HOXD13	173.00	D2S1776	-5.92	-2.51	-1.20	-0.67	-0.24	-0.07	-0.01
	186.21	D2S1391	0.42	0.41	0.36	0.29	0.17	0.07	0.01
	200.43	D2S1384	-2.27	-1.24	-0.61	-0.35	-0.14	-0.05	-0.01

Für den 2q34-36-Locus auf dem langen Arm von Chromosom 2 wurden acht Mikrosatellitenmarker in einem Intervall von Position 205.00 cM bis 240.79 cM getestet. Vier Marker liegen auf dem 2q34-36-Locus, vier weitere Marker flankieren diesen. Alle acht Marker zeigen signifikant niedrige LOD-Werte zwischen $Z_{max} = –2.39$ und $Z_{max} = –7.49$ ($\theta = 0.00$). Eine Kopplung dieser Region zum Krankheitslocus kann somit ausgeschlossen werden (Tab. 4-8).

Tabelle 4-8: Chromosom 2. LOD-Werte im Bereich des **Locus 2q34-36**

Gen			Rekombinationswerte (θ)						
	cM	**Marker**	**0.00**	**0.01**	**0.05**	**0.10**	**0.20**	**0.30**	**0.40**
	205.00	D2S1649	-2.39	-1.08	-0.45	-0.22	-0.05	-0.01	-0.00
	205.06	D2S2208	-7.49	-4.10	-2.15	-1.34	-0.62	-0.28	-0.10
	210.43	D2S1345	-4.79	-2.45	-1.17	-0.66	-0.25	-0.08	-0.01
	215.25	D2S1371	-4.62	-2.55	-1.30	-0.80	-0.38	-0.20	-0.09
SDTY1	215.78	D2S434	-7.49	-4.10	-2.16	-1.36	-0.64	-0.30	-0.11
	227.00	D2S1363	-7.49	-4.10	-2.15	-1.35	-0.63	-0.29	-0.10
	240.79	D2S206	-2.54	-1.07	-0.43	-0.20	-0.04	-0.00	0.00
	240.79	D2S1279	-4.67	-2.32	-1.05	-0.55	-0.15	-0.01	0.01

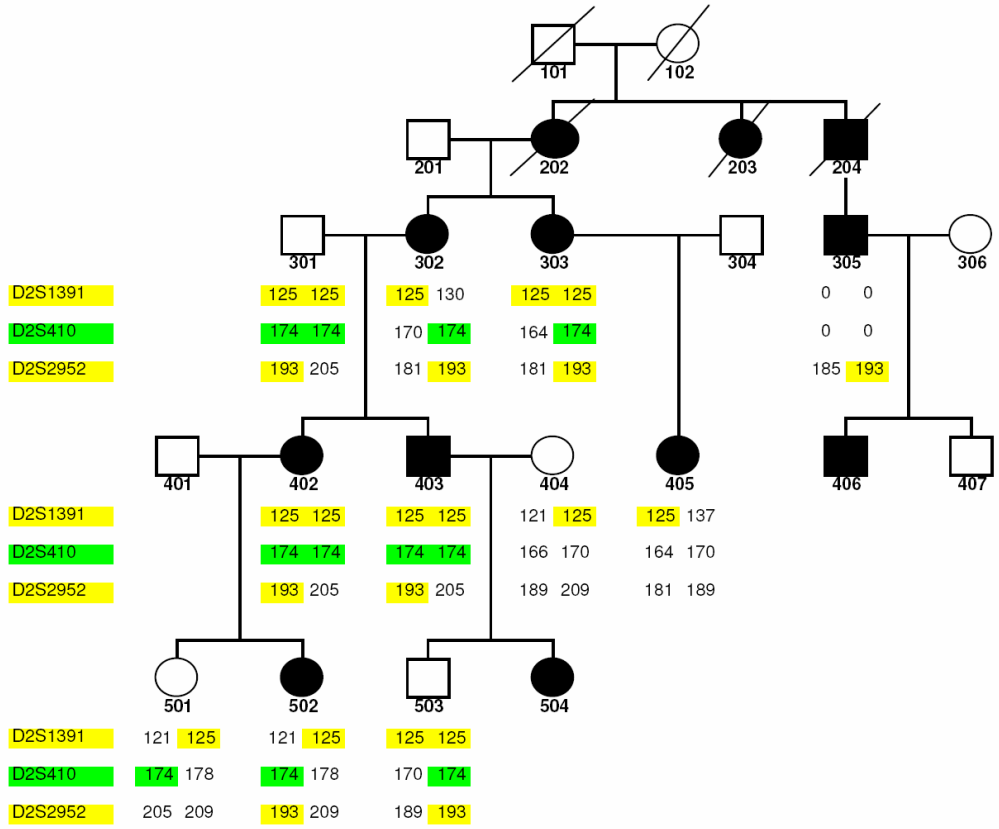

Abbildung 4-7: Genotypdaten Chromosom 2
Dargestellt sind die Genotypdaten der drei Marker D2S1391, D2S410 und D2S2952 auf Chromosom 2

4.3.2 Genotypisierung des gesamten Chromosoms 2

Nach Testung der beiden Kandidatenloci 2q31 und 2q34-36 wurde das gesamte Chromosom typisiert. Dieses hat eine Größe von 269.07 cM. Insgesamt sollten auf diesem Chromosom 62 Mikrosatellitenmarker in einem durchschnittlichen Intermarkerabstand von 10 cM getestet werden. Die Amplifizierung der DNA-Fragmente erwies sich auch auf Chromosom 2 als sehr schwierig, von 62 Markern konnten 28 Marker nicht typisiert werden. An insgesamt vier Loci entstanden so Intermarkerabstände von mehr als 15 cM. Der mit 22.53 cM größte Abstand befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms zwischen den Markern D2S1356 und D2S441.

Da nicht alle Mikrosatellitenmarker typisiert werden konnten, standen letztlich insgesamt 34 Mikrosatellitenmarker für die Kopplungsanalysen auf Chromosom 2 zur Verfügung.

4.3.2.1 Mikrosatellitenmarker mit positiven LOD-Werten $Z_{max} > 0.00$

Von den nach Testung der Kandidatenloci verbleibenden 22 Mikrosatellitenmarkern zeigt lediglich der Marker D2S410 einen positiven LOD-Wert von $Z_{max} = 0.38$ ($\theta = 00$). Für diesen Marker ergab die Typisierung der Familienmitglieder insgesamt fünf Allele (164 bp, 166 bp, 170 bp, 174 bp, 178 bp). Das Allel 174 bp findet sich bei der Indexpatientin (302) sowie sieben anderen Familienmitgliedern. Die Homozygotie der Indexpatientin und deren Kinder (402 und 403) macht eine Aussage über Kopplung dieses Markes zum Krankheitslocus unmöglich. Das Fehlen des Allels 174 bp bei der betroffenen Person 405 macht eine Kopplung diese Markers zum Krankheitslocus jedoch unwahrscheinlich. Die Genotypen dieses Markers sind in Abbildung 4-7, die LOD-Werte in Tabelle 4-9 dargestellt.

Tabelle 4-9: Chromosom 2. Marker mit positiven LOD-Werten $Z_{max} > 0.00$

Chromosom			Rekombinationswerte (θ)						
	cM	Marker	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
2q	125.81	D2S410	0.38	0.36	0.32	0.26	0.15	0.06	0.01

4.3.2.2 Mikrosatellitenmarker mit LOD-Werten zwischen 0.00 und –2.00

Auf Chromosom 2 zeigen drei Marker LOD-Werte im Bereich zwischen 0.00 und -2.00 ($\theta = 0.00$) (Tab. 4-10).

Tabelle 4-10: Chromosom 2. Marker mit LOD-Werten zwischen 0.00 und –2.00

Chromosom			Rekombinationswerte (θ)						
	cM	Marker	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
	3.76	D2S2980	-1.87	-0.84	-0.25	-0.04	0.08	0.09	0.05
2p	17.88	D2S2952	-1.15	-0.14	0.38	0.51	0.47	0.32	0.15
	38.33	D2S1360	-2.00	-1.11	-0.50	-0.24	-0.03	0.04	0.04

Unter den getesteten Familienmitgliedern finden sich für den Marker D2S2952 insgesamt sechs Allele (181 bp, 185 bp, 189 bp, 193 bp, 205 bp, 209 bp). Das Allel 193 bp ist bei der Indexpatientin (302) sowie fünf weiteren Betroffenen (303, 305, 402, 403, 502) vorhanden. Eine Kopplung dieses Markers zum Krankheitslocus ist jedoch unwahrscheinlich, da eine nicht betroffene Person (503) Träger des Allels 193 bp ist, während eine betroffene Person (405) das Allel nicht aufweist. Die Genotypen dieses Markers sind in Abbildung 4-7 dargestellt.

Die LOD-Werte der beiden Marker D2S2980 ($Z_{max} = -1.87$; $\theta = 0.00$) und D2S1360 ($Z_{max} = -2.00$; $\theta = 0.00$) liegen nahe der Signifikanzgrenze für den Ausschluss einer

Kopplung zum Krankheitslocus. Diese Marker können ebenfalls mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

4.3.2.3 Mikrosatellitenmarker mit LOD-Werten $Z_{max} < -2.00$

LOD-Werte von $Z_{max} < -2.00$ bei einem Rekombinationswert von $\theta = 0.00$ gelten als signifikant für den Ausschluss einer Kopplung von Gen- zu Krankheitslocus. Von den 34 typisierten Mikrosatellitenmarkern zeigen 29 Marker einen signifikant negativen LOD-Wert von $Z_{max} < -2.00$ ($\theta = 0.00$). Auch die LOD-Werte bei Rekombinationswerten bis $\theta = 0.40$ bleiben negativ bzw. zeigen keine deutlich positiven Werte. Somit konnte das Chromosom 2 bereits aufgrund der LOD-Werte aus der Zweipunktanalyse größtenteils ausgeschlossen werden (Tab. 4-11).

Tabelle 4-11: Chromosom 2. Marker mit negativen LOD-Werten $Z_{max} < -2.00$

Chromosom			Rekombinationswerte (θ)						
	cM	Marker	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
	10.00	D2S1780	-4.15	-2.05	-0.82	-0.35	-0.00	0.08	0.06
	22.10	D2S423	-3.97	-2.04	-0.83	-0.37	-0.05	0.02	0.02
	27.60	D2S1400	-4.26	-2.34	-1.10	-0.60	-0.19	-0.04	0.00
	47.97	D2S405	-4.87	-1.79	-0.96	-0.58	-0.26	-0.13	-0.06
2p	55.51	D2S1788	-7.53	-2.70	-1.37	-0.83	-0.36	-0.15	-0.05
	64.29	D2S1356	-2.59	-1.55	-0.88	-0.57	-0.26	-0.10	-0.02
	86.82	D2S441	-4.92	-2.98	-1.68	-1.11	-0.56	-0.28	-0.10
	90.82	D2S1394	-6.23	-4.82	-2.86	-2.00	-1.15	-0.65	-0.28
	99.41	D2S1777	-7.88	-4.88	-2.85	-1.94	-1.07	-0.60	-0.27
	103.16	D2S1790	-7.86	-5.06	-3.05	-2.14	-1.22	-0.67	-0.29
	118.16	D2S436	-10.47	-6.06	-3.43	-2.31	-1.24	-0.67	-0.29
	132.58	D2S1328	-5.86	-4.82	-2.85	-1.97	-1.10	-0.62	-0.28
	142.83	D2S114	-5.12	-3.08	-1.78	-1.22	-0.69	-0.39	-0.18
	149.89	D2S1326	-4.72	-2.66	-1.40	-0.90	-0.47	-0.27	-0.13
	161.23	D2S142	-5.95	-4.46	-2.49	-1.65	-0.86	-0.46	-0.20
	169.41	D2S2330	-10.47	-6.06	-3.43	-2.31	-1.24	-0.67	-0.29
	173.00	D2S1776	-5.92	-2.51	-1.20	-0.67	-0.24	-0.07	-0.01
	200.43	D2S1384	-2.27	-1.24	-0.61	-0.35	-0.14	-0.05	-0.01
	205.00	D2S1649	-2.39	-1.08	-0.45	-0.22	-0.05	-0.01	-0.00
2q	205.06	D2S2208	-7.49	-4.10	-2.15	-1.34	-0.62	-0.28	-0.10
	210.43	D2S1345	-4.79	-2.45	-1.17	-0.66	-0.25	-0.08	-0.01
	214.70	D2S164	-7.79	-4.40	-2.42	-1.57	-0.78	-0.37	-0.13
	215.30	D2S1371	-4.62	-2.55	-1.30	-0.80	-0.38	-0.20	-0.09
	215.78	D2S434	-7.49	-4.10	-2.16	-1.36	-0.64	-0.30	-0.11
	227.00	D2S1363	-7.49	-4.10	-2.15	-1.35	-0.63	-0.29	-0.10
	240.79	D2S206	-2.54	-1.07	-0.43	-0.20	-0.04	-0.00	0.00
	240.79	D2S1279	-4.67	-2.32	-1.05	-0.55	-0.15	-0.01	0.01
	250.54	D2S338	-5.09	-2.74	-1.45	-0.92	-0.45	-0.23	-0.09
	260.63	D2S125	-4.59	-2.87	-1.53	-0.95	-0.42	-0.16	-0.03

4.3.2.4 Haplotypanalyse für Chromosom 2

Die Haplotypanalyse für Chromosom 2 ist in Abbildung 4-8 dargestellt. Bei fünf der sechs Betroffenen der ersten beiden Generationen (Personen 302, 303, 402, 403, 405) findet sich ein gemeinsamer Haplotyp, der durch die Marker D2S1328, D2S114 und D2S1326 gebildet wird. Lediglich die betroffene Person 305 zeigt diesen gemeinsamen Haplotyp nicht. Betrachtet man nun die Nachkommen der dritten Generation, so fällt auf, dass die betroffene Person 502 diesen Haplotyp ebenfalls nicht zeigt. Da jedoch die beiden nicht betroffenen Personen 501 und 503 diesen Haplotyp zeigen, kann dieser mit sehr großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Die LOD-Werte der Zweipunktanalyse bestätigen diesen Ausschluss durch signifikant negative LOD-Wert von $Z_{max} < -4.72$ ($\theta = 0.00$) für alle drei Marker.

Betrachtet man die Segregation des paternalen Haplotyps der Indexpatientin 302 (blau), fällt ein gemeinsamer Haplotyp mit beiden betroffenen Kindern (402 und 403) auf. Tochter 402 zeigt den kompletten mütterlichen Haplotyp und bei Sohn 403 kam es zwischen den Markern D2S338 und D2S125 am telomeren Ende des langen Arms zu einem Crossing-over. Dieser Haplotyp wird in der dritten Generation von Person 403 komplett an den nicht betroffenen Sohn (503) weitergegeben. Des Weiteren zeigt die ebenfalls nicht betroffene Person 501 einen großen Teil (D2S405 - D2S1391) des paternalen Haplotyps der Indexpatientin, womit die Lokalisation des Krankheitslocus auf Chromosom 2 nach Auswertung der Haplotypanalyse mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden kann.

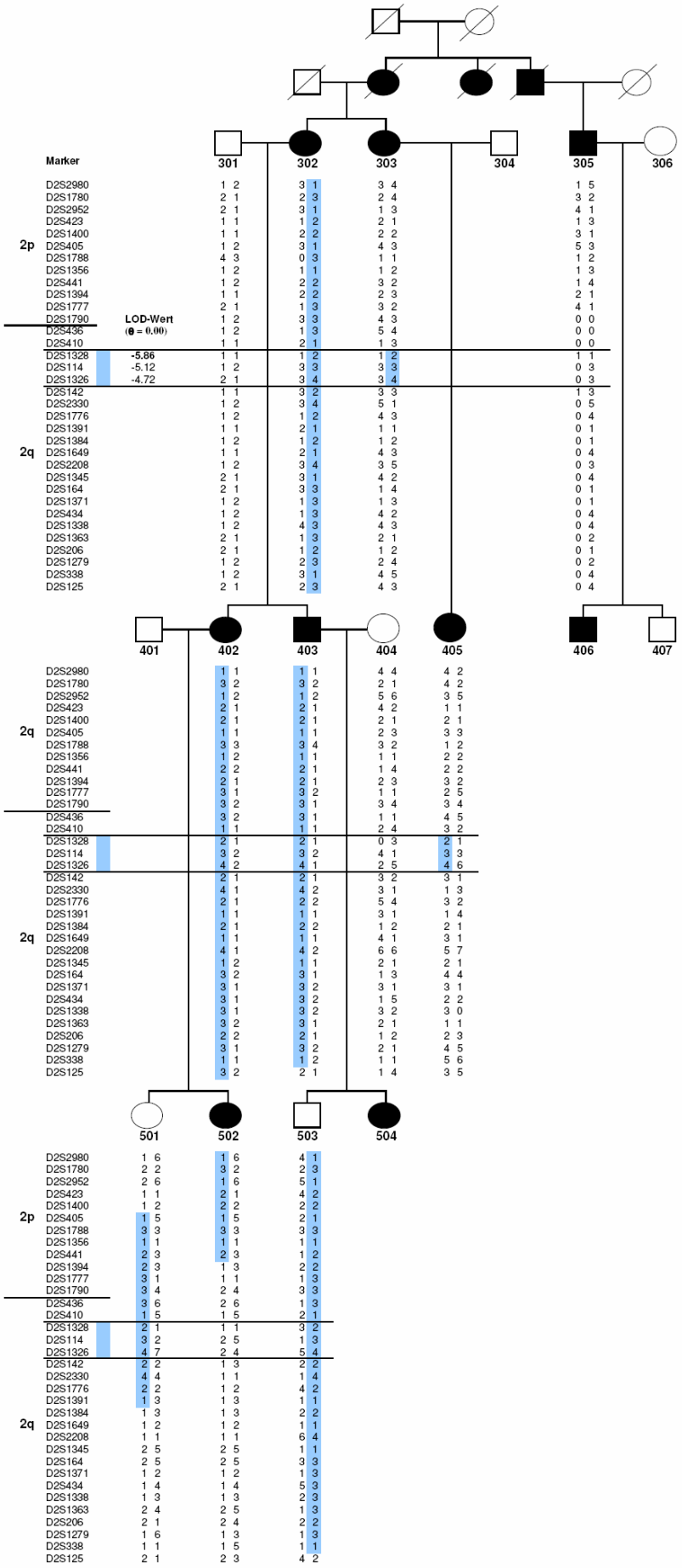

Abbildung 4-8: Haplotypanalyse für Chromosom 2

4.3.2.5 Multimarkeranalyse für Chromosom 2

Die Multimarkeranalyse zeigt für das komplette Chromosom 2 ausschließlich negative LOD-Werte (Abb. 4-9). Im Bereich der vier Mikrosatellitenmarker D2S2980, D2S1780, D2S1400 und D2S405 am telomeren Ende des kurzen Arms wurden nicht signifikant negative LOD-Werte zwischen 0.00 und –2.00 ($\theta = 0.00$) erzielt. Dieser Bereich reicht vom telomeren Ende bis zu dem Marker D2S405 an Position 47.97 cM. Der höchste LOD-Wert von $Z_{max} = - 0.88$ ($\theta = 0.00$) wurde zwischen den beiden Markern D2S1400 und D2S405 an Position 31.26 cM erreicht. Für alle weiteren getesteten Marker auf dem kurzen Arm sowie dem kompletten langen Arm des Chromosoms 2 wurden in der Multimarkeranalyse signifikant negative LOD-Werte von $Z_{max} < - 2.00$ ($\theta = 0.00$) ermittelt.

Auch eine Kopplung der Kandidatengene *HOXD13* und *SDTY1* zum Krankheitslocus konnte durch signifikant negative LOD-Werte von $Z_{max} < -2.00$ ($\theta = 0.00$) ausgeschlossen werden.

Das Ergebnis der Multimarkeranalyse macht eine Lokalisation des Krankheitsgens auf Chromosom 2 sehr unwahrscheinlich und bestätigt die Ergebnisse aus der Zweipunktanalyse und der Haplotypanalyse.

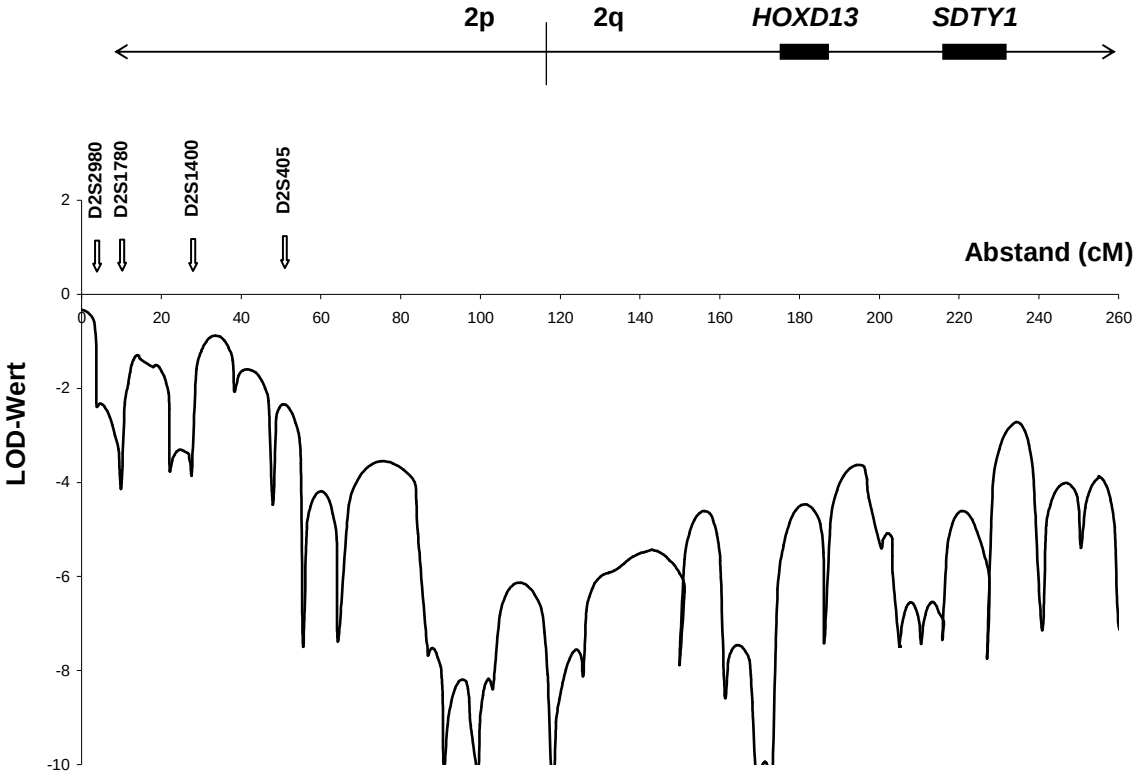

Abbildung 4-9: Multimarkeranalyse für Chromosom 2

4.3.3 Zusammenfassung der Analyse des Chromosoms 2

In Tabelle 4-12 sind alle in dieser Arbeit für Chromosom 2 getesteten Marker zusammengefasst.

Tabelle 4-12: Marker auf Chromosom 2

Chromosom			Rekombinationswerte (θ)						
	cM	Marker	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
	3.76	D2S2980	-1.87	-0.84	-0.25	-0.04	0.08	0.09	0.05
	10.00	D2S1780	-4.15	-2.05	-0.82	-0.35	-0.00	0.08	0.06
	17.88	D2S2952	-1.15	-0.14	0.38	0.51	0.47	0.32	0.15
	22.10	D2S423	-3.97	-2.04	-0.83	-0.37	-0.05	0.02	0.02
	27.60	D2S1400	-4.26	-2.34	-1.10	-0.60	-0.19	-0.04	0.00
2p	47.97	D2S405	-4.87	-1.79	-0.96	-0.58	-0.26	-0.13	-0.06
	55.51	D2S1788	-7.53	-2.70	-1.37	-0.83	-0.36	-0.15	-0.05
	64.29	D2S1356	-2.59	-1.55	-0.88	-0.57	-0.26	-0.10	-0.02
	86.82	D2S441	-4.92	-2.98	-1.68	-1.11	-0.56	-0.28	-0.10
	90.82	D2S1394	-6.23	-4.82	-2.86	-2.00	-1.15	-0.65	-0.28
	99.41	D2S1777	-7.88	-4.88	-2.85	-1.94	-1.07	-0.60	-0.27
	103.16	D2S1790	-7.86	-5.06	-3.05	-2.14	-1.22	-0.67	-0.29
	118.16	D2S436	-10.47	-6.06	-3.43	-2.31	-1.24	-0.67	-0.29
	125.81	D2S410	0.38	0.36	0.32	0.26	0.15	0.06	0.01
	132.58	D2S1328	-5.86	-4.82	-2.85	-1.97	-1.10	-0.62	-0.28
	142.83	D2S114	-5.12	-3.08	-1.78	-1.22	-0.69	-0.39	-0.18
	149.89	D2S1326	-4.72	-2.66	-1.40	-0.90	-0.47	-0.27	-0.13
	161.23	D2S142	-5.95	-4.46	-2.49	-1.65	-0.86	-0.46	-0.20
	169.41	D2S2330	-10.47	-6.06	-3.43	-2.31	-1.24	-0.67	-0.29
	173.00	D2S1776	-5.92	-2.51	-1.20	-0.67	-0.24	-0.07	-0.01
	186.21	D2S1391	0.42	0.41	0.36	0.29	0.17	0.07	0.01
	200.43	D2S1384	-2.27	-1.24	-0.61	-0.35	-0.14	-0.05	-0.01
2q	205.00	D2S1649	-2.39	-1.08	-0.45	-0.22	-0.05	-0.01	-0.00
	205.06	D2S2208	-7.49	-4.10	-2.15	-1.34	-0.62	-0.28	-0.10
	210.43	D2S1345	-4.79	-2.45	-1.17	-0.66	-0.25	-0.08	-0.01
	214.70	D2S164	-7.79	-4.40	-2.42	-1.57	-0.78	-0.37	-0.13
	215.30	D2S1371	-4.62	-2.55	-1.30	-0.80	-0.38	-0.20	-0.09
	215.78	D2S434	-7.49	-4.10	-2.16	-1.36	-0.64	-0.30	-0.11
	215.78	D2S1338	-0.02	-0.00	0.06	0.09	0.09	0.05	0.01
	227.00	D2S1363	-7.49	-4.10	-2.15	-1.35	-0.63	-0.29	-0.10
	240.79	D2S206	-2.54	-1.07	-0.43	-0.20	-0.04	-0.00	0.00
	240.79	D2S1279	-4.67	-2.32	-1.05	-0.55	-0.15	-0.01	0.01
	250.54	D2S338	-5.09	-2.74	-1.45	-0.92	-0.45	-0.23	-0.09
	260.63	D2S125	-4.59	-2.87	-1.53	-0.95	-0.42	-0.16	-0.03

4.4 Exemplarische Darstellung der Gewinnung von Genotypdaten durch Mikrosatellitenmarker

Vor der Durchführung einer Kopplungsanalyse müssen die DNA-Fragmente der Marker mittels PCR-Methode vervielfältigt werden. Zur quantitativen Darstellung der PCR-Produkte erfolgt eine Auftrennung in einem 2%igen Agarosegel (Abb. 4-10).

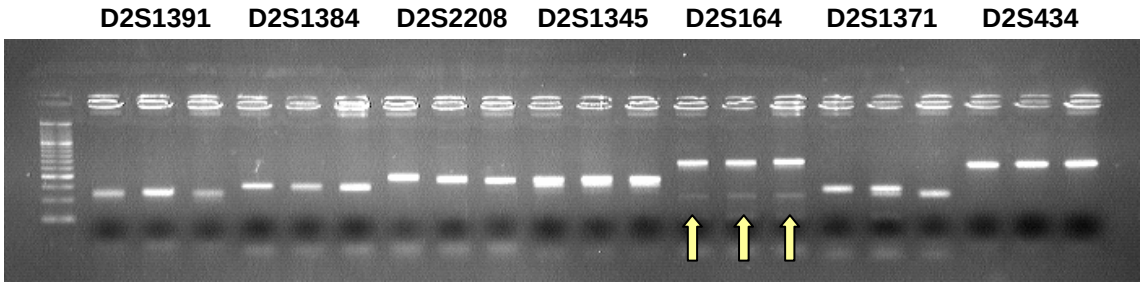

Abbildung 4-10: Agarosegelelektrophorese
Quantitative Darstellung der Produkte aus den PCR-Reaktionen für sieben Marker auf Chromosom 2 in einer Agarosegelelektrophorese. Die gelben Pfeile markieren unspezifische akzessorische DNA-Fragmente

Das Erstellen und Verifizieren von Genotypdaten für eine Kopplungsanalyse anhand der DNA-Fragmente aus den PCR-Reaktionen erfordert drei Arbeitsschritte. Dies wird im Folgenden exemplarisch für die vier Tetranukleotidmarker D2S1780, D2S405, D2S2952 und D2S441 von Chromosom 2 dargestellt. Hierbei handelt es sich jedoch nicht um die in Abbildung 4-10 gezeigt Marker.

Im ersten Schritt erfolgt eine elektrophoretische Auftrennung der amplifizierten DNA-Fragmente in einem automatisierten DNA-Sequenzierer. Durch Fluoreszenzmarkierung der Primer kann ein Argonlaser die DNA-Fragmente beim Passieren des Lesefensters detektieren, die Daten werden digitalisiert und in ein Gelbild umgewandelt (Abb. 4-11a).

Im zweiten Schritt werden die ermittelten Rohdaten mithilfe der Software Genotyper ausgewertet. Dieses Programm wandelt die DNA-Fragmente des Gelbilds in Peaks (Elektropherogramme) um. Ein im Gel mitgeführter interner Größenstandard ermöglicht die Umrechnung der Laufzeit der Fragmente in die exakten Allellängen. Diese Allellängen (Genotypdaten) werden dann durch Angleichung an einen Referenzwert standardisiert. So werden minimale Lesefehler des Lasers korrigiert (Abb. 4-12).

Im letzten Schritt werden die errechneten Genotypdaten in einen Stammbaum der Familie übertragen. Die Segregation der Allele kann so bildlich nachvollzogen und Ungereimtheiten innerhalb des Stammbaums ausfindig gemacht werden (Abb. 4-13). Wenn Widersprüchlichkeiten innerhalb des Stammbaums ausgeschlossen sind, können die Genotypdaten in die Kopplungsanalysen eingehen.

Abb. 4-11a

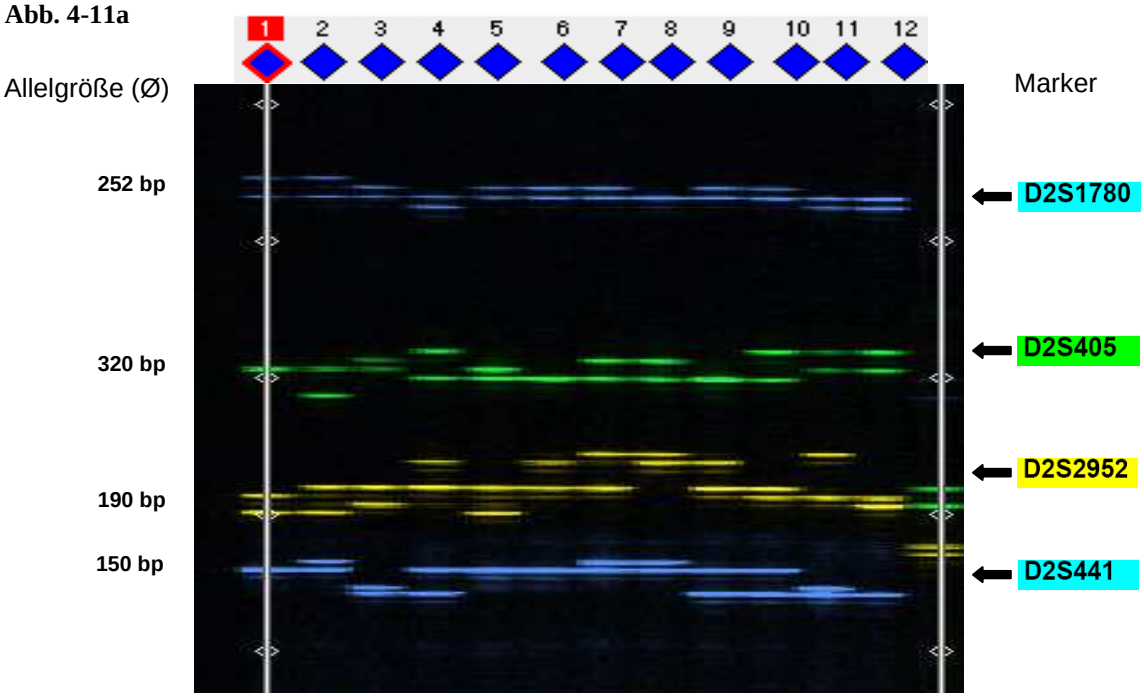

Abb. 4-11b

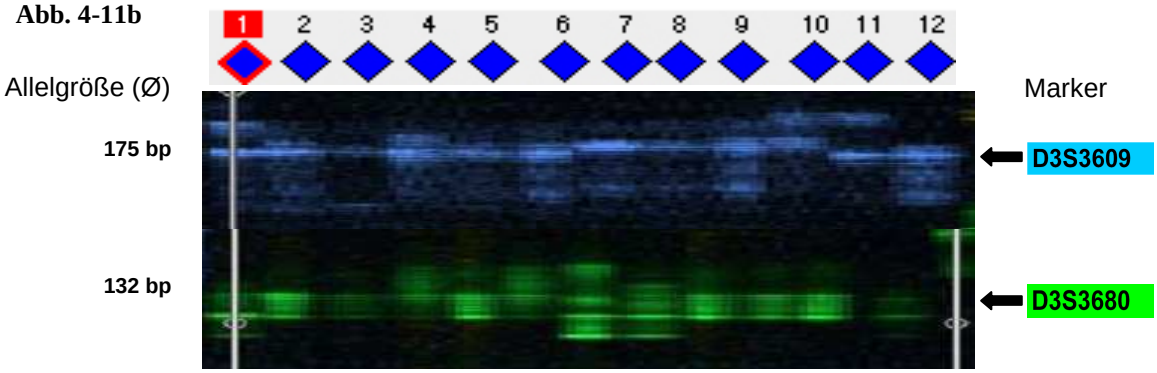

Abbildung 4-11a: Gelbild mit vier Tetranukleotidmarkern von Chromosom 2

DNA-Fragmente von 12 Individuen für die vier Tetranukleotidmarker D2S1780, D2S405, D2S2952, D2S441. Dieses Gelbild wurde mit der GeneScan-Software erstellt. Links: Allelgrößen in bp, rechts: Bezeichnungen der Marker

Abbildung 4-11b: Geldbild mit zwei Dinukleotidmarkern von Chromosom 3

Zum Vergleich mit den Tetranukleotidmarkern aus Abbildung 4-11a sind hier die beiden Dinukleotidmarker D3S3609 und D3S3680 abgebildet. Vergleicht man die DNA-Fragmente der unterschiedlichen Markertypen, wird deutlich, dass die einzelnen Allele der Tetranukleotidmarker wesentlich klarer identifiziert werden können als die Allele der Dinukleotidmarker. Links: Allelgrößen in bp, rechts: Bezeichnungen der Marker

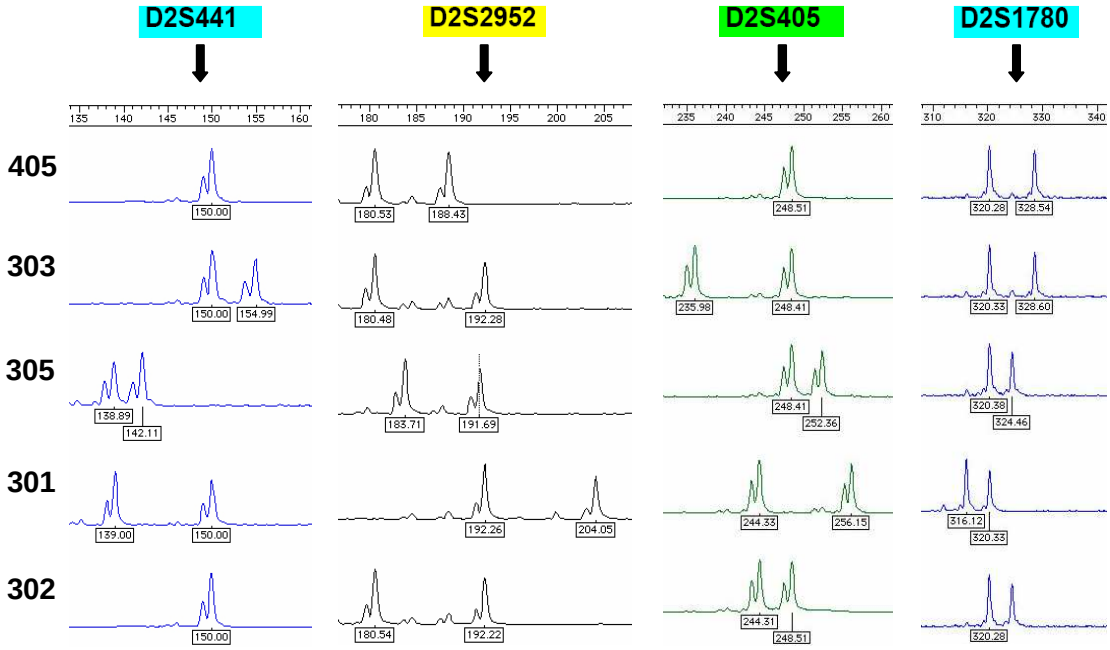

Abbildung 4-12: Elektropherogramme

Diese Abbildung zeigt die Elektropherogramme der vier Marker aus Abbildung 4-11a für jeweils fünf Individuen. Die Allelgrößen stehen in den kleinen Kästchen unter den Peaks. Diese Elektropherogramme wurden mit der Software Genotyper erzeugt

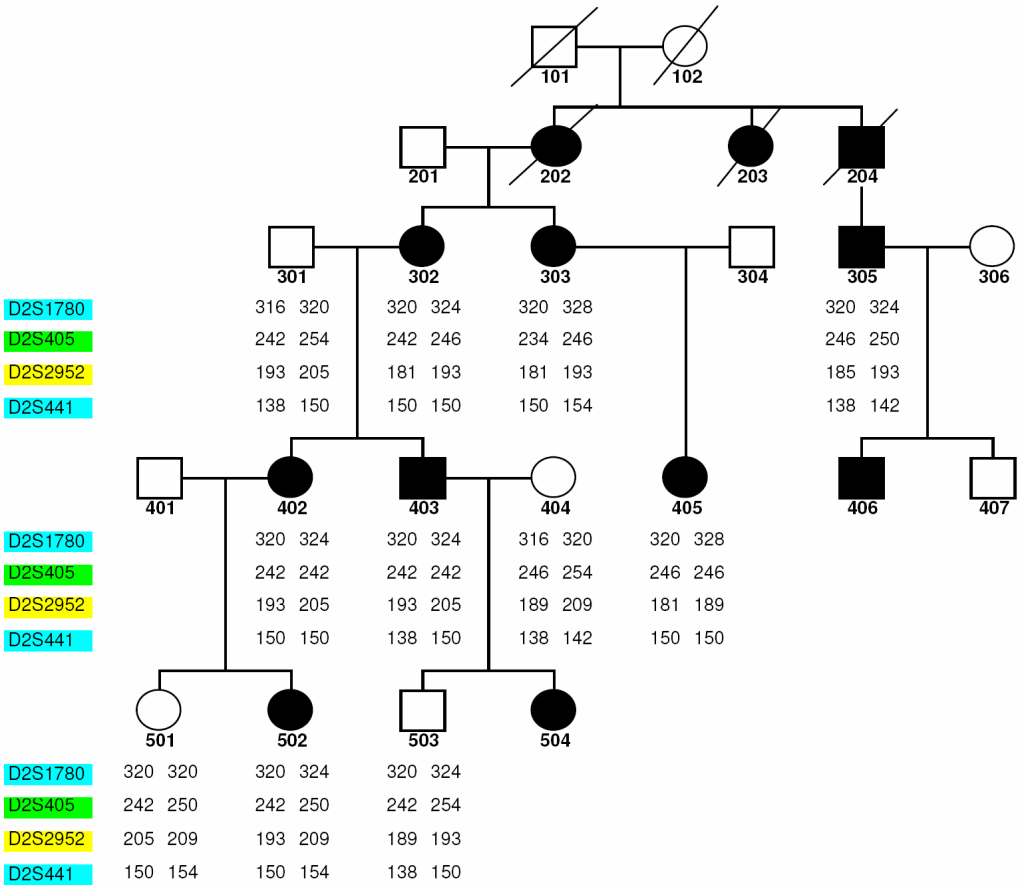

Abbildung 4-13: Stammbaum

Die Genotypdaten wurden nach Angleichen an den Referenzwert in einen Stammbaum übertragen, um die Segregation der Allele bildlich nachvollziehen zu können

4.5 Chromosom 3

4.5.1 Testung des Kandidatengenlocus 3p21.31

Auf dem kurzen Arm von Chromosom 3 liegt der 3p21.31-Locus (Abb. 4-14). Mutationen innerhalb dieses Locus verursachen eine Zygodaktylie. Ein Gen konnte bisher nicht identifiziert werden.

Für den Ausschluss des Locus 3p21.31 wurden die beiden Marker D3S2409 und D3S3666 sowie ein proximaler (D3S1766) und vier distale Marker (D3S3582, D3S3597, D3S3647, D3S3564) getestet. Alle sieben Marker liegen in einem Intervall von 10.7 cM auf dem kurzen Arm von Chromosom 3 (Tab. 4-13).

Für alle Marker wurden signifikant negative LOD-Werte zwischen $Z_{max} = -4.06$ und $Z_{max} = -7.16$ ($\theta = 0.00$) ermittelt. Eine Kopplung dieser Region zum Krankheitslocus kann daher ausgeschlossen werden.

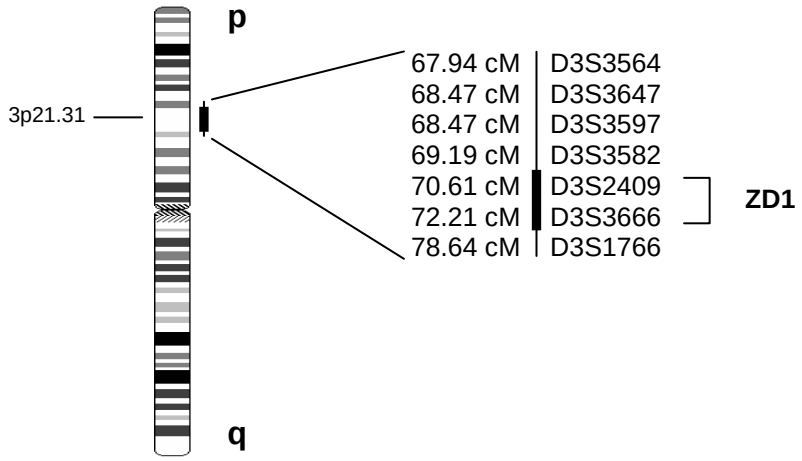

Abbildung 4-14: Chromosom 3
Für Locus 3p21.31 wurden die beiden Marker D3S2409 und D3S3666 sowie fünf flankierende Marker getestet. Links neben den Markernamen ist die Lokalisation der Marker in cM angegeben

Tabelle 4-13: Chromosom 3. LOD-Werte im Bereich des **Locus 3p21.31**

Phänotyp			Rekombinationswerte (θ)						
	cM	Marker	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
	67,94	D3S3564	-4.06	-0.29	0.30	0.47	0.51	0.40	0.23
	68,47	D3S3647	-7.16	-2.46	-1.16	-0.63	-0.19	-0.01	0.04
	68,47	D3S3597	-6.40	-1.76	-0.52	-0.06	0.23	0.27	0.18
	69,19	D3S3582	-4.89	-1.24	-0.55	-0.27	-0.03	0.04	0.05
ZD1	70,61	D3S2409	-4.86	-1.20	-0.52	-0.25	-0.02	0.05	0.05
ZD1	72,21	D3S3666	-4.25	-0.60	0.03	0.26	0.38	0.34	0.21
	78,64	D3S1766	-4.42	-0.77	-0.11	0.12	0.28	0.27	0.17

4.5.2 Genotypisierung des gesamten Chromosoms 3

Chromosom 3 hat eine Größe von 228.14 cM. Nach Ausschluss des 3q21.31-Locus wurde das gesamte Chromosom mit einem durchschnittlichen Intermarkerabstand von 10 cM getestet. Da auch auf Chromosom 3 nicht für alle zur Verfügung stehenden Marker DNA-Fragmente amplifiziert werden konnten, entstanden an zwei Loci Intermarkerabstände von mehr als 15 cM. Diese Loci liegen zwischen den Markern D3S1304 - D3S3038 (22.48 cM) und D3S1744 - D3S1763 (15.50 cM).

Für die Kopplungsanalysen standen somit insgesamt 31 Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 3 zur Verfügung.

4.5.2.1 Mikrosatellitenmarker mit positiven LOD-Werten $Z_{max} > 0.00$

Für sieben der 31 getesteten Marker wurden positive LOD-Werte $Z_{max} > 0.00$ ($\theta = 0.00$) ermittelt. Die Marker D3S1285, D3S2406, D3S1603, D3S2459 und D3S3045 bilden einen Haplotyp und erstrecken sich über ein Intervall von 32.98 cM über den kurzen und den langen Arm des Chromosoms. Dieser Haplotyp ist in Tabelle 4-14 durch einen schwarzen Balken gekennzeichnet. In der Haplotypanalyse zeigte sich, dass drei dieser Marker (D3S1603, D3S2459, D3S3045) einen gemeinsamen Haplotyp unter allen Betroffenen bilden (Abb. 4-17). Dieser gemeinsame Haplotyp ist in Tabelle 4-14 durch einen grauen Balken gekennzeichnet.

Tabelle 4-14: Chromosom 3. Marker mit positiven LOD-Werten $Z_{max} > 0.00$

Chromosom			Rekombinationswerte (θ)						
	cM	Marker	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
	61.51	D3S1768	1,08	1,06	0.97	0.85	0.61	0.39	0.18
	91.18	D3S1285	0.58	0.56	0.48	0.38	0.21	0.09	0.02
3p	102.64	D3S2406	1,03	1,01	0.91	0.78	0.54	0.33	0.14
	115.09	D3S1603	0.69	0.66	0.57	0.46	0.26	0.12	0.03
	119.09	D3S2459	1,24	1,21	1,09	0.95	0.66	0.39	0.17
3q	124.16	D3S3045	1,48	1,45	1,33	1,17	0,86	0,55	0,26
	176.54	D3S1763	1,01	0,98	0,89	0,78	0,55	0,34	0,15

(Der schwarze Balken markiert einen Haplotyp aus fünf getesteten Markern mit positiven LOD-Werten, der graue Balken einen Haplotyp, den alle betroffenen Personen zeigen)

Für den Mikrosatellitenmarker D3S1768 wurde ein positiver LOD-Wert von $Z_{max} = 1.08$ ($\theta = 0.00$) ermittelt, die Typisierung der Familienmitglieder zeigte für diesen Marker vier Allele (194 bp, 198 bp, 202 bp, 214 bp). Die Indexpatientin ist heterozygot für die Allele 194 bp - 198 bp, die übrigen Betroffenen sind ebenfalls Träger des Allels 198 bp. Neben den Betroffenen zeigen auch zwei nicht betroffene Personen (501 und 503) das Allel 198 bp. Die nicht betroffene Person 503 hat das

Allel 198 bp vom betroffenen Vater oder von der nicht betroffenen Mutter erhalten, die das Allel 198 bp neu in den Stammbaum eingebracht hat. Somit ist diese Meiose nicht informativ. Bei der nicht betroffenen Person 501 ist ebenfalls keine Aussage darüber möglich, ob das Allel 198 bp vom (nicht typisierten) Vater 401 oder von der betroffenen Mutter 402 weitergegeben wurde. Somit kann eine Kopplung dieses Markers zum Krankheitslocus nicht ausgeschlossen werden (Abb. 4-15).

Der Mikrosatellitenmarker D3S2406 erreichte einen LOD-Wert von $Z_{max} = 1.03$ ($\theta = 0.00$). Die getesteten Familienmitglieder zeigen für diesen Marker sechs Allele (322 bp, 326 bp, 334 bp, 338 bp, 342 bp, 350 bp). Die Indexpatientin 302 ist heterozygot für die Allele 322 bp - 338 bp. Neben der Indexpatientin 302 sind auch fünf weitere betroffene Personen (303, 305, 402, 403, 502) Träger des Allels 322 bp. Die betroffene Person 402 ist homozygote Allelträgerin, ihre nicht betroffene Tochter 501 ist somit ebenfalls Trägerin, wobei keine Aussage darüber möglich ist, ob es sich bei Allel 322 bp der Person 501 um das großmütterliche Allel (Indexpatientin) handelt. Das Fehlen des Allels 322 bp bei der betroffenen Person 405 macht eine Kopplung zum Krankheitslocus unwahrscheinlich (Abb. 4-15).

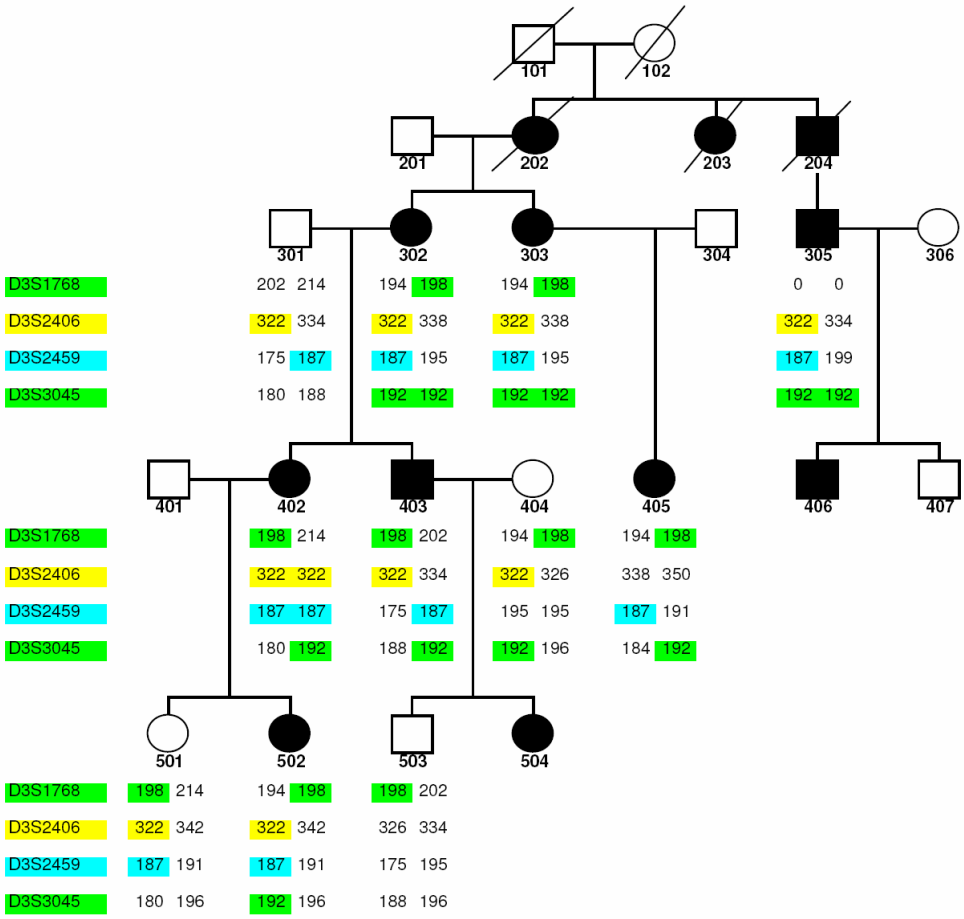

Abbildung 4-15: Genotypdaten Chromosom 3
Dargestellt sind die Genotypdaten der vier Marker D3S1766, D3S2406, D3S2459 und D3S3045 auf Chromosom 3

Für den Marker D3S2459 wurde ein maximaler LOD-Wert von $Z_{max} = 1.24$ ($\theta = 0.00$) erreicht, insgesamt zeigen die getesteten Familienmitglieder für diesen Marker fünf Allele (175 bp, 187 bp, 191 bp, 195 bp, 199 bp). Alle Betroffenen sind Träger des Allels 187 bp, während die betroffene Person 402 homozygote Allelträgerin ist. Beide Kinder (501 nicht betroffen, 502 betroffen) dieser Person sind somit obligate Träger eines Allels mit 187 bp. Es ist jedoch keine Aussage darüber möglich, ob es sich bei den Allelen der Kinder um das großväterliche Allel oder das großmütterliche Allel (Indexpatientin) handelt. Diese beiden Meiosen sind somit nicht informativ. Die nicht betroffene Person 503 trägt das Allel 187 bp nicht. Somit ist eine Kopplung dieses Markers zum Krankheitslocus möglich (Abb. 4-15).

Der Mikrosatellitenmarker D3S3045 erzielte mit $Z_{max} = 1.48$ ($\theta = 0.00$) den höchsten LOD-Wert aller getesteten Marker in dieser Arbeit. Die typisierten Familienmitglieder zeigen für diesen Tetranukleotidmarker die fünf Allele 180 bp, 184 bp, 188 bp, 192 bp und 196 bp, wobei das Allel 192 bp bei allen betroffenen Personen vorkommt. Die nicht betroffenen Personen 501 und 503 tragen das Allel 192 bp nicht (Abb. 4-15). Dennoch konnte der in der Simulation maximal erzielte LOD-Wert von 1.94 ($\theta = 0.00$) für diesen Marker nicht erreicht werden, da die Indexpatientin 302 sowie deren Schwester 303 und der Vetter 305 homozygot für das Allel 192 bp sind und somit drei wichtige Meiosen nicht informativ waren (Abb. 4-16). Eine Kopplung dieses Markers zum Krankheitslocus ist möglich.

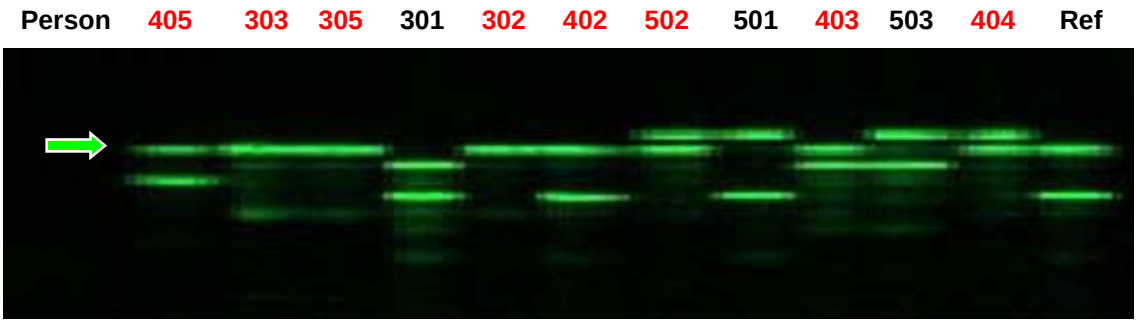

Abbildung 4-16: Tetranukleotidmarker D3S3045
Dieser Marker erzielte den höchsten LOD-Wert in dieser Arbeit mit $Z_{max} = 1.48$ ($\theta = 0.00$). Das Allel 192 bp (grüner Pfeil) findet sich bei allen betroffenen Personen (rote Beschriftung). Die Indexpatientin (302) sowie die beiden Betroffenen 303 und 305 sind homozygote Allelträger. Die nicht betroffene Person 404 zeigt das Allel 192 bp ebenfalls. Sie hat das Allel neu in die Familie eingebracht

Die Typisierung des Mikrosatellitenmarkers D3S1763, der einen LOD-Wert von $Z_{max} = 1.01$ ($\theta = 0.00$) erzielte, zeigte fünf Allele (260 bp, 264 bp, 268 bp, 272 bp, 276 bp). Alle typisierten Personen mit Ausnahme der nicht betroffenen Person 501 sind Träger des Allels 272 bp, vier Personen (303, 403, 404, 503) sind für das betreffende

Allel homozygot. Aufgrund dieser Homozygotie ist eine Aussage über Kopplung des Markers zum Krankheitslocus nicht möglich.

Die Marker D3S1285 ($Z_{max} = 0.58$; $\theta = 0.00$) und D3S1603 ($Z_{max} = 0.69$; $\theta = 0.00$) zeigen jeweils ein gemeinsames Allel bei allen typisierten Familienmitgliedern. Eine Aussage über Kopplung dieser Marker zum Krankheitslocus ist ebenfalls nicht möglich.

4.5.2.2 Mikrosatellitenmarker mit LOD-Werten zwischen 0.00 und –2.00

Von den 31 analysierten Markern ergaben sechs Marker einen LOD-Wert im Bereich zwischen 0.00 und –2.00 ($\theta = 0.00$) (Tab. 4-15). Alle sechs Marker liegen mit $Z_{max} < -1.54$ ($\theta = 0.00$) nahe der Signifikanzgrenze von $Z_{max} < -2.00$ ($\theta = 0.00$). Eine Kopplung dieser Marker zum Krankheitslocus kann mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Tabelle 4-15: Chromosom 3. Marker mit LOD-Werten zwischen 0.00 und -2.00

Chromosom			Rekombinationswerte (θ)						
	cM	Marker	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
3p	18.79	D3S1560	-1.58	-0.69	-0.12	0.05	0.14	0.10	0.04
	134.64	D3S2460	-1.78	-0.89	-0.33	-0.14	-0.03	-0.02	-0.01
	181.87	D3S3053	-1.54	-0.32	0.25	0.43	0.48	0.39	0.22
3q	188.29	D3S2427	-1.60	-0.71	-0.11	0.10	0.24	0.23	0.14
	203.28	D3S2436	-1.83	-0.84	-0.24	-0.04	0.06	0.06	0.03
	215.84	D3S2418	-1.98	-0.96	-0.35	-0.13	0.01	0.04	0.03

4.5.2.3 Mikrosatellitenmarker mit LOD-Werten $Z_{max} < -2.00$

LOD-Werte $Z_{max} < -2.00$ bei einem Rekombinationswert von $\theta = 0.00$ gelten als signifikant für den Ausschluss einer Kopplung zum Krankheitslocus. Von den 31 getesteten Mikrosatellitenmarkern zeigen 18 Marker einen signifikant negativen LOD-Wert von $Z_{max} < -2.00$ ($\theta = 0.00$). Die LOD-Werte bleiben auch bei einer Rekombinationhäufigkeit von $\theta = 0.40$ negativ bzw. nahe dem Wert 0. Somit kann ein großer Teil des Chromosoms 3 mit Ausnahme des Intervalls 91.18 cM bis 124.16 cM, in dem fünf Marker positive LOD-Werte zeigen, bereits in der Zweipunktanalyse mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden (Tab. 4-16).

Tabelle 4-16: Chromosom 3. Marker mit negativen LOD-Werten $Z_{max} < -2.00$

Chromosom			Rekombinationswerte (θ)						
	cM	Marker	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
	14.46	D3S3050	-7.16	-4.27	-2.32	-1.50	-0.73	-0.35	-0.12
	22.33	D3S1304	-9.92	-5.45	-2.86	-1.79	-0.83	-0.38	-0.14
	36.10	D3S3680	-2.57	-1.53	-0.88	-0.61	-0.34	-0.19	-0.09
	44.81	D3S3038	-9.87	-5.79	-3.16	-2.02	-0.97	-0.44	-0.14
	57.92	D3S2432	-6.93	-3.67	-1.74	-0.97	-0.31	-0.05	0.03
3p	67.94	D3S3564	-4.06	-0.29	0.30	0.47	0.51	0.40	0.23
	68.47	D3S3647	-7.16	-2.46	-1.16	-0.63	-0.19	-0.01	0.04
	68.47	D3S3597	-6.40	-1.76	-0.52	-0.06	0.23	0.27	0.18
	69.19	D3S3582	-4.89	-1.24	-0.55	-0.27	-0.03	0.04	0.05
	70.61	D3S2409	-4.86	-1.20	-0.52	-0.25	-0.02	0.05	0.05
	72.21	D3S3666	-4.25	-0.60	0.03	0.26	0.38	0.34	0.21
	78.64	D3S1766	-4.42	-0.77	-0.11	0.12	0.28	0.27	0.17
	138.00	D3S4009	-4.77	-2.82	-1.49	-0.92	-0.42	-0.19	-0.07
	151.49	D3S3528	-4.08	-3.78	-2.11	-1.32	-0.63	-0.30	-0.11
3q	161.04	D3S1744	-6.80	-2.54	-1.25	-0.73	-0.29	-0.10	-0.02
	195.60	D3S3609	-3.77	-1.86	-0.66	-0.21	0.07	0.12	0.07
	209.48	D3S2398	-6.76	-3.80	-1.91	-1.14	-0.50	-0.22	-0.08
	224.88	D3S1311	-4.64	-2.62	-1.33	-0.83	-0.40	-0.21	-0.09

4.5.2.4 Haplotypanalyse für Chromosom 3

Die Haplotypanalyse zeigt einen gemeinsamen Haplotyp, der bei allen betroffenen Personen sowie der nicht betroffenen Person 501 zu finden ist. Dieser Haplotyp wird aus den drei Markern D3S1603, D3S2459, D3S3045 gebildet und erstreckt sich über ein Intervall von 9.07 cM im Bereich des Zentromers über den langen und kurzen Arm des Chromosoms (Abb. 4-17).

Die nicht betroffene Person 501 zeigt für Marker D3S3045 ein anderes Allel als die anderen betroffenen Personen. Dies erklärt den hohen LOD-Wert von $Z_{max} = 1.48$ ($\theta = 0.00$) für diesen Marker.

Eine Kopplung des Phänotyps zu diesem Haplotyp, insbesondere zu dem Marker D3S3045, ist nach dem Resultat der Haplotypanalyse möglich.

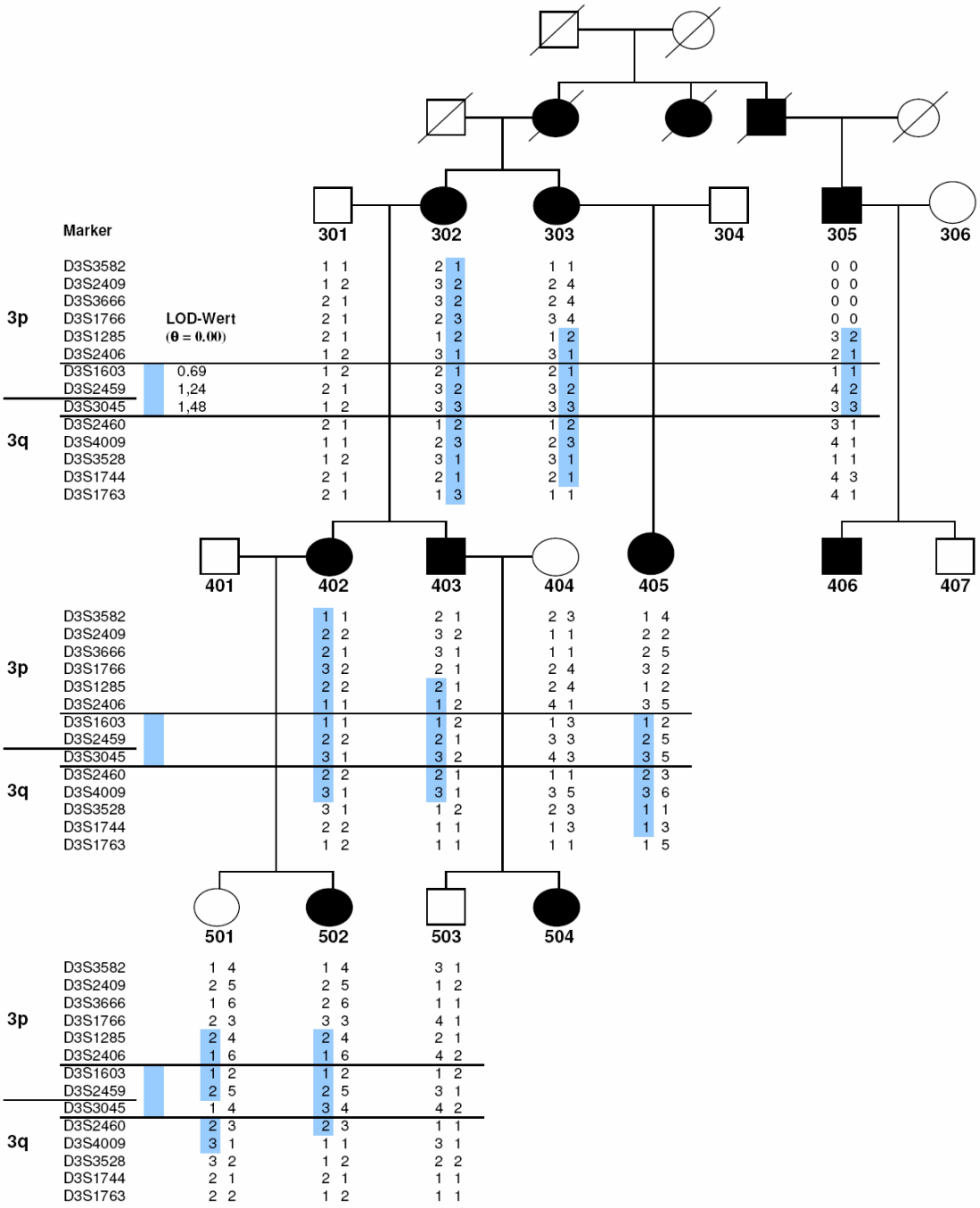

Abbildung 4-17: Haplotypanalyse für Chromosom 3

4.5.2.5 Multimarkeranalyse für Chromosom 3

Die Multimarkeranalyse für Chromosom 3 zeigt positive LOD-Werte in einem Intervall zwischen 80 cM und 132 cM, welches sich über den kurzen und den langen Arm des Chromosoms erstreckt. Dieses Intervall entspricht den Markern D3S1285 - D3S3045 und wird eingegrenzt durch die Marker D3S1766 und D3S2460 (Abb. 4-18). Der maximale LOD-Wert der Multimarkeranalyse für Chromosom 3 liegt bei Position 124 cM auf dem kurzen Arm (Z_{max} = 2.24; θ = 0.00). Diese Position entspricht dem Marker D3S3045, der auch in der Zweipunktanalyse den höchsten LOD-Wert von Z_{max} = 1.48 (θ = 0.00) erreichte. Ein weiterer minimal positiver LOD-Wert liegt mit Z_{max} = 0.08 (θ = 0.00) an Position 173 cM. Diese Position entspricht dem Marker D3S1763, der in der Zweipunktanalyse einen positiven LOD-Wert von Z_{max} = 1.01 (θ = 0.00) erreichte.

Im Bereich des ZD1-Locus bei 71 cM zeigt die Multimarkeranalyse ausschließlich negative LOD-Werte von Z_{max} < -1.81 (θ = 0.00), die nahe der Signifikanzgrenze liegen. Es ist daher sehr unwahrscheinlich, dass dieser Kandidatenlocus und die Kamptodaktylie gekoppelt vererbt werden.

Die Lokalisation des Krankheitsgens im Bereich zwischen 80 cM und 132 cM ist nach Auswertung der Multimarkeranalyse möglich. Eine Lokalisation außerhalb dieses Intervalls ist aufgrund der negativen LOD-Werte sehr unwahrscheinlich.

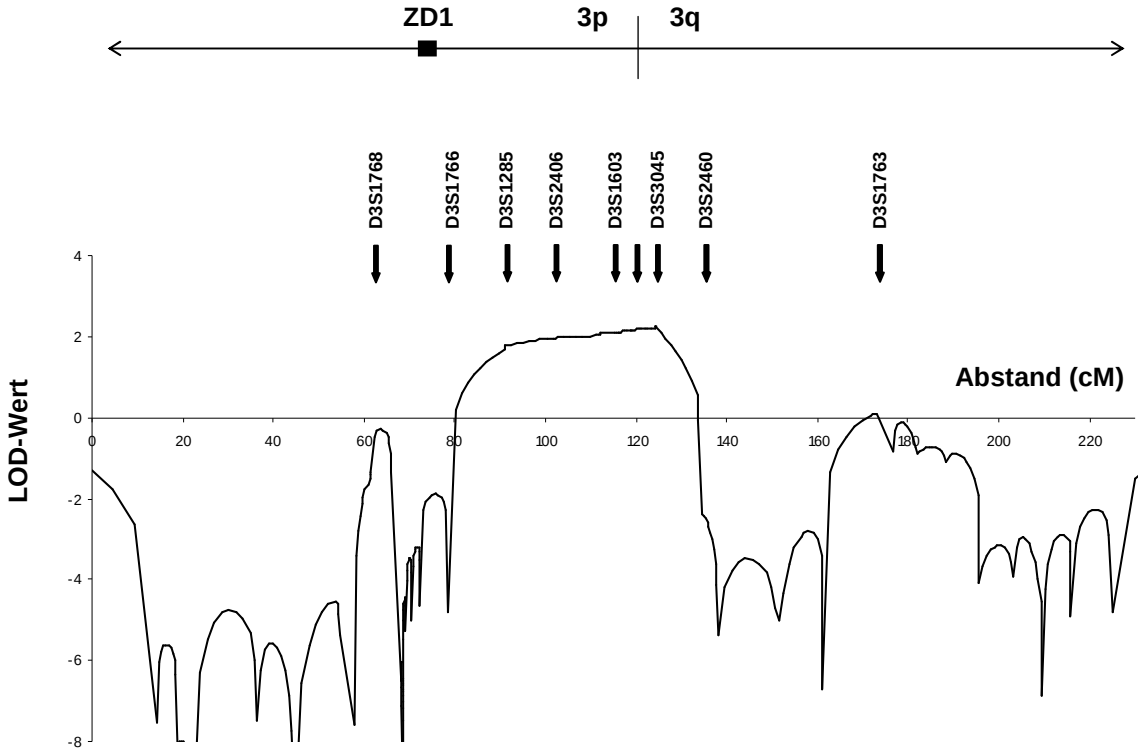

Abbildung 4-18: Multimarkeranalyse für Chromosom 3

4.5.3 Identifikation eines Kandidatenlocus auf Chromosom 3

Ein zweiter, höchst interessanter Kandidatenlocus konnte auf Chromosom 3 identifiziert werden. Dieser liegt ebenfalls im Bereich des Zentromers und erstreckt sich von Position 80 cM auf dem kurzen Arm bis Position 134 cM auf dem langen Arm über ein Intervall von 54 cM. In diesem Bereich konnten positive LOD-Werte für insgesamt fünf Marker erreicht werden (D3S1285, D3S2406, D3S1603, D3S2459, D3D3045; Tab. 4-14), wobei der Marker D3S3045 mit $Z_{max} = 1.48$ ($\theta = 0.00$) den höchsten in dieser Arbeit erreichten LOD-Wert zeigt. Leider war dieser Marker nicht für alle Meiosen informativ, da drei wichtige Personen (302, 303, 305) homozygot für das Allel 192 bp (Abb. 4-15) typisieren. In der Multimarkeranalyse konnte für diesen Marker ein LOD-Wert von $Z_{max} = 2.24$ ($\theta = 0.00$) erreicht werden (Abb. 4-18).

Die Haplotypanalyse zeigte, dass die drei Marker D3S1603, D3S2459 und D3S3045 einen gemeinsamen Haplotyp unter allen betroffenen Personen bilden, der jedoch auch zu einem Teil bei der nicht betroffenen Person 501 zu beobachten ist (Abb. 4-17). Lediglich der Marker D3S3045 zeigt bei der Person 501 ein anderes Allel. Dies erklärt, warum gerade der Marker D3S3045 trotz Homozygotie der Personen 302, 303 und 305 einen hohen positiven LOD-Wert erreichen konnte.

Nach den Ergebnissen der Zweipunktanalyse, der Multimarkeranalyse und der Haplotypanalyse ist eine Kopplung des Krankheitslocus zu dieser Kandidatenregion unter allen fünf getesteten Chromosomen am wahrscheinlichsten.

4.5.4 Zusammenfassung der Analyse des Chromosoms 3

In Tabelle 4-17 sind alle in dieser Arbeit für Chromosom 3 getesteten Marker zusammengefasst.

Tabelle 4-17: Marker auf Chromosom 3

Chromosom			Rekombinationswerte (θ)						
	cM	Marker	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
	14.46	D3S3050	-7.16	-4.27	-2.32	-1.50	-0.73	-0.35	-0.12
	18.97	D3S1560	-1.58	-0.69	-0.12	0.05	0.14	0.10	0.04
	22.33	D3S1304	-9.92	-5.45	-2.86	-1.79	-0.83	-0.38	-0.14
	36.10	D3S3680	-2.57	-1.53	-0.88	-0.61	-0.34	-0.19	-0.09
	44.81	D3S3038	-9.87	-5.79	-3.16	-2.02	-0.97	-0.44	-0.14
	57.92	D3S2432	-6.93	-3.67	-1.74	-0.97	-0.31	-0.05	0.03
	61.52	D3S1768	1.08	1.06	0.97	0.85	0.61	0.39	0.18
	67.94	D3S3564	-4.06	-0.29	0.30	0.47	0.51	0.40	0.23
3p	68.47	D3S3647	-7.16	-2.46	-1.16	-0.63	-0.19	-0.01	0.04
	68.47	D3S3597	-6.40	-1.76	-0.52	-0.06	0.23	0.27	0.18
	69.19	D3S3582	-4.89	-1.24	-0.55	-0.27	-0.03	0.04	0.05
	70.61	D3S2409	-4.86	-1.20	-0.52	-0.25	-0.02	0.05	0.05
	72.21	D3S3666	-4.25	-0.60	0.03	0.26	0.38	0.34	0.21
	78.64	D3S1766	-4.42	-0.77	-0.11	0.12	0.28	0.27	0.17
	91.18	D3S1285	0.58	0.56	0.48	0.38	0.21	0.09	0.02
	102.64	D3S2406	1.03	1.01	0.91	0.78	0.54	0.33	0.14
	115.09	D3S1603	0.69	0.66	0.57	0.46	0.26	0.12	0.03
	119.09	D3S2459	1.24	1.21	1.09	0.95	0.66	0.39	0.17
	124.16	D3S3045	1.48	1.45	1.33	1.17	0.86	0.55	0.26
	134.64	D3S2460	-1.78	-0.89	-0.33	-0.14	-0.03	-0.02	-0.01
	138.00	D3S4009	-4.77	-2.82	-1.49	-0.92	-0.42	-0.19	-0.07
	151.49	D3S3528	-4.08	-3.78	-2.11	-1.32	-0.63	-0.30	-0.11
	161.04	D3S1744	-6.80	-2.54	-1.25	-0.73	-0.29	-0.10	-0.02
	176.54	D3S1763	1.01	0.98	0.89	0.78	0.55	0.34	0.15
3q	181.87	D3S3053	-1.54	-0.32	0.25	0.43	0.48	0.39	0.22
	188.29	D3S2427	-1.60	-0.71	-0.11	0.10	0.24	0.23	0.14
	195.60	D3S3609	-3.77	-1.86	-0.66	-0.21	0.07	0.12	0.07
	203.28	D3S2436	-1.83	-0.84	-0.24	-0.04	0.06	0.06	0.03
	209.41	D3S2398	-6.76	-3.80	-1.91	-1.14	-0.50	-0.22	-0.08
	215.84	D3S2418	-1.98	-0.96	-0.35	-0.13	0.01	0.04	0.03
	224.88	D3S1311	-4.64	-2.62	-1.33	-0.83	-0.40	-0.21	-0.09

4.6 Chromosom 10

4.6.1 Testung des Kandidatengenlocus 10p15

Auf dem kurzen Arm von Chromosom 10 liegt auf Locus 10p15 das *KLF6*-Gen, von dem eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des Morbus Dupuytren diskutiert wird (Bayat et al, 2003, b) (Abb. 4-19). Da der Morbus Dupuytren die wichtigste Differentialdiagnose zur Kamptodaktylie darstellt, wurde dieser Locus vor Analyse des kompletten Chromosoms auf Ausschluss getestet.

Für den 10p15-Locus wurden die drei Marker D10S1435, D10S1153 und D10S189 sowie zwei proximal angrenzende Marker (D10S1412, D10S674) typisiert (Tab. 4-18).

Der Mikrosatellitenmarker D10S1435 erreichte einen LOD-Wert von $Z_{max} = 1.36$ ($\theta = 0.00$). Dieser zeigt unter den Familienmitgliedern jedoch lediglich drei Allele (258 bp, 262 bp, 266 bp). Die Personen 302, 303 und 305 sind homozygot für das Allel 258 bp. Somit ist eine Aussage über Kopplung dieses Markers zum Krankheitslocus nicht möglich (Abb. 4-20).

Die Typisierung der beiden Mikrosatellitenmarker D10S1153 und D10S189 ergab signifikant negative LOD-Werte von $Z_{max} < -5.51$ ($\theta = 0.00$). Auch die Testung der beiden proximalen Marker D10S1412 und D10S674 zeigte negative LOD-Werte von $Z_{max} < -1.52$ ($\theta = 0.00$). Eine Kopplung dieser Region zum Krankheitslocus ist somit sehr unwahrscheinlich, kann aber allein anhand der Zweipunktanalyse nicht sicher ausgeschlossen werden.

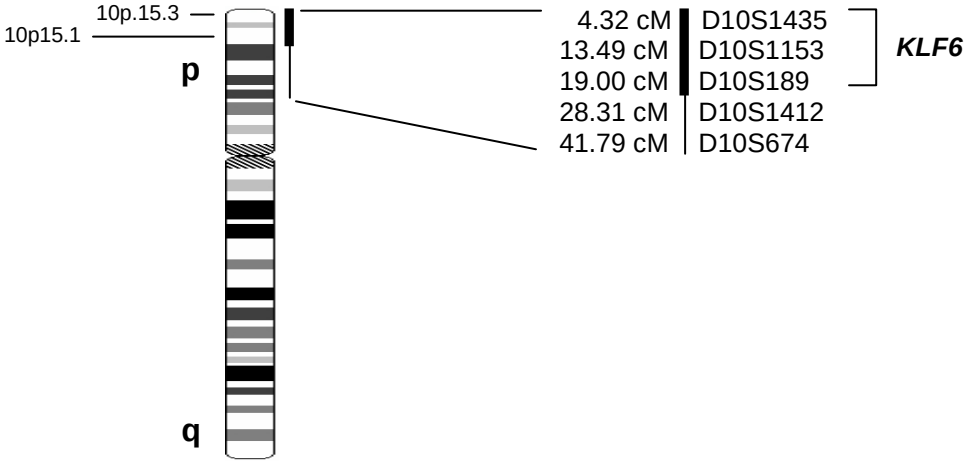

Abbildung 4-19: Chromosom 10
Dargestellt sind drei Mikrosatellitenmarker, die für den 10p15-Locus typisiert wurden, sowie zwei proximal angrenzende Marker. Links neben den Markernamen ist die Lokalisation der Marker in cM angegeben

Tabelle 4-18: Chromosom 10. LOD-Werte im Bereich des **Locus 10p15**

Gen	cM	Marker	Rekombinationswerte (θ) 0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
KLF6	4.32	D10S1435	1.36	1.33	1.21	1.06	0.77	0.48	0.22
	13.49	D10S1153	-6.45	-1.90	-0.65	-0.19	0.13	0.19	0.13
	19.00	D10S189	-5.51	-3.26	-1.91	-1.31	-0.72	-0.38	-0.15
	28.31	D10S1412	-1.52	-0.34	0.24	0.42	0.47	0.38	0.22
	41.79	D10S674	-4.30	-2.59	-1.29	-0.76	-0.27	-0.05	0.02

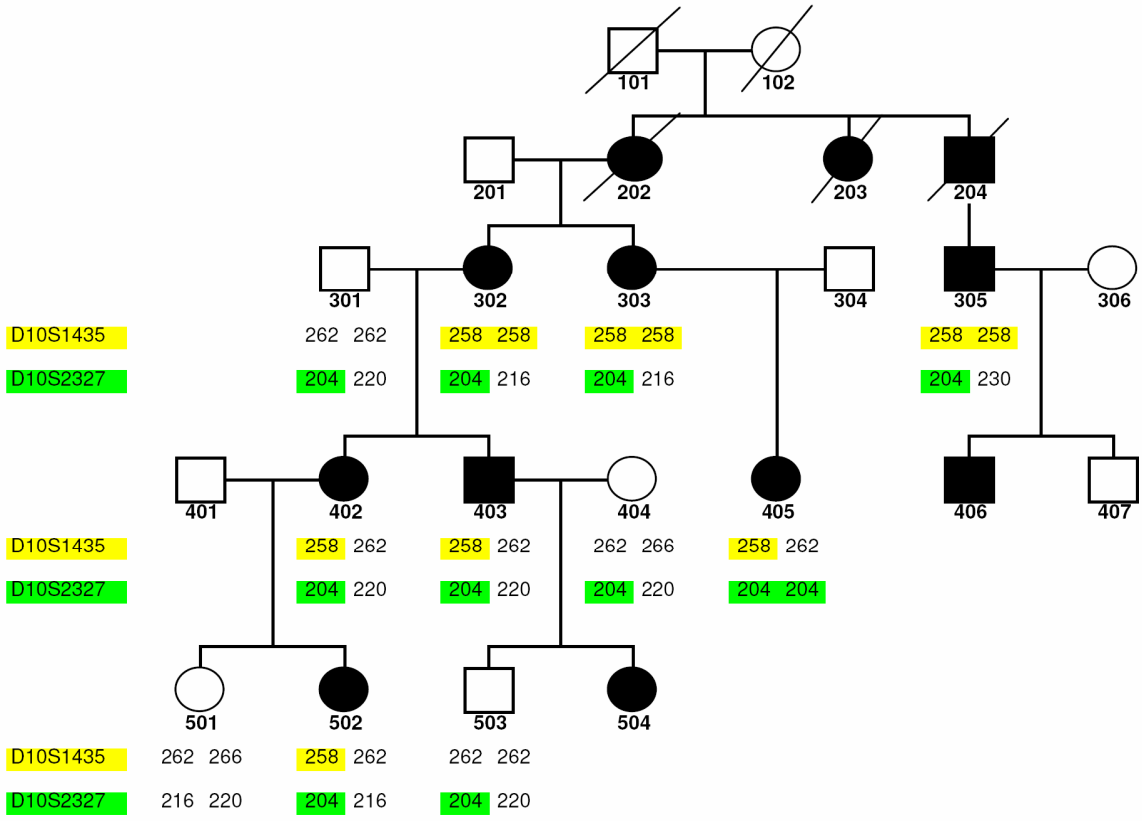

Abbildung 4-20: Genotypdaten Chromosom 10
Dargestellt sind die Genotypdaten der zwei Marker D10S1435 und D10S2327 auf Chromosom 10

4.6.2 Genotypisierung des gesamten Chromosoms 10

Nach Testung des Kandidatenlocus 10q15 wurde das komplette Chromosom mit einer Größe von 173.13 cM mit einem durchschnittlichen Abstand von 10 cM getestet. Der mit 14.67 cM größte Intermarkerabstand findet sich zwischen den Markern D10S1223 und D10S212 am telomeren Ende des langen Arms.

Für die Kopplungsanalysen auf Chromosom 10 standen insgesamt 21 Mikrosatellitenmarker zur Verfügung.

4.6.2.1 Mikrosatellitenmarker mit positiven LOD-Werten $Z_{max} > 0.00$

Lediglich einer der nach Testung des Kandidatenlocus verbliebenen 16 Mikrosatellitenmarker erreichte einen positiven LOD-Wert (D10S2327; $Z_{max} = 1.26$; $\theta = 0.00$) (Tab. 4-19). Dieser Marker zeigt unter den getesteten Personen vier verschiedene Allele (204 bp, 216 bp, 220 bp, 230 bp), wobei alle Familienmitglieder mit Ausnahme der Person 501 Träger des Allels 204 bp sind. Da Person 301 ebenso wie die Indexpatientin 302 das Allel 204 bp trägt, ist keine Aussage über Segregation dieses als Krankheitsallel in Frage kommenden Allels möglich. Somit kann keine Aussage über Kopplung dieses Markers zum Krankheitslocus gemacht werden (Abb. 4-20).

Tabelle 4-19: Chromosom 10. Marker mit positivem LOD-Wert

Chromosom			Rekombinationswerte (θ)						
	cM	Marker	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
10q	100,92	D10S2327	1,26	1,24	1,13	0,99	0.72	0.46	0.22

4.6.2.2 Mikrosatellitenmarker mit LOD-Werten zwischen 0.00 und –2.00

Von den 21 analysierten Markern zeigen sechs Marker einen LOD-Wert im Bereich zwischen 0.00 und –2.00 ($\theta = 0.00$) (Tab. 4-20). Der Marker D10S1220 zeigt einen LOD-Wert von $Z_{max} = -0.02$ ($\theta = 0.00$), eine Aussage über Kopplung zum Krankheitslocus ist nicht möglich. Die anderen fünf getesteten Marker zeigen LOD-Werte von $Z_{max} < -1.10$ ($\theta = 0.00$), eine Kopplung dieser Marker zum Krankheitslocus ist nicht wahrscheinlich.

Tabelle 4-20: Chromosom 10. Marker mit LOD-Werten zwischen 0.00 und –2.00

Chromosom			Rekombinationswerte (θ)						
	cM	Marker	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
10p	28.31	D10S1412	-1.52	-0.34	0.24	0.42	0.47	0.38	0.22
	70.23	D10S1220	-0.02	-0.02	-0.03	-0.03	-0.02	-0.01	-0.00
	80.77	D10S1225	-1.59	-0.58	-0.01	0.15	0.19	0.13	0.05
10q	112.58	D10S1419	-1.10	-0.09	0.43	0.55	0.50	0.34	0.16
	123.70	D10S603	-1.15	-0.15	0.37	0.50	0.46	0.30	0.14
	125.41	D10S1239	-1.79	-0.77	-0.19	0.00	0.11	0.11	0.07

4.6.2.3 Mikrosatellitenmarker mit LOD-Werten $Z_{max} < –2.00$

LOD-Werte von $Z_{max} < -2.00$ bei einem Rekombinationswert von $\theta = 0.00$ gelten als signifikant für den Ausschluss einer Kopplung zum Krankheitslocus. Von den 21 getesteten Mikrosatellitenmarkern zeigen 13 Marker signifikant negative LOD-Werte von $Z_{max} < -2.00$ ($\theta = 0.00$). Die LOD-Werte bleiben auch bei einer

Rekombinationshäufigkeit von $\theta = 0.40$ negativ bzw. nahe dem Wert 0 (Tab. 4-21). Somit kann Chromosom 10 bereits nach Auswertung der Zweipunktanalyse mit großer Wahrscheinlichkeit als Krankheitslocus ausgeschlossen werden.

Tabelle 4-21: Chromosom 10. Marker mit negativen LOD-Werten $Z_{max} < -2.00$

Chromosom			Rekombinationswerte (θ)						
	cM	Marker	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
	13.49	D10S1153	-6.45	-1.90	-0.65	-0.19	0.13	0.19	0.13
	19.00	D10S189	-5.51	-3.26	-1.91	-1.31	-0.72	-0.38	-0.15
3q	41.79	D10S674	-4.30	-2.59	-1.29	-0.76	-0.27	-0.05	0.02
	46.23	D10S1423	-6.14	-2.51	-1.20	-0.67	-0.22	-0.04	0.01
	59.03	D10S1426	-4.52	-1.15	-0.51	-0.28	-0.10	-0.04	-0.01
	93.92	D10S1432	-4.38	-2.45	-1.20	-0.70	-0.29	-0.12	-0.04
	117.42	D10S571	-4.56	-1.10	-0.46	-0.22	-0.06	-0.01	-0.00
	119.70	D10S1709	-4.72	-2.27	-1.01	-0.53	-0.17	-0.04	-0.00
3p	134.70	D10S1237	-6.92	-2.36	-1.07	-0.56	-0.15	0.00	0.04
	142.78	D10S1230	-6.78	-2.40	-1.08	-0.54	-0.12	0.02	0.04
	156.27	D10S1223	-5.52	-2.06	-0.79	-0.30	0.06	0.16	0.12
	170.94	D10S212	-6.51	-3.64	-1.71	-0.94	-0.30	-0.05	0.03
	173.13	D10S169	-6.67	-3.80	-1.87	-1.09	-0.42	-0.14	-0.01

4.6.2.4 Haplotypanalyse für Chromosom 10

In Abbildung 4-21 ist das Ergebnis der Haplotypanalyse für Chromosom 10 dargestellt. Die beiden Haplotypen der Indexpatientin (302) sind farblich dargestellt, wobei der maternale Haplotyp rosa und der paternale Haplotyp blau unterlegt sind.

Die beiden betroffenen Kinder der Indexpatientin (302) zeigen für den kurzen Arm des Chromosoms, definiert durch die Marker D10S1435 – D10S1426, jeweils unterschiedliche Haplotypen. Die Tochter (402) hat den maternalen Haplotyp, der Sohn (403) den paternalen Haplotyp geerbt. Somit ist eine Lokalisation des symptomverursachenden Gens nach dem Ergebnis der Haplotypanalyse auf dem kurzen Arm des Chromosoms 10 ausgeschlossen.

Betrachtet man den langen Arm des Chromosoms, so fällt ein Haplotyp auf, der durch die Marker D10S1220 – D10S2327 gebildet wird. Dieser in Abbildung 4-18 durch zwei waagerechte Linien gekennzeichnete Haplotyp zeigt sich bei den Betroffenen 302, 303, 402, 403, 405 sowie 502. Allerdings ist auch die nicht betroffene Person 503 Träger dieses Haplotyps, während die betroffene Personen 305 den Haplotyp nicht zeigt. Aufgrund dieser Konstellation ist eine Kopplung dieses Haplotyps zum Krankheitslocus unwahrscheinlich.

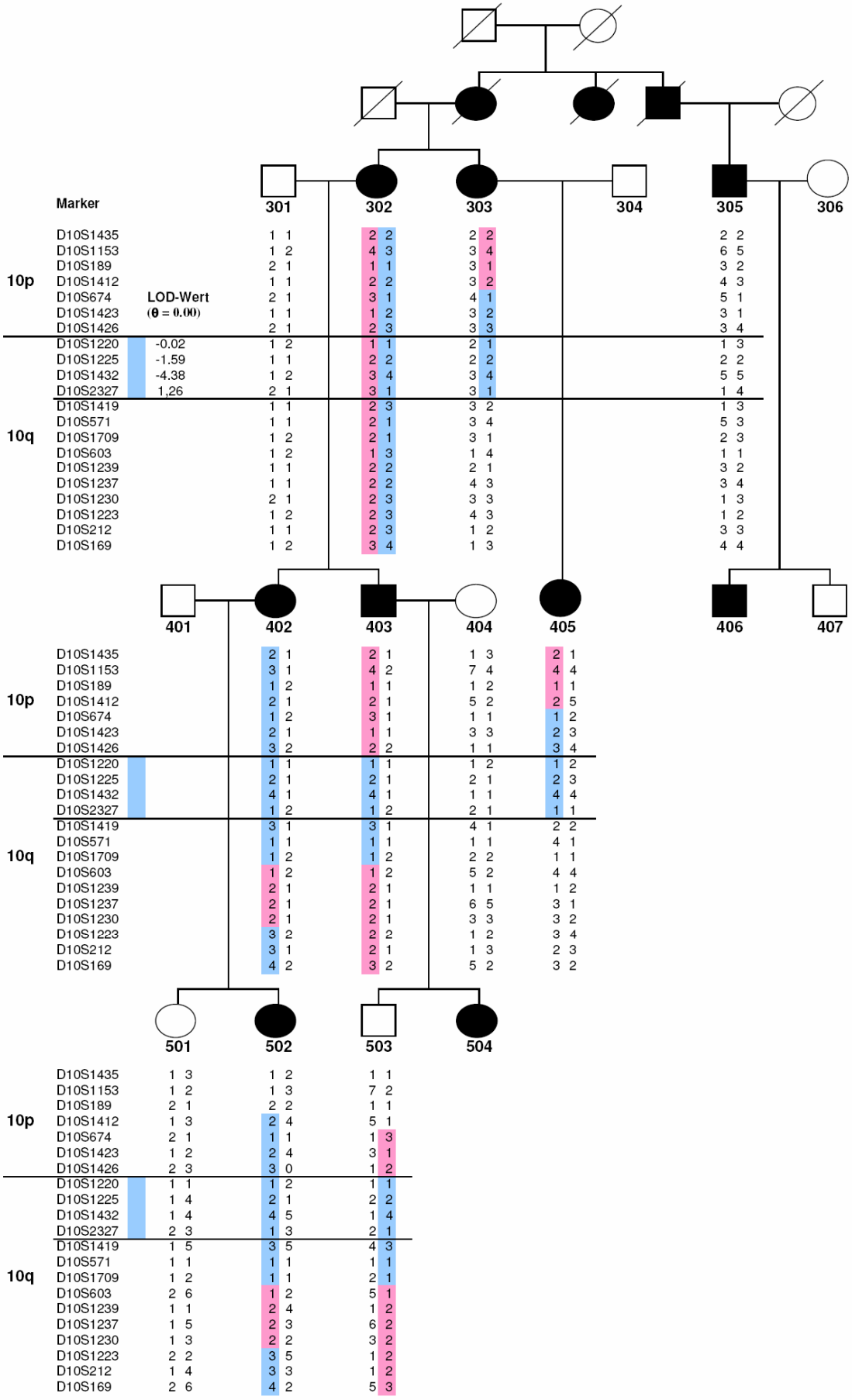

Abbildung 4-21: Haplotypanalyse für Chromosom 10

4.6.2.5 Multimarkeranalyse für Chromosom 10

Die Multimarkeranalyse für Chromosom 10 zeigt leicht positive LOD-Werte in einem kleinen Intervall zwischen 0 und 10 cM. Den höchsten LOD-Wert von $Z_{max} = 0.60$ ($\theta = 0.00$) erreichte der Marker D10S1435 an Position 4.32 cM. Alle anderen Marker zeigen negative LOD-Werte. Der Mikrosatellitenmarker D10S2327, der in der Zweipunktanalyse einen positiven LOD-Wert von $Z_{max} = 1.26$ ($\theta = 0.00$) erreichte, zeigt in der Multimarkeranalyse, wie alle weiteren getesteten Marker von Chromosom 10, einen negativen LOD-Wert von $Z_{max} < 0.00$ ($\theta = 0.00$) (Abb. 4-22).

Der Kandidatenlocus *KLF6* zeigt in der Multimarkeranalyse einen leicht positiven LOD-Wert von $Z_{max} = 0.51$ ($\theta = 0.00$) für den Marker D10S1435, dieser Locus kann somit in der Multimarkeranalyse nicht sicher ausgeschlossen werden. Weitere Loci auf Chromosom 10 kommen aufgrund ausschließlich negativer LOD-Werte als Krankheitslocus nicht in Frage.

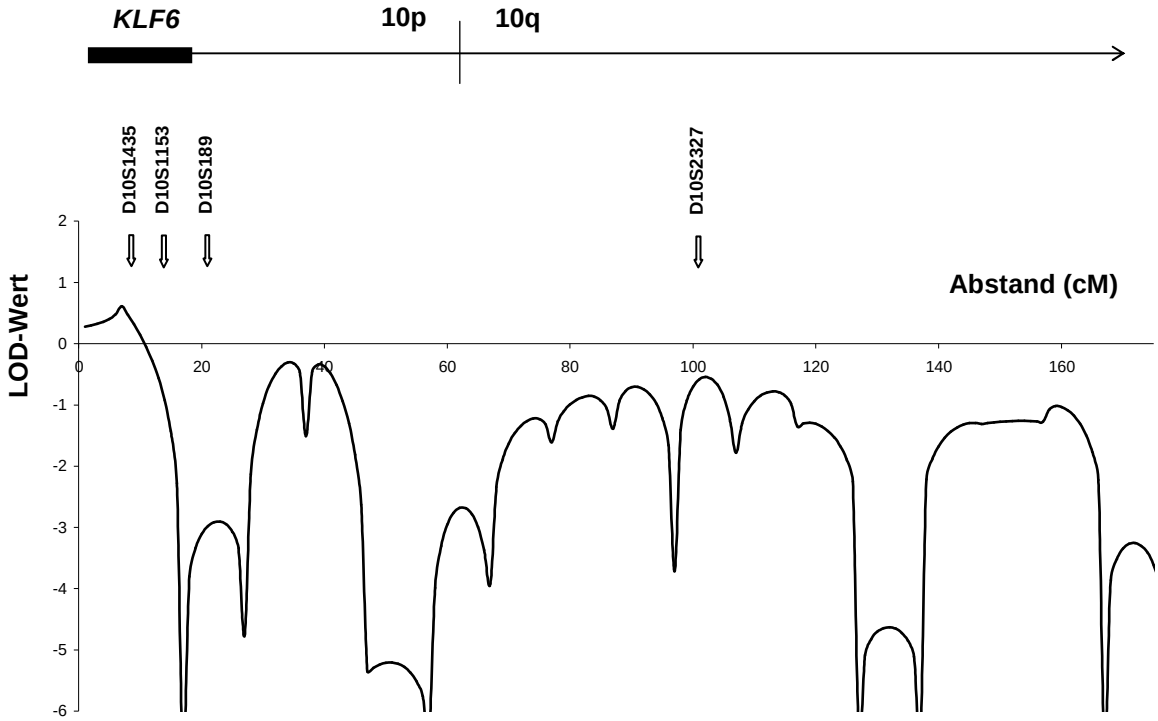

Abbildung 4-22: Multimarkeranalyse für Chromosom 10

4.6.3 Zusammenfassung der Analyse des Chromosoms 10

In Tabelle 4-22 sind alle in dieser Arbeit für Chromosom 10 getesteten Marker zusammengefasst.

Tabelle 4-22: Marker auf Chromosom 10

Chromosom			Rekombinationswerte (θ)						
	cM	Marker	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
	4.32	D10S1435	1.36	1.33	1.21	1.06	0.77	0.48	0.22
	13.49	D10S1153	-6.45	-1.90	-0.65	-0.19	0.13	0.19	0.13
	19.00	D10S189	-5.51	-3.26	-1.91	-1.31	-0.72	-0.38	-0.15
10p	28.31	D10S1412	-1.52	-0.34	0.24	0.42	0.47	0.38	0.22
	41.79	D10S674	-4.30	-2.59	-1.29	-0.76	-0.27	-0.05	0.02
	46.23	D10S1423	-6.14	-2.51	-1.20	-0.67	-0.22	-0.04	0.01
	59.03	D10S1426	-4.52	-1.15	-0.51	-0.28	-0.10	-0.04	-0.01
	70.23	D10S1220	-0.02	-0.02	-0.03	-0.03	-0.02	-0.01	-0.00
	80.77	D10S1225	-1.59	-0.58	-0.01	0.15	0.19	0.13	0.05
	93.92	D10S1432	-4.38	-2.45	-1.20	-0.70	-0.29	-0.12	-0.04
	100.92	D10S2327	1,26	1,24	1,13	0,99	0.72	0.46	0.22
	112.58	D10S1419	-1.10	-0.09	0.43	0.55	0.50	0.34	0.16
	117.42	D10S571	-4.56	-1.10	-0.46	-0.22	-0.06	-0.01	-0.00
10q	119.70	D10S1709	-4.72	-2.27	-1.01	-0.53	-0.17	-0.04	-0.00
	123.70	D10S603	-1.15	-0.15	0.37	0.50	0.46	0.30	0.14
	125.41	D10S1239	-1.79	-0.77	-0.19	0.00	0.11	0.11	0.07
	134.70	D10S1237	-6.92	-2.36	-1.07	-0.56	-0.15	0.00	0.04
	142.78	D10S1230	-6.78	-2.40	-1.08	-0.54	-0.12	0.02	0.04
	156.27	D10S1223	-5.52	-2.06	-0.79	-0.30	0.06	0.16	0.12
	170.94	D10S212	-6.51	-3.64	-1.71	-0.94	-0.30	-0.05	0.03
	173.13	D10S169	-6.67	-3.80	-1.87	-1.09	-0.42	-0.14	-0.01

4.7 Chromosom 17

4.7.1 Testung des Kandidatengenlocus 17q12-21

Mutationen innerhalb des *KRT9*-Gens führen zur hereditären Palmoplantarkeratose. Diese Erkrankung kann durch Hyperkeratose der Handinnenflächen zu Fingerkontrakturen führen und ist mit Gelenkpolstern (knuckle-pads) assoziiert, die auch bei betroffenen Familienmitgliedern auffällig waren. Das *KRT9*-Gen liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 17 auf 17q12-21 (Abb. 4-23). Dieser Locus wurde daher vor Testung des kompletten Chromosoms auf Ausschluss getestet.

Für den Locus 17q12-21 wurden die beiden Marker D17S1299 und D17S809 sowie ein proximal (D17S1293) und zwei distal angrenzende Marker (D17S1290, D17S2059) getestet (Tab. 4-23). Der Marker D17S1299 erreichte einen LOD-Wert von $Z_{max} = 0.12$ ($\theta = 0.00$), eine Aussage über Kopplung zum Krankheitslocus ist für diesen Marker nicht möglich. Die weiteren vier für diesen Locus getesteten Marker zeigen signifikant negative LOD-Werte von $Z_{max} < -4.30$ ($\theta = 0.00$). Somit ist eine Kopplung dieses Locus zum Krankheitslocus unwahrscheinlich, kann aber nicht ausgeschlossen werden.

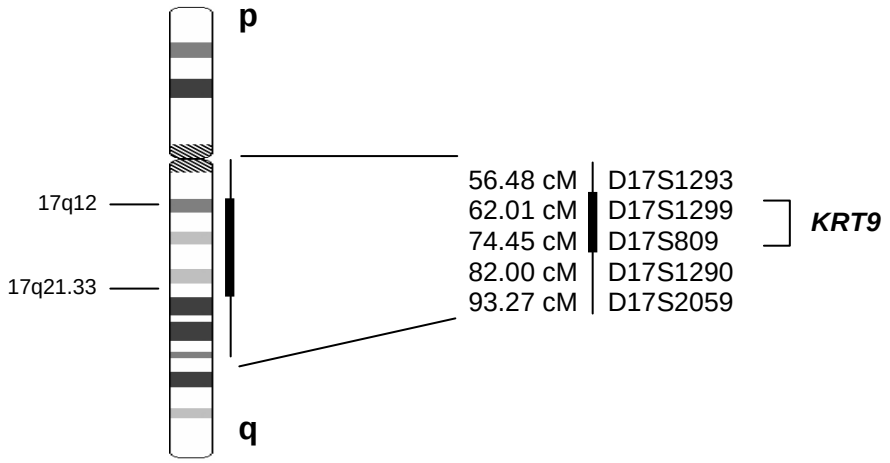

Abbildung 4-23: Chromosom 17
Für den Locus 17q12-21 wurden die beiden Marker D17S1299 und D17S809 sowie drei flankierende Marker getestet. Links neben den Markernamen ist die Lokalisation der Marker in cM angegeben

Tabelle 4-23: Chromosom 17. LOD-Werte im Bereich des **Locus 17q12-21**

Gen			Rekombinationswerte (θ)						
	cM	**Marker**	**0.00**	**0.01**	**0.05**	**0.10**	**0.20**	**0.30**	**0.40**
	56.48	D17S1293	-4.30	-2.37	-1.11	-0.59	-0.15	0.01	0.04
KRT9	62.01	D17S1299	0.12	0.12	0.10	0.08	0.04	0.02	0.00
	74.45	D17S809	-7.25	-4.30	-2.32	-1.49	-0.73	-0.34	-0.12
	82.00	D17S1290	-8.63	-5.84	-3.32	-2.20	-1.13	-0.57	-0.22
	93.27	D17S20.59	-7.20	-2.40	-1.09	-0.57	-0.14	0.01	0.04

4.7.2 Genotypisierung des gesamten Chromosoms 17

Nach Testung des 17q12-21-Locus wurde das komplette Chromosom 17 typisiert, welches mit einer Größe von 126.46 cM das kleinste in dieser Arbeit getestete Chromosom ist. Insgesamt wurden 17 Mikrosatellitenmarker mit einem durchschnittlichen Intermarkerabstand von 10 cM getestet. Der mit 16.84 cM größte Intermarkerabstand findet sich zwischen den Markern D17S1301 und D17S784 am telomeren Ende des langen Arms.

4.7.2.1 Mikrosatellitenmarker mit positiven LOD-Werten $Z_{max} > 0.00$

Keiner der nach Testung des Kandidatenlocus verbliebenen 12 Mikrosatellitenmarker zeigte einen positiven LOD-Wert von $Z_{max} > 0.00$ ($\theta = 0.00$).

4.7.2.2 Mikrosatellitenmarker mit LOD-Werten zwischen 0.00 und –2.00

Drei der getesteten Mikrosatellitenmarker erreichten LOD-Werte im Bereich zwischen 0.00 und -2.00 ($\theta = 0.00$). Diese drei Marker liegen mit LOD-Werten von $Z_{max} < -1.58$ ($\theta = 0.00$) nahe der Signifikanzgrenze ($Z_{max} < -2.00$; $\theta = 0.00$) und schließen eine Kopplung zum Krankheitslocus mit großer Wahrscheinlichkeit aus (Tab. 4-24).

Tabelle 4-24: Chromosom 17. Marker mit LOD-Werten zwischen 0.00 und –2.00

Chromosom			Rekombinationswerte (θ)						
	cM	Marker	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
17p	27.75	D17S969	-1.90	-0.88	-0.28	-0.08	0.04	0.06	0.04
17q	100.02	D17S1301	-2.00	-0.70	-0.13	0.03	0.09	0.06	0.01
	126.46	D17S928	-1.58	-0.56	-0.00	0.17	0.22	0.16	0.08

4.7.2.3 Mikrosatellitenmarker mit LOD-Werten $Z_{max} < -2.00$

LOD-Werte von $Z_{max} < -2.00$ bei einem Rekombinationswert von $\theta = 0.00$ gelten als signifikant für den Ausschluss einer Kopplung zum Krankheitslocus. Von den 17 getesteten Mikrosatellitenmarkern zeigen 13 Marker signifikant negative LOD-Werte von $Z_{max} < -2.00$ ($\theta = 0.00$). Die LOD-Werte bleiben auch bei einer Rekombinationhäufigkeit von $\theta = 0.40$ negativ bzw. nahe dem Wert 0 (Tab. 4-25). Somit ist die Lokalisation des Krankheitslocus auf Chromosom 17 schon nach Auswertung der Zweipunktanalyse sehr unwahrscheinlich.

Tabelle 4-25: Chromosom 17. Marker mit negativen LOD-Werten $Z_{max} < -2.00$

Chromosom			Rekombinationswerte (θ)						
	cM	Marker	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
	0.63	D17S1308	-9.43	-5.61	-3.00	-1.91	-0.91	-0.42	-0.14
	10.72	D17S1298	-4.79	-2.73	-1.45	-0.93	-0.47	-0.24	-0.10
	16.84	D17S1844	-6.51	-3.64	-1.71	-0.94	-0.30	-0.05	0.03
17p	21.01	D17S945	-4.89	-0.98	-0.32	-0.07	0.12	0.16	0.11
	36.14	D17S921	-2.11	-1.22	-0.60	-0.34	-0.13	-0.04	-0.00
	41.12	D17S122	-4.09	-2.17	-0.93	-0.44	-0.07	0.04	0.05
	50.74	D17S1294	-4.32	-2.39	-1.12	-0.60	-0.16	0.00	0.04
	56.48	D17S1293	-4.30	-2.37	-1.11	-0.59	-0.15	0.01	0.04
	74.45	D17S809	-7.25	-4.30	-2.32	-1.49	-0.73	-0.34	-0.12
17q	82.00	D17S1290	-8.63	-5.84	-3.32	-2.20	-1.13	-0.57	-0.22
	93.27	D17S2059	-7.20	-2.40	-1.09	-0.57	-0.14	0.01	0.04
	105.68	D17S663	-7.24	-2.90	-1.54	-0.97	-0.43	-0.17	-0.04
	116.86	D17S784	-4.75	-1.08	-0.41	-0.15	0.03	0.08	0.06

4.7.2.4 Haplotypanalyse für Chromosom 17

In Abbildung 4-24 ist das Ergebnis der Haplotypanalyse für Chromosom 17 dargestellt. Die beiden Haplotypen der Indexpatientin (302) sind farblich dargestellt, wobei der maternale Haplotyp rosa und der paternale Haplotyp blau unterlegt sind.

Die Indexpatientin vererbt den kompletten maternalen Haplotyp (rosa) an ihren betroffenen Sohn (403) und den kompletten paternalen Haplotyp (blau) an ihre betroffene Tochter (402), womit die Lokalisation des Krankheitsgens auf Chromosom 17 ausgeschlossen werden kann.

Des Weiteren vererbt der betroffene Sohn (403) einen großen Haplotyp von 12 Mikrosatellitenmarkern (D17S1308 – D17S1290) des maternalen Haplotyps (rosa) an seinen nicht betroffenen Sohn (503). Ebenso vererbt die betroffene Tochter (402) einen großen Haplotyp von acht Mikrosatellitenmarkern (D17S1299 – D17S501) des paternalen Haplotyps (blau) an ihre nicht betroffene Tochter (501), was den Ausschluss von Chromosom 17 als Krankheitslocus bekräftigt.

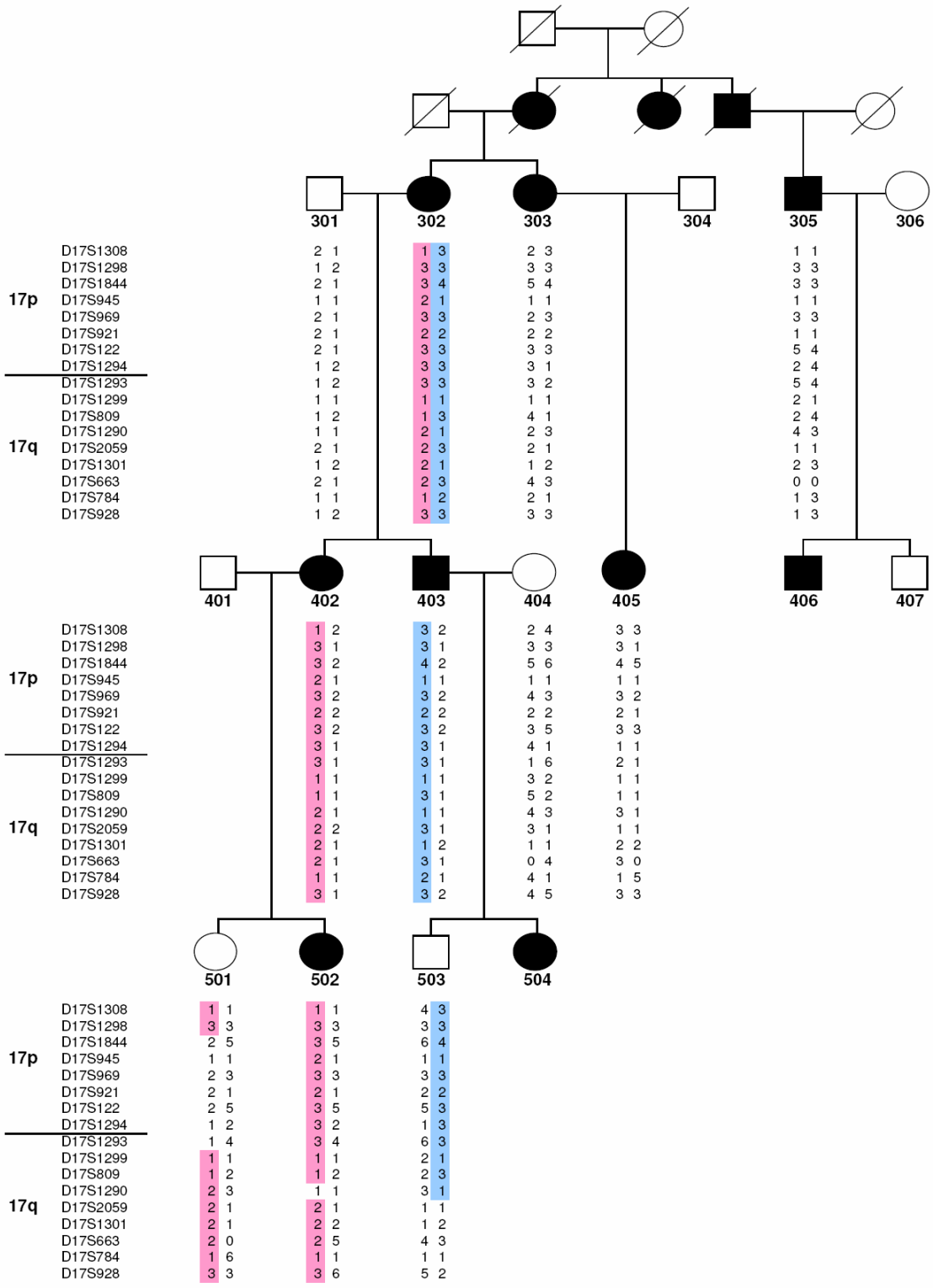

Abbildung 4-24: Haplotypanalyse für Chromosom 17

4.7.2.5 Multimarkeranalyse für Chromosom 17

Die Multimarkeranalyse zeigt für Chromosom 17 fast ausschließlich signifikant negative LOD-Werte von $Z_{max} < -2.00$ ($\theta = 0.00$). Nur ein Marker D17S928 an Position 126.46 zeigt einen nicht signifikant negativen LOD-Wert von $Z_{max} < -1.87$ ($\theta = 0.00$), welcher jedoch ebenfalls nahe der Signifikanzgrenze für den Ausschluss einer Kopplung zum Krankheitslocus liegt (Abb. 4-25).

Im Bereich des *KRT9*-Locus bei 71 cM zeigt die Multimarkeranalyse signifikant negative LOD-Werte von $Z_{max} < -2.00$ ($\theta = 0.00$), eine Kopplung dieses Kandidatenlocus zum Phänotyp kann somit ausgeschlossen werden.

Das Ergebnis der Multimarkeranalyse bestätigt somit die Ergebnisse aus der Zweipunktanalyse und der Haplotypanalyse und schließt Chromosom 17 mit großer Wahrscheinlichkeit als Krankheitslocus aus.

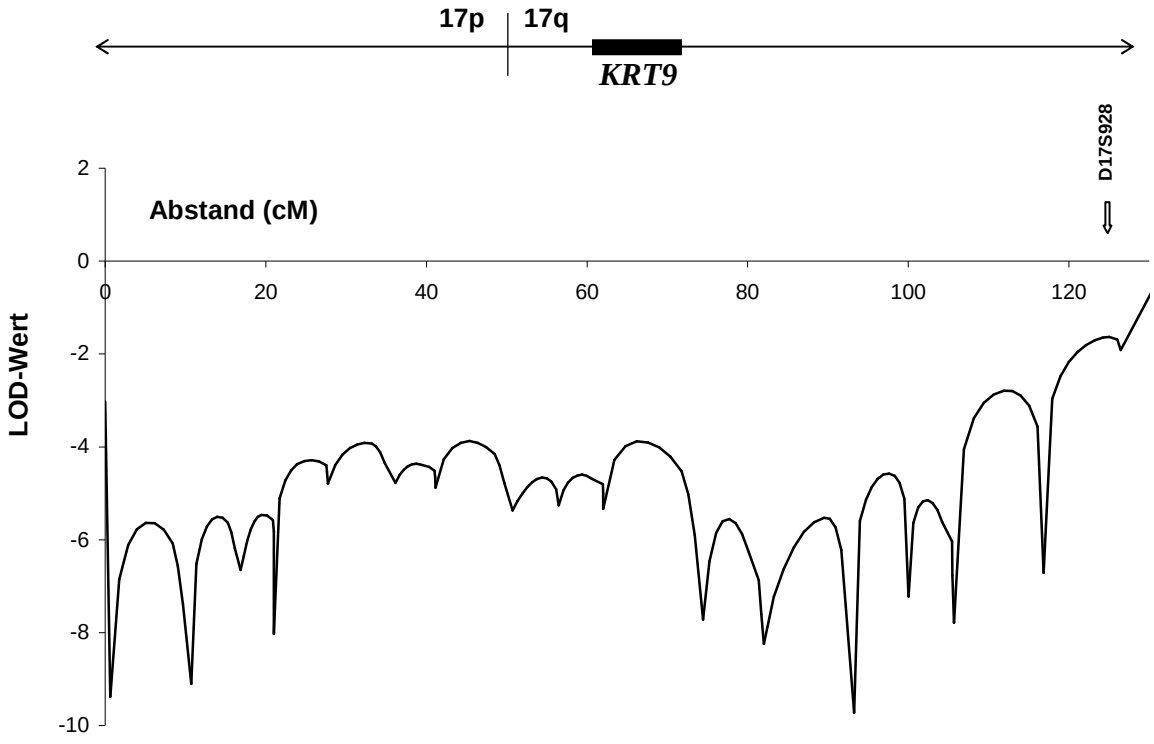

Abbildung 4-25: Multimarkeranalyse für Chromosom 17

4.7.3 Zusammenfassung der Analyse des Chromosoms 17

In Tabelle 4-26 sind alle in dieser Arbeit für Chromosom 17 getesteten Marker zusammengefasst.

Tabelle 4-26: Marker auf Chromosom 17

Chromosom			Rekombinationswerte (θ)						
	cM	Marker	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
	0.63	D17S1308	-9.43	-5.61	-3.00	-1.91	-0.91	-0.42	-0.14
	10.72	D17S1298	-4.79	-2.73	-1.45	-0.93	-0.47	-0.24	-0.10
	16.84	D17S1844	-6.51	-3.64	-1.71	-0.94	-0.30	-0.05	0.03
17p	21.01	D17S945	-4.89	-0.98	-0.32	-0.07	0.12	0.16	0.11
	27.75	D17S969	-1.90	-0.88	-0.28	-0.08	0.04	0.06	0.04
	36.14	D17S921	-2.11	-1.22	-0.60	-0.34	-0.13	-0.04	-0.00
	41.12	D17S122	-4.09	-2.17	-0.93	-0.44	-0.07	0.04	0.05
	50.74	D17S1294	-4.32	-2.39	-1.12	-0.60	-0.16	0.00	0.04
	56.48	D17S1293	-4.30	-2.37	-1.11	-0.59	-0.15	0.01	0.04
	62.01	D17S1299	0.12	0.12	0.10	0.08	0.04	0.02	0.00
	74.45	D17S809	-7.25	-4.30	-2.32	-1.49	-0.73	-0.34	-0.12
	82.00	D17S1290	-8.63	-5.84	-3.32	-2.20	-1.13	-0.57	-0.22
17q	93.27	D17S2059	-7.20	-2.40	-1.09	-0.57	-0.14	0.01	0.04
	100.02	D17S1301	-2.00	-0.70	-0.13	0.03	0.09	0.06	0.01
	105.68	D17S663	-7.24	-2.90	-1.54	-0.97	-0.43	-0.17	-0.04
	116.86	D17S784	-4.75	-1.08	-0.41	-0.15	0.03	0.08	0.06
	126.46	D17S928	-1.58	-0.56	-0.00	0.17	0.22	0.16	0.08

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Kandidatengenanalyse in einer Familie mit autosomal dominant vererbter, nicht syndromaler, isolierter Kamptodaktylie durchgeführt. In Kopplungsanalysen der Chromosomen 1, 2, 3, 10 und 17 wurden die Kandidatengene *PRG4*, *HOXD13*, *SDTY1*, *KLF6*, *KRT9* sowie der Locus ZD1 auf Kopplung zu Mikrosatellitenmarkern untersucht. Die Marker wurden in einem durchschnittlichen Intervall von 10 cM für jedes Chromosom ausgewählt. Die DNA-Fragmente der Mikrosatellitenmarker wurden mit der Methode der Polymerasekettenreaktion amplifiziert und mit der GeneScan-Methode nach ihrer Länge aufgetrennt. Die so gewonnenen Genotypdaten wurden dann mittels Zweipunktanalyse, Multimarkeranalyse und Haplotypanalyse auf Kopplung zu den Kandidatengenen getestet.

5.1 Phänotyp und Stammbaum der Familie

Die in dieser Arbeit getestete Familie aus Hessen zeigt eine autosomal dominant vererbte, nicht syndromale, isolierte Form der Kamptodaktylie. Diese Familie wurde zu Hause besucht, um die Kleinfingerkontraktur bei den betroffenen Personen genau zu untersuchen und zu prüfen, ob sich der Stammbaum der Familie für eine Kopplungsanalyse eignen würde.

Die Kamptodaktylie in dieser Familie ist charakterisiert durch eine hoch variable Expressivität. Dies zeigt sich in einer unterschiedlichen Manifestation zwischen den Geschlechtern. Bei den weiblichen Personen 302, 303, 402, 502 und 504 ist die Kontraktur deutlich ausgeprägt. Sie ist daher leicht zu diagnostizieren. Die weibliche Person 405, die nur eine sehr milde Ausprägung der Kamptodaktylie zeigt, bildet hier eine Ausnahme.

Im Vergleich zu den betroffenen weiblichen Familienmitgliedern zeigt die männliche Person 305 eine wesentlich schwächere Ausprägung der Kamptodaktylie. Die ebenfalls männliche Person 403 weist als Ausdruck reduzierter Penetranz keine Kleinfingerkontraktur auf. Die Kamptodaktylie zeigt also bei den weiblichen Betroffenen eine wesentlich stärkere Ausprägung des Phänotyps, während die Einstufung des Phänotyps bei den männlichen Familienmitgliedern sehr schwierig ist. Von ganz besonderer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die als phänotypisch unauffällig eingestufte männliche Person 503. Es wäre denkbar, dass auch diese Person wie der Vater 403 Genträger und aufgrund verringerter Penetranz phänotypisch unauffällig ist.

Der Ausprägungsgrad der Kleinfingerkontraktur ist bei den weiblichen Familienmitgliedern stärker ausgeprägt, man spricht daher von Gynäkotropie. Diese wurde bereits von Schallreuter und Reimlinger (1993) als charakteristisch beschrieben. Im gesamten Stammbaum der Familie finden sich über fünf Generationen insgesamt elf

betroffene Personen, wobei acht der phänotypisch auffälligen Personen weiblich und drei männlich sind. Dies entspricht einem prozentualen Anteil von 72% weiblichen Personen unter allen Betroffenen.

Auch bezüglich des Manifestationsalters fielen innerhalb der Familie Unterschiede auf. In der Literatur wird zwischen einer frühen Form, die entweder kongenital ist oder sich im Verlauf der ersten zwölf Lebensmonaten manifestiert (Brites et al. 1998, Dautel 2003), und einer späten Form differenziert. Die späte Form entwickelt sich erst im Kleinkindes- oder Jugendalter. Sie lässt sich durch einen zunächst konstanten Flexionswinkel mit langsam progredientem Verlauf ab dem 10. Lebensjahr und kontinuierlichem Verlauf bis zum 30. Lebensjahr charakterisieren (Schallreuter und Reimlinger 1993). Das Alter der Manifestation in dieser Familie lag bei fast allen Personen um das 20. Lebensjahr. Die erst 15 Jahre alte Person 504 bildete hier eine Ausnahme. Bei dieser Person waren die Kontrakturen der kleinen Finger im Kleinkindesalter aufgetreten und zum Zeitpunkt des Besuchs bereits sehr stark ausgeprägt. Die Betroffenen dieser Familie sind somit der späten Form zuzuordnen.

Die Grundlage einer genetischen Studie bildet die Erstellung eines Stammbaums. Aus dem Stammbaum kann man die Struktur einer Familie, also die Anzahl der Generationen, die Zahl der Familienmitglieder und deren verwandtschaftliche Beziehungen zueinander, ablesen. Die Verteilung der betroffenen und nicht betroffenen Personen eines Stammbaums lässt Rückschlüsse über die Eignung der Familie für eine Kopplungsanalyse und den Erbgang zu.

Der Stammbaum in dieser Arbeit zeigt eine Familie mit fünf Generationen, in der die Personen der ersten beiden Generationen bereits verstorben sind. Die Indexpatientin gehört als älteste noch lebende Person der Familie der dritten Generation an. Der Stammbaum weist ausgedehnte Geschwisterschaften und entfernte Verwandtschaftsgrade auf, welche für Kopplungsanalysen unabdingbar sind. Von den 17 noch lebenden Personen sind acht Personen phänotypisch auffällig. Somit standen neben den Betroffenen auch ausreichend nicht betroffene Personen zur Verfügung. Diese sind für Kopplungsanalysen ebenso von Bedeutung wie betroffene Personen. Aufgrund dieser Struktur erschien der Stammbaum geeignet für die Durchführung einer Kopplungsanalyse.

Auch die Frage nach dem Vererbungsmodus konnte anhand des Stammbaums geklärt werden. Der für die hereditäre Form der Kamptodaktylie vorgeschlagene autosomal dominante Erbgang (Temtamy und McKusick 1978) konnte aufgrund folgender Kriterien für diese Familie bestätigt werden. Es sind beide Geschlechter betroffen und beide Geschlechter übertragen den Phänotyp. Eine Vererbung von Vater zu Sohn wurde beobachtet (204, 305) und durchschnittlich die Hälfte der Kinder Betroffener sind ebenfalls betroffen (Abb. 3-1).

Anhand von LOD-Wert-Simulationen lässt sich feststellen, wie hoch der maximal erreichbare LOD-Wert eines Stammbaums in den Zweipunktanalysen ist und wie sich dieser durch Hinzunahme weiterer Personen verändern lässt. Für den Stammbaum dieser Familie wurden insgesamt drei Simulationen durchgeführt. Die erste Simulation, die alle bislang zur Verfügung stehenden Personen berücksichtigte, erreichte einen LOD-Wert von $Z_{max} = 1.94$ ($\theta = 0.00$). Dieser Wert entspricht folglich dem maximalen LOD-Wert, der in dieser Arbeit mit allen typisierten Personen in den Zweipunkt-analysen erreicht werden kann. Er liegt deutlich unter dem Grenzwert der Signifikanz für eine Kopplung. Für den Ausschluss von Loci als Kandidatenlocus eignen sich jedoch auch kleinere Familien. Dies ermöglichte in dieser Arbeit den Ausschluss großer Regionen der fünf getesteten Chromosomen.

Das Ziel der beiden anderen Simulationen war herauszufinden, welche zusätzlichen Personen notwendig sein würden, um einen signifikant positiven LOD-Wert von $Z_{max} > 3.00$ ($\theta = 0.00$) zu erreichen. Die Hinzunahme der betroffenen Person 504 erhöhte den LOD-Wert auf $Z_{max} = 2.25$ ($\theta = 0.00$). In der dritten Simulation wurde nach Hinzunahme der Personen 406 und 407 ein LOD-Wert von $Z_{max} = 2.68$ ($\theta = 0.00$) erreicht. Da dieser LOD-Wert nahe der Signifikanzgrenze für den Nachweis einer Kopplung liegt, ist ein LOD-Wert größer 3.00 ($\theta = 0.00$) durch Rekrutierung weiterer Personen, beispielsweise Kinder der Personen 203 und 502, für diesen Stammbaum erreichbar.

5.2 Labormethoden und Datenverwaltung

Bei einer Kopplungsanalyse wird die Segregation genetischer Marker in einem Stammbaum untersucht und statistisch geprüft, ob eine Kopplung der Marker zu dem untersuchten Phänotyp vorliegt. Als genetischer Marker kann dabei jede beliebige DNA-Sequenz mit bekannter Lokalisation dienen, die nach Mendelschen Regeln vererbt wird. Die früher verwendeten Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP) weisen mit meist nur zwei Allelen eine sehr geringe Informativität auf. Für dieses Verfahren werden große Mengen an DNA benötigt und seine Durchführung ist sehr zeitaufwändig. Daher wurden für diese Arbeit Mikrosatelliten als genetische Marker ausgewählt. Der Vorteil der Mikrosatellitenmarker liegt in ihrer hohen Informativität. Die in dieser Arbeit verwendeten Marker sind hochpolymorph und weisen bis zu 15 unterschiedliche Allele auf. Als Beispiel sei hier der Marker D1S1656 von Chromosom 1 erwähnt. Der Polymorphismus der Mikrosatellitenmarker beruht auf einer variablen Anzahl an Nukleotidwiederholungen.

Um möglichst wenig homozygote Marker zu erhalten, wurde bei der Auswahl der Marker in dieser Arbeit auf eine hohe Heterozygotie größer 0.70 geachtet. Der Anteil homozygoter Marker an der Gesamtheit aller getesteten Marker belief sich auf lediglich drei von ingesamt 126 Markern. Dies entspricht einem prozentualen Anteil von etwa zwei Prozent und belegt, dass eine gezielte Markerauswahl für eine Kopplungsanalyse sinnvoll ist. Da die Mikrosatelliten in einer hohen Zahl gleichmäßig über das komplette Genom verteilt sind, bieten sie reichlich Alternativen für homozygote Marker oder nicht amplifizierbare DNA-Regionen und ermöglichen die Durchführung von Feinkartierungen in Regionen mit positiven LOD-Werten. Informationen über die Lokalisation der Marker auf den Chromosomen und die Primersequenzen sind in Internetdatenbanken jederzeit gut zugänglich (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Als Nachteil der Mikrosatellitenmarker ist die teure und aufwändige Apparatur (DNA-Sequenzierer) zu nennen, die für die Typisierung der Allele (GeneScan-Software) benötigt wird.

In der vorliegenden Arbeit wurden Dinukleotidmarker (32%), Trinukleotidmarker (9%) und Tetranukleotidmarker (59%) verwendet. Die Allele der Dinukleotidmarker zeigten bei der Auswertung im Elektropherogramm breitbasige, mehrgipfelige Peaks und im Gelbild nicht voneinander abgrenzbare DNA-Fragmente (Abb. 4-11b). So war die Differenzierung zwischen homozygotem und heterozygotem Genotyp bei Dinukleotidmarkern häufig sehr schwierig. Als Ursache sind hierfür die hohe Fehlerrate bei der Amplifikation der DNA-Fragmente sowie die geringe Größendifferenz der einzelnen Allele verantwortlich.

Im Gegensatz dazu wurden die Allele der Tetranukleotidmarker im Elektropherogramm als schmale, hohe Peaks dargestellt, sodass die Identifikation der Allele wesentlich

einfacher war. Auch im Gelbild wurden die DNA-Fragmente als klar voneinander abgrenzbare Allele (Abb. 4-11a) abgebildet. Die Trinukleotidmarker zeigten bei der Auswertung den Tetranukleotidmarkern ähnliche Eigenschaften. Aufgrund der zuverlässigeren Auswertbarkeit sind Tri- und Tetranukleotidmarker zu bevorzugen. Dinukleotidmarker hingegen sind nur an Loci einzusetzen, für die keine Tri- oder Tetranukleotidmarker zur Verfügung stehen.

Die Amplifikation der DNA-Fragmente der Mikrosatellitenmarker für die Kopplungsanalysen wurde mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt. Der Vorteil dieser Methode liegt in einem hohen Durchlauf an Primern und in der hohen Effizienz. In relativ kurzer Zeit konnten so die DNA-Fragmente der 126 in dieser Arbeit typisierten Marker für die elf getesteten Familienmitglieder sowie einen Referenzwert amplifiziert werden. Um mögliche Fehlerquellen bei der Durchführung der PCRs zu minimieren, wurden diese mit industriellen PCR-Beads (*Taq*-Polymerase, dNTPs, Pufferionen) oder nach einem standardisierten Reaktionsansatz (Tab. 2-6) in 35 Zyklen durchgeführt. Die Annealingtemperatur wurde für jeden Primer mithilfe der Onlinesoftware Primer3 ermittelt. Die errechnete Annealingtemperatur wurde dann in einer Probe-PCR mit einer beliebigen DNA getestet. Dieses zeitaufwändige Vorgehen war nötig, um die Anzahl erfolgloser PCR-Reaktionen mit DNA-Proben der Familienmitglieder und damit den Verbrauch dieser DNA niedrig zu halten.

Diverse Probleme ergaben sich bei der Amplifikation der DNA-Fragmente in Chromosomenregionen, in denen die Primer gar nicht oder nur hoch spezifisch an den Matrizenstrang hybridisieren konnten. Diese Regionen fanden sich gehäuft auf den Chromosomen 1 und 2. Für einige Marker konnte, auch nach mehrfacher Wiederholung der PCR-Reaktionen sowohl bei unterschiedlichen Annealingtemperaturen als auch mit verschiedenen Zusätzen wie beispielsweise Formamid oder DMSO, kein PCR-Produkt gewonnen werden. Als Ursache kommen hier neben der hohen Bindungsspezifität der Primer auch falsche Primerverdünnungen oder fehlerhafte Primer, beispielsweise durch zu lange Lagerungsdauer oder eine falsche Primersequenz, in Betracht.

Ein anderes Problem ergab sich bei den Primern, die an mehreren Stellen hybridisierten und so durch unspezifische, akzessorische DNA-Fragmente die Interpretation der korrekten Allele in der GeneScan-Auswertung erschwerten. Da die Bindungsspezifität von Primern vorrangig von der Annealingtemperatur abhängig ist, konnte dieses Problem häufig durch Erhöhung der Annealingtemperatur umgangen werden. In Abbildung 4-10 sind nicht spezifische, akzessorische DNA-Fragmente in einer Agarosegelelektrophorese für die Marker D2S1391, D2S1345, D2S164 und D2S1371 mit gelben Pfeilen gekennzeichnet.

Aufgrund dieser Schwierigkeiten kam es insbesondere auf den Chromosomen 1 und 2 zu einer hohen Ausfallrate an Mikrosatellitenmarkern, sodass der erzielte Inter-

markerabstand an einigen Loci deutlich mehr als 10 cM betrug. Der mit 27,3 cM größte Intermarkerabstand fand sich auf dem langen Arm von Chromosom 1 zwischen den Markern D1S3462 und D1S1609. Diese Intermarkerabstände waren jedoch für die Durchführung der Kopplungsanalysen ausreichend.

Auf Chromosom 1 konnten für 69% der Marker DNA-Fragmente amplifiziert werden, auf Chromosom 2 lediglich für 53% der Marker. Dagegen wiesen die Chromosomen 3 und 10 (91%) sowie Chromosom 17 (100%) hohe Erfolgsraten bei der Amplifikation auf (Abb. 5-1). Interchromosomale Unterschiede in der Primerbindungsspezifität können daher als sehr wahrscheinliche Ursache angenommen werden.

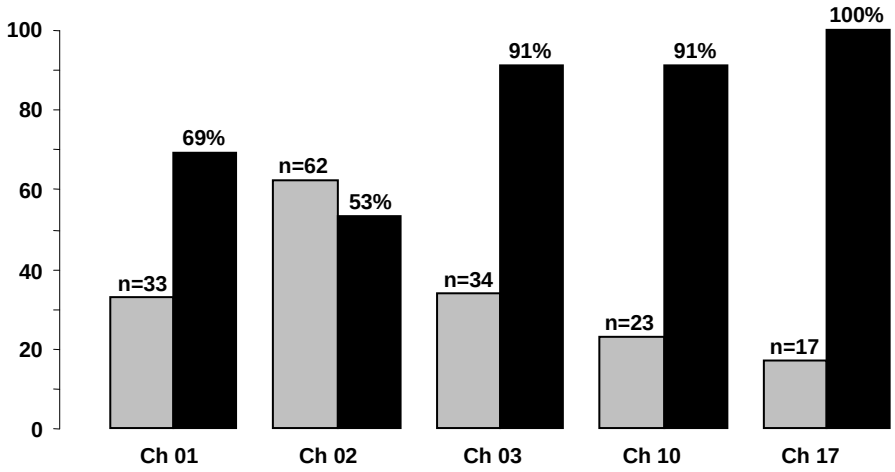

Abbildung 5-1: Mikrosatellitenmarker
Graue Balken = absolute Zahl eingesetzter Primer, schwarze Balken = prozentualer Anteil erfolgreich amplifizierter Marker

Die Fragmentlängenanalyse der PCR-Produkte erfolgte in einem ABI Prism 377®-DNA-Sequenzierer in einem hochauflösenden, denaturierenden Gel aus Polyacrylamid und Harnstoff. Bei der in dieser Arbeit eingesetzten GeneScan-Analyse wurde die Laufgeschwindigkeit der DNA-Fragmente im Gel mittels Laser gemessen, die Software GeneScan wandelte diese Daten dann in ein digitalisiertes Gelbild um. Mithilfe eines MacIntosh-Computers und des Softwareprogramms Genotyper wurden daraus die Allellängen der DNA-Fragmente errechnet.

Bei der in dieser Arbeit angewandten Multiplex-Methode wurden mehrere PCR-Produkte mit unterschiedlichen Größen und Fluoreszenzfarbstoffen kombiniert und gleichzeitig in derselben Gelspur aufgetrennt. Die auf diese Weise optimierte Ausnutzung der Gelkapazität ermöglichte bis zu 16 Marker pro GeneScan-Lauf zu analysieren. Die Multiplex-Methode ist somit ein sehr effektives Verfahren.

Ein weiterer Vorteil der GeneScan-Methode liegt in ihrer hohen Sensitivität. Bei der Ermittlung der Allellängen in Basenpaaren mithilfe der Software Genotyper wurde eine

Präzision von bis zu einer Base erreicht. Für manche Marker konnten in einem ersten GeneScan-Lauf für einzelne Personen nicht alle Allele typisiert werden, weshalb die PCR-Reaktionen für die DNA-Fragmente dieser Marker wiederholt werden mussten. Bei der erneuten Auftrennung der DNA-Fragmente eines Markers aus unterschiedlichen PCR-Reaktionen hat sich die GeneScan-Methode als äußerst zuverlässig erwiesen. Die Genotypdaten der bereits im ersten GeneScan-Lauf typisierten Personen waren in späteren Gelläufen immer reproduzierbar.

Als Nachteil der GeneScan-Methode sind sowohl die hohen Investitionskosten für den DNA-Sequenzierer als auch die relativ hohen Kosten für die spezielle Gelmatrix und den internen Größenstandard TAMRA^{500} anzusehen. Ebenfalls von Nachteil ist der hohe Zeitaufwand bei der Durchführung eines GeneScan-Laufs sowie der komplizierte Umgang mit dem DNA-Sequenzierer.

Aufgrund der langen Vorbereitungs- und Laufzeiten des Gels konnte maximal ein Gellauf pro Tag durchgeführt werden. Das Einfüllen des Gels zwischen die staubfreien Glasplatten erfolgte mithilfe einer Spezialvorrichtung. Wurde die Gelmatrix nicht kontinuierlich zwischen die Glasplatten gegossen, bestand die Gefahr der Bildung von Luftblasen. Bereits kleinste Bläschen im Gel, ebenso wie Verunreinigungen oder alte Gelrückstände auf den Glasplatten, führten durch Messungenauigkeit des Lasers zu fehlerhaften Ergebnissen. Der Umgang mit dem extrem dünnen, 0,2 mm starken Gel, das Einsetzen des Sägezahnkamms sowie das Beladen der kleinen Geltaschen erforderte sehr viel Übung. Diese Fehleranfälligkeit führte vor allem in der Einarbeitungszeit zu einigen nicht auswertbaren Gelläufen.

Die Fondation Jean Dausset in Frankreich (Centre d'Etude du Polymorphisme Humain; CEPH) stellt Forschern genomische DNA so genannter CEPH-Familien für genetische Studien zur Verfügung. Diese Familien zeigen eine für Kopplungsanalysen ideale Struktur und eignen sich daher besonders gut für Marker-Marker-Kartierungen. Da die Genotypdaten dieser Personen bekannt sind, konnte in dieser Arbeit die DNA einer CEPH-Person als Referenzwert eingesetzt werden. Dies war nötig, um geringfügige Lesefehler des Lasers durch Angleichung an diesen Referenzwert zu korrigieren und so die Genotypdaten der Familienmitglieder zu standardisieren.

Die in der GeneScan-Analyse ermittelten Genotypdaten konnten anschließend direkt über das Netzwerk vom Apple-Computer des DNA-Sequenzierers (MacOs-Betriebssystem) auf einen PC (Windows-Betriebssystem) importiert und in Exceltabellen verwaltet werden. Dies war zeitsparend und insbesondere sinnvoll, um Fehler beim manuellen Übertragen dieser Daten in die Tabellen zu vermeiden. Bereits in dieser frühen Phase wurden die Genotypdaten durch eine weitere Person überprüft und korrigiert.

Danach wurden die Genotypdaten für jeden einzelnen Marker von Hand in einen Stammbaum der Familie übertragen. Dies ermöglichte, die Segregation der Allele bildlich nachzuvollziehen. So konnten Widersprüchlichkeiten innerhalb des Stammbaums in den Ergebnisbesprechungen leichter identifiziert werden. Bei der zweiten Kontrolle der Ergebnisse konnten auf diese Weise fast alle Widersprüchlichkeiten und Fehler, die beim manuellen Übertragen der Allelgrößen in die Stammbäume entstanden waren, aufgedeckt und korrigiert werden. Etwaige Fehler, die in den Ergebnisbesprechungen unentdeckt blieben, wurden durch die Software PEDCHECK aufgespürt. Eine derart sorgfältige Kontrolle der Genotypdaten war unverzichtbar, da bereits kleinste Fehler zu falschen Ergebnissen in den Kopplungsanalysen führen können.

Für die Verwaltung der LOD-Werte aus den Zweipunktanalysen, der graphischen Umsetzung der Multimarkeranalyse sowie der Konstruktion der Stammbäume für die Darstellung der Haplotypen wurde wie bereits bei der Verwaltung der Genotypdaten die Software Excel verwendet. Zusätzlich wurden alle Daten aus der GeneScan-Auswertung und den Kopplungsanalysen auf CD-ROM gesichert.

5.3 Kopplungsanalysen

Bei der Zweipunktanalyse wird statistisch geprüft, ob eine Kopplung zwischen einem Marker und einem Phänotyp vorliegt. Dabei liegt der statistische Grenzwert für das Vorliegen einer Kopplung bei 3.00 bei einem Rekombinationswert von $\theta = 0.00$. Ein signifikant positiver LOD-Wert größer 3.00 bei einem Rekombinationswert von $\theta = 0.00$ wurde für keinen der getesteten Marker gefunden.

Daher waren in dieser Arbeit die Marker mit LOD-Werten kleiner 3.00 bei einem Rekombinationswert von $\theta = 0.00$ von Bedeutung. LOD-Werte zwischen 3.00 und -2.00 bei einem Rekombinationswert von $\theta = 0.00$ gelten als nicht signifikant. Für diese LOD-Werte war eine klare Aussage über Kopplung zum Phänotyp allein anhand der Höhe der LOD-Werte aus den Zweipunktanalysen nicht möglich.

Um für diese Marker eine Aussage darüber treffen zu können, ob eine Kopplung möglich oder eher unwahrscheinlich ist, musste die Segregation der Markerallele im Stammbaum nachvollzogen werden. Es sei hier nochmals darauf hingewiesen, dass die LOD-Wert-Simulation mit allen bislang zur Verfügung stehenden Familienmitgliedern einen LOD-Wert von $Z_{max} = 1.94$ bei einem Rekombinationswert von $\theta = 0.00$ erreichte. Dies bedeutet, dass selbst Marker, die aufgrund ihrer Allelkonstellation im Stammbaum Hinweise auf eine Kopplung zum Phänotyp brachten, in dieser Arbeit keinen signifikant positiven LOD-Wert erreichen konnten. Als gutes Beispiel sei hier der Marker D1S1595 genannt. Dieser Marker typisiert für alle betroffenen Personen heterozygot und alle Betroffenen zeigen das Allel 289 bp (Abb. 4-5). Eine Kopplung dieses Markers zur Kamptodaktylie ist somit aufgrund der Allelkonstellation im Stammbaum möglich. Da jedoch die beiden Personen 305 und 501 für diesen Marker nicht typisiert wurden, erreichte dieser Marker einen relativ niedrigen LOD-Wert von 0.95 bei einem Rekombinationswert von 0.00.

Die Schwierigkeit der Interpretation nicht signifikanter LOD-Werte kann auch am Beispiel des Markers D10S1435 veranschaulicht werden. Dieser Marker erreichte zwar in der Zweipunktanalyse einen LOD-Wert von 1.36 bei einem Rekombinationswert von $\theta = 0.00$, zeigt in der Familie jedoch nur drei Allele und typisiert für drei Personen homozygot (Abb. 4-20). Eine Aussage über Kopplung zum Phänotyp war daher für diesen Marker trotz eines relativ hohen positiven LOD-Werts nicht möglich.

Ebenfalls von großer Bedeutung waren in dieser Arbeit neben den Markern mit nicht signifikanten LOD-Werten die Marker, die in der Zweipunktanalyse LOD-Werte kleiner –2.00 bei einem Rekombinationswert von $\theta = 0.00$ zeigten. Diese signifikant negativen LOD-Werte lieferten Informationen darüber, welche Loci für eine Kopplung zum Phänotyp ausgeschlossen werden konnten. Auf diese Weise war es möglich, die für eine Kopplung in Frage kommenden Loci auf den fünf getesteten Chromosomen stark einzugrenzen.

Bei der Multimarkeranalyse werden die LOD-Werte aller Marker eines Chromosoms in einem Koordinatensystem gegen die Kartenpositionen (cM) aufgetragen und als Kurve dargestellt. Während bei der Zweipunktanalyse nur ein einzelner Marker gegen den Phänotyp getestet wird, werden bei der Multimarkeranalyse die Informationen über benachbarte Marker mit verrechnet. Die Multimarkeranalyse ermöglicht so, mehr Informationen aus den Genotypdaten einer Familie zu erhalten als die Zweipunkt-analyse für jeden einzelnen Marker allein. So können Probleme vermieden werden, die durch den begrenzten Informationsgehalt eines Markers entstehen können.

Dies bedeutete in dieser Studie, dass sich die LOD-Werte aus den Zweipunktanalysen für diejenigen Marker veränderten, für die nicht alle Meiosen informativ waren. Idealerweise wurden die LOD-Werte der Zweipunktanalyse angehoben. Dies traf beispielsweise für den Marker D3S3045 zu, der in der Zweipunktanalyse einen LOD-Wert von $Z_{max} = 1.48$ ($\theta = 0.00$) und in der Multimarkeranalyse einen LOD-Wert von $Z_{max} = 2.24$ ($\theta = 0.00$) erreichte (Tab. 4-14, Abb. 4-18). Jedoch konnten auch Marker mit leicht positiven LOD-Werten aus der Zweipunktanalyse durch die Multimarker-analyse ausgeschlossen werden oder zu negativen LOD-Werten führen. Als Beispiel sei hier der Marker D10S2327 genannt. Für diesen Marker wurde in der Zweipunktanalyse ein LOD-Wert von $Z_{max} = 1.26$ ($\theta = 0.00$) und in der Multimarkeranalyse ein LOD-Wert von $Z_{max} = -0.68$ ($\theta = 0.00$) gefunden (Tab. 4-19, Abb. 4-22). Die Multimarkeranalyse ist somit als sehr nützliche Erweiterung zur Zweipunktanalyse zu bewerten.

Bei der Haplotypanalyse werden die Allele aller Marker eines Chromosoms linear untereinander angeordnet und in einen Stammbaum übertragen. Als Haplotypen werden Blöcke von Allelen bezeichnet, die von einer Person gemeinsam an die Nachkommen weitergegeben werden. Bei der Haplotypanalyse ist es neben der Identifikation von Rekombinationsereignissen möglich, die Segregation von Haplotypen des Indexpatienten durch farbliche Kennzeichnung der maternalen und/oder paternalen Haplotypen im Stammbaum nachzuvollziehen. Einerseits konnten, wie beispielsweise auf Chromosom 1, Haplotypen, die die Indexpatientin mit anderen Betroffenen teilt, als potentielle Krankheitsloci identifiziert werden. Andererseits konnte eine Kopplung des Krankheitslocus zu Haplotypen ausgeschlossen werden, die auch bei nicht betroffenen Personen zu finden waren. Dies untermauert die Wichtigkeit der nicht betroffenen Personen dieser Familie für die Kopplungsanalysen. Die hohe Aussagekraft der Haplotypanalyse spiegelt sich beispielsweise in Chromosom 17 wieder. Die Indexpatientin gab unterschiedliche Haplotypen für das gesamte Chromosom an die beiden betroffen Kinder weiter (Abb. 4-24). Dies ermöglichte den Ausschluss des Chromosoms 17 allein durch die Haplotypanalyse. Dennoch ist die Haplotypanalyse, wie die Multimarkeranalyse, nur als Ergänzung zur Zweipunktanalyse anzusehen.

5.4 Testung der Kandidatengene

Bei der Kamptodaktylie handelt es sich um eine klinisch heterogene Fingeranomalie mit variabler Expressivität und reduzierter Penetranz. Man unterscheidet zwischen einer syndromalen und einer isolierten Form, wobei die isolierte Form sporadisch oder familiär gehäuft auftreten kann. Bei der hereditären Form wird weiter nach dem Manifestationsalter zwischen einer frühen und einer späten Form differenziert. Diese klinische Heterogenität legt die Vermutung nahe, dass Mutationen in unterschiedlichen Genen zur Ausbildung einer Kleinfingerkontraktur im Sinne einer Kamptodaktylie führen können (genetische Heterogenität).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Lokalisation des Gens, das die Kleinfingerkontraktur in der untersuchten Familie verursacht hat. Da kein Anhaltspunkt dafür bestand, welche Chromosomen für eine Kopplung zur Kamptodaktylie in Frage kommen, wurde zunächst nach Kandidatengenen gesucht. Als Kandidatengen kann allgemein jedes beliebige Gen bezeichnet werden, das aufgrund einer bekannten Eigenschaft, beispielsweise dem exprimierten Protein oder der Lokalisation im Genom, potentiell an der Auslösung einer Krankheit oder eines Symptoms beteiligt sein kann. Abbildung 5-2 gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit getesteten Kandidatengene.

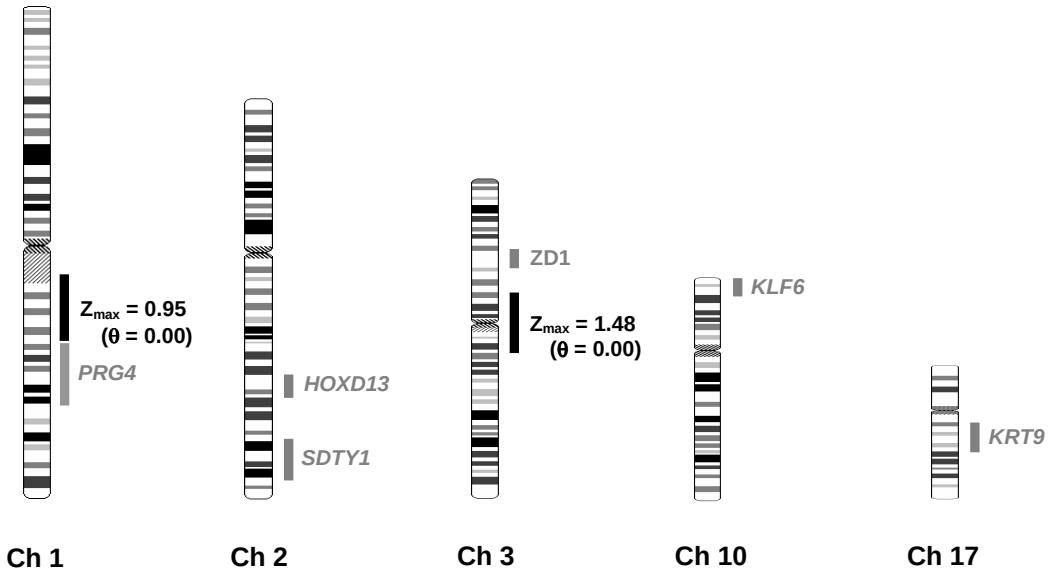

Abbildung 5-2: Kandidatengene und Kandidatenloci
Die ausgeschlossenen Kandidatengene sowie der ebenfalls ausgeschlossene Kandidatenlocus ZD1 sind grau dargestellt. Die schwarzen Balken kennzeichnen die beiden in dieser Arbeit identifizierten Kandidatenloci auf den Chromosomen 1 und 3 sowie die für diese Loci maximal erreichten LOD-Werte aus den Zweipunktanalysen

Die Suche richtete sich zuerst auf Gene, die mit der Entstehung einer syndromalen Kamptodaktylie assoziiert sind. Sie führte zum Jacobs-Syndrom (OMIM 208250). Dieses Syndrom wird durch Mutationen innerhalb des Gens *PRG4* auf dem langen Arm von Chromosom 1 verursacht. Da dieses Gen auch an der Entstehung der isolierten Kamptodaktylie in der untersuchten Familie beteiligt sein könnte, wurden große Erwartungen in dieses Kandidatengen gesetzt. In der Zweipunktanalyse wurde dieses Gen jedoch durch signifikant negative LOD-Werte von $Z_{max} < -5.98$ ($\theta = 0.00$) der drei Marker D1S2799, D1S215 und D1S518 ausgeschlossen. Der Ausschluss dieses Gens konnte in der anschließenden Multimarkeranalyse ($Z_{max} < -6.71$; $\theta = 0.00$) und in der Haplotypanalyse bestätigt werden (Abb. 4-4, Abb. 4-5).

Mit dem *KLF6*-Gen wurde ein Gen ausgewählt, dem eine Beteiligung an der Pathogenese des Morbus Dupuytren zugeschrieben wird (Bayat et al. 2003, b). Das *KLF6*-Gen liegt am telomeren Ende des kurzen Arms von Chromosom 10. Beim Morbus Dupuytren kommt es durch Knoten- und Strangbildung entlang der Palmaraponeurose zur Verkürzung der Beugesehnen mit konsekutiver Verkrümmung der Finger. Meist beginnt diese Erkrankung am fünften Strahl und führt am Kleinfinger zu einer der Kamptodaktylie ähnlichen Kontraktur. Der Ausschluss dieses Kandidatengens war allein in der Zweipunktanalyse nicht möglich, da für den Marker D10S1435 ein positiver LOD-Wert von $Z_{max} = 1.36$ ($\theta = 0.00$) gefunden wurde. Dieser positive LOD-Wert kam zustande, weil alle betroffenen Personen das Allel 258 bp zeigen. Da jedoch die wichtigen Personen 302, 303 und 305 für das Allel 258 bp homozygot typisieren, war der Marker nicht informativ und eine Aussage über Kopplung zum Phänotyp für diesen Marker trotz des positiven LOD-Werts aus der Zweipunktanalyse nicht möglich (Abb. 4-20). In der Haplotypanalyse konnte das Gen jedoch sicher ausgeschlossen werden, da die Indexpatientin für den kompletten kurzen Arm von Chromosom 10, auf dem das *KLF6*-Gen liegt, unterschiedliche Haplotypen an beide betroffene Kinder weitergegeben hat (Abb. 4-21).

Nachdem auch dieses Kandidatengen ausgeschlossen werden konnte, wurden die Chromosomen 2 und 3 für eine Testung ausgewählt. Auf Chromosom 2 liegen die Gene *SDTY1* (Syndaktylie Typ I; OMIM 185900) und *HOXD13* (Synpolydaktylie; OMIM 142989), auf Chromosom 3 befindet sich der ZD1-Locus (Zygodaktylie; OMIM 609815). Diese beiden Gene sowie der ZD1-Locus wurden aufgrund ihrer Lokalisation als Kandidatengene ausgewählt. Es ist denkbar, dass an diesen Orten noch weitere Gene lokalisiert sind, die an der Entwicklung der Hände beteiligt sind. Daher könnte dort das Gen zu finden sein, welches die Kleinfingerkontraktur in der untersuchten Familie verursacht hat.

Auf dem langen Arm von Chromosom 2 wurde zunächst das *SDTY1*-Gen auf Kopplung zur Kamptodaktylie getestet und bereits in der Zweipunktanalyse durch signifikant

negative LOD-Werte von $Z_{max} < -4.62$ ($\theta = 0.00$) der Marker D2S1345, D2S1371, D2S434 und D2S1363 ausgeschlossen. Für das *HOXD13*-Gen auf dem langen Arm von Chromosom 2 war ein Ausschluss in der Zweipunktanalyse nicht möglich. Der Marker D2S1391 war nicht informativ, da die Personen 301, 303, 402, 403 und 503 für das Allel 125 bp homozygot typisieren (Abb. 4-7). In der Multimarkeranalyse konnten sowohl das *SDTY1*-Gen als auch das *HOXD13*-Gen auf Chromosom 2 durch signifikant negative LOD-Werte von $Z_{max} < -2.00$ ($\theta = 0.00$) ausgeschlossen werden. Auf Chromosom 3 wurde der ZD1-Locus auf Kopplung zur Kamptodaktylie getestet und durch die beiden Marker D3S2409 und D3S3666 ausgeschlossen ($Z_{max} < -4.25$; $\theta = 0.00$). Der Ausschluss dieses Locus konnte auch in der anschließenden Multimarkeranalyse ($Z_{max} < -2.00$; $\theta = 0.00$) bestätigt werden (Abb. 4-18).

Abschließend wurde das *KRT9*-Gen auf dem langen Arm von Chromosom 17 auf Kopplung zur Kamptodaktylie getestet. Mutationen innerhalb dieses Gens führen zur hereditären Palmoplantarkeratose. Dieses Gen wurde als Kandidatengen ausgewählt, weil eine Hyperkeratose der Haut in den Handinnenflächen zu einer der Kamptodaktylie ähnlichen Fingerkontraktur führen kann. In der Zweipunktanalyse wurde für den Marker D17S1299 ein LOD-Wert von $Z_{max} = 0.12$ ($\theta = 0.00$) gefunden, die Multimarkeranalyse zeigte jedoch für das *KRT9*-Gen und große Regionen des Chromosoms signifikant negative LOD-Werte von $Z_{max} < -2.00$ ($\theta = 0.00$), sodass dieses Kandidatengen ausgeschlossen werden konnte (Abb. 4-25). Die Haplotypanalyse schloss das gesamte Chromosom 17 für eine Kopplung zum Krankheitslocus aus, da die Indexpatientin unterschiedliche Haplotypen für das gesamte Chromosom an die Nachkommen weitergegeben hat (Abb. 4-24).

Die Suche nach geeigneten Kandidatengenen für die in dieser Arbeit durchgeführten Kopplungsanalysen gestaltete sich schwierig. Mit dem *PRG4*-Gen, welches mit der syndromalen Kamptodaktylie assoziiert ist, wurde lediglich ein Erfolg versprechendes Kandidatengen ausfindig gemacht. In die anderen Kandidatengene wurden weit weniger Erwartungen gelegt. Die Zweipunkt-, Multimarker- und Haplotypanalysen konnten eine Kopplung der Kamptodaktylie zu allen fünf Kandidatengenen und dem Kandidatenlocus ZD1 ausschließen. Somit erbrachte der Kandidatengenansatz in dieser Arbeit nicht den erhofften Hinweis auf die Lokalisation des Kamptodaktyliegens in der untersuchten Familie.

Dennoch ist, wie in dieser Arbeit, ein Kandidatengenansatz immer dann sinnvoll, wenn kein Anhalt für die Lokalisation eines symptomverursachenden Gens besteht und die Wahrscheinlichkeit für jeden Locus im gesamten Genom gleich hoch ist, Hinweise auf eine Kopplung zu finden. In einem solchen Fall vermag jedes Kandidatengen, wenn auch nur geringfügig, die Chance auf den Nachweis einer Kopplung zum Phänotyp zu erhöhen.

5.5 Identifikation zweier Kandidatenloci

Nachdem die Kandidatengene ausgeschlossen waren, wurden die verbleibenden Loci der Chromosomen 1, 2, 3, 10 und 17 auf Kopplung zur Kamptodaktylie getestet. Dies führte in den zentromeren Regionen der Chromosomen 1 und 3 zur Identifikation zweier Kandidatenloci. Bei den identifizierten Kandidatenloci handelt es sich um DNA-Regionen, in denen mindestens zwei benachbarte Marker in der Zweipunktanalyse positive LOD-Werte erreichten, sich in der Multimarkeranalyse als Intervall positiver LOD-Werte darstellen und aufgrund dieser besonderen Eigenschaften von großem Interesse für eine Feinkartierung sind.

Der erste Kandidatenlocus befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 1 und erstreckt sich über ein Intervall von 48 cM von Position 134 cM bis 182 cM (Abb. 5-3). Dieser Locus muss in anschließenden Analysen detaillierter untersucht werden, da hier positive LOD-Werte für die Marker D1S1595 ($Z_{max} = 0.95$, $\theta = 0.00$) und D1S1677 ($Z_{max} = 0.75$; $\theta = 0.00$) gefunden wurden. Diese LOD-Werte kamen zustande, weil die Indexpatientin (302) den gleichen Haplotyp für diese Marker zeigt wie ihre Enkeltochter (502). Die Höhe der LOD-Werte ist bemerkenswert, weil zwei wichtige Personen, die erst später in diese Arbeit aufgenommen wurden, für diese Marker nicht typisiert werden konnten. Alle übrigen Regionen auf Chromosom 1 wurden in der Zweipunktanalyse durch überwiegend signifikant negative LOD-Werte $Z_{max} < -2.00$ ($\theta = 0.00$) sowie in der Multimarker- und Haplotypanalyse ausgeschlossen (Abb. 4-4, Abb. 4-5).

Der zweite Kandidatenlocus im Bereich zwischen Position 80 cM und 134 cM auf Chromosom 3 muss ebenfalls weiter untersucht werden. Dieses Intervall erstreckt sich über den kurzen und langen Arm des Chromosoms. Auf diesem Kandidatenlocus wurden für die fünf Marker D3S1285, D3S2406, D3S1603, D3S2459 und D3S3045 positive LOD-Werte zwischen $Z_{max} = 0.69$ ($\theta = 0.00$) und $Z_{max} = 1.48$ ($\theta = 0.00$) gefunden. Diese positiven LOD-Werte kamen zustande, weil die Indexpatientin und ihre Enkelin für diese Marker den gleichen Haplotyp haben. Der höchste LOD-Wert der gesamten Arbeit wurde für den Marker D3S3045 ($Z_{max} = 1.48$; $\theta = 0.00$) gefunden (Abb. 5-4). Der in der Simulation erreichte maximale LOD-Wert von $Z_{max} = 1.94$ ($\theta = 0.00$) konnte in der Zweipunktanalyse für diesen Marker nicht erreicht werden, da die Personen 302, 303 und 305 homozygot für das Allel 192 bp typisieren (Abb. 4-15). In der Multimarkeranalyse wurde für diesen Marker jedoch ein LOD-Wert von $Z_{max} = 2.24$ ($\theta = 0.00$) gefunden (Abb. 4-18). Es soll an dieser Stelle nochmals darauf hingewiesen werden, dass der in der LOD-Wert-Simulation maximal erreichte Wert ($Z_{max} = 1.94$; $\theta = 0.00$) nur für Ergebnisse aus Zweipunktanalysen gilt. Durch Verrechnung der Genotypdaten der fünf Marker (D3S1285, D3S2406, D3S1603, D3S2459, D3S3045), die alle positive LOD-Werte in der Zweipunktanalyse zeigten,

konnte in der Multimarkeranalyse die Informativität jedes einzelnen Markers erhöht und für Marker D3S3045 ein LOD-Wert von $Z_{max} = 2.24$ ($\theta = 0.00$) erreicht werden. Auch auf Chromosom 3 konnten alle übrigen Loci durch überwiegend signifikant negative LOD-Werte von $Z_{max} < -2.00$ ($\theta = 0.00$) in der Multimarkeranalyse für eine Kopplung zur Kamptodaktylie ausgeschlossen werden.

Die Multimarkeranalyse für Chromosom 2 fand ausschließlich negative LOD-Werte für alle auf diesem Chromosom getesteten Marker (Abb. 4-9). Die LOD-Werte waren lediglich im Intervall von 0 cM bis 50 cM nicht signifikant negativ ($Z_{max} = -0.27$; $\theta = 0.00$). Die Haplotypanalyse zeigte, dass die Indexpatientin (302) und ihr nicht betroffener Enkel (503) bis auf einen Marker für das komplette Chromosom den gleichen Haplotyp haben. Somit konnte die Lokalisation des Krankheitslocus auf Chromosom 2 anhand der Haplotypanalyse mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Die Zweipunktanalyse für Chromosom 10 zeigte fast ausschließlich signifikant negative LOD-Werte (Tab. 4-22), auch in der Multimarkeranalyse wurden bis auf ein Intervall von 10 cM am telomeren Ende des kurzen Arms ausschließlich negative LOD-Werte von $Z_{max} < -0.40$ ($\theta = 0.00$) gefunden (Abb. 4-22). Die Haplotypanalyse zeigte keinen Haplotyp, der ausschließlich bei Betroffenen zu finden ist (Abb. 4-21). Die Lokalisation des Krankheitslocus auf Chromosom 10 konnte daher mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Das Chromosom 17 konnte allein aufgrund der Haplotypanalyse ausgeschlossen werden, da die Indexpatientin unterschiedliche Haplotypen für das gesamte Chromosom an beide betroffenen Nachkommen weitergegeben hat (Abb. 4-24). Dieser Ausschluss wurde durch signifikant negative LOD-Werte von $Z_{max} < -2.00$ ($\theta = 0.00$) für das komplette Chromosom in der Multimarkeranalyse bestätigt (Abb. 4-25).

Von den fünf getesteten Chromosomen konnten die Chromosomen 2, 10 und 17 in den Kopplungsanalysen komplett für eine Kopplung zur Kamptodaktylie ausgeschlossen werden. Auf dem langen Arm von Chromosom 1 wurde ein Kandidatenlocus in einem Intervall zwischen 134 cM - 182 cM gefunden. Auf Chromosom 3 konnte ein weiterer Kandidatenlocus in einem Intervall zwischen 80 cM - 134 cM identifiziert werden, der sich sowohl auf dem kurzen als auch auf dem langen Arm des Chromosoms befindet. Alle anderen Loci auf den Chromosomen 1 und 3 konnten ebenfalls für eine Kopplung zur Kamptodaktylie ausgeschlossen werden.

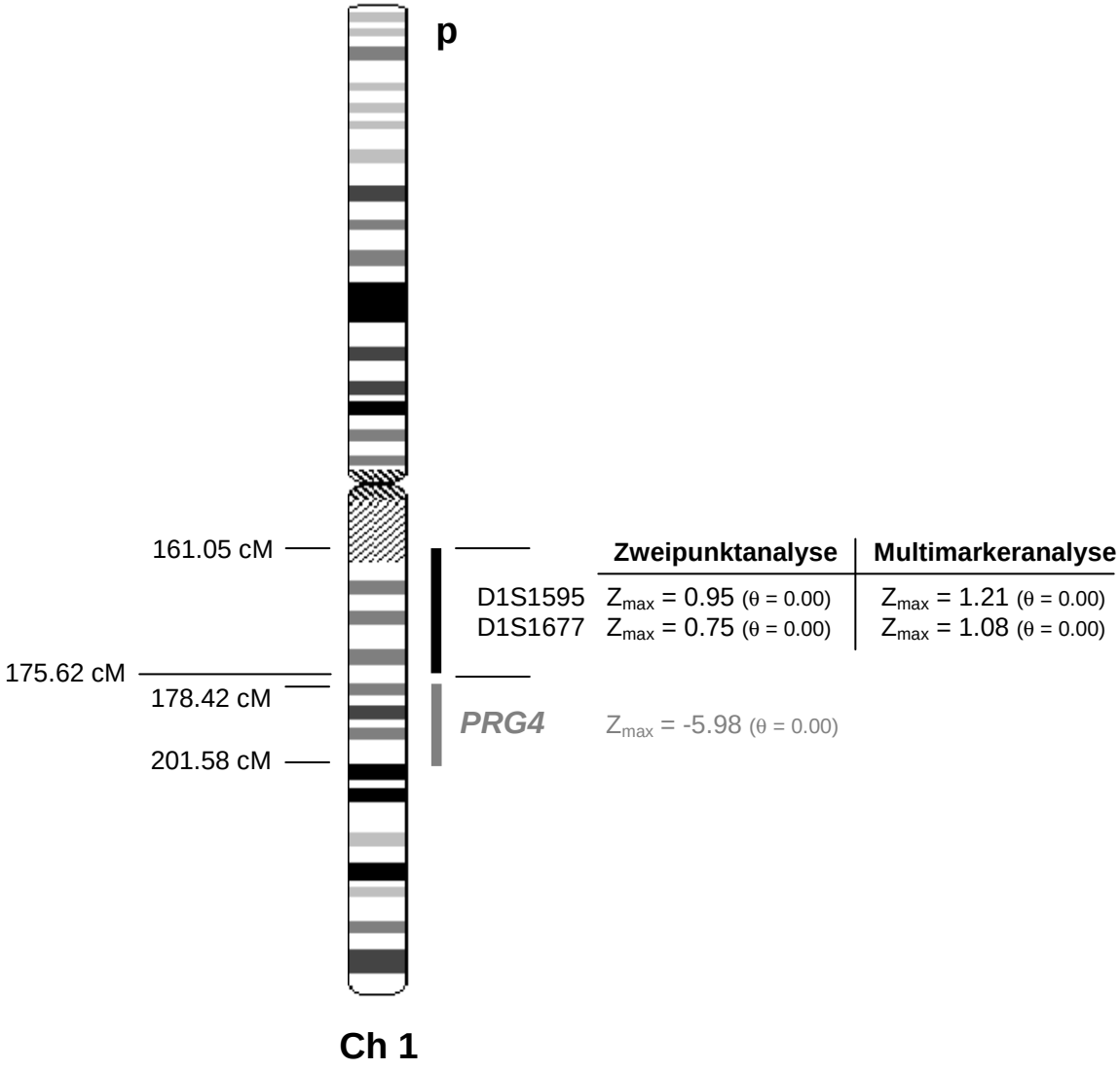

Abbildung 5-3: Kandidatenlocus auf Chromosom 1
Der schwarze Balken kennzeichnet den Kandidatenlocus mit den beiden Markern D1S1595 und D1S1677. Die Lokalisation des ausgeschlossenen Kandidatengens *PRG4* auf dem langen Arm von Chromosom 1 ist durch einen grauen Balken markiert

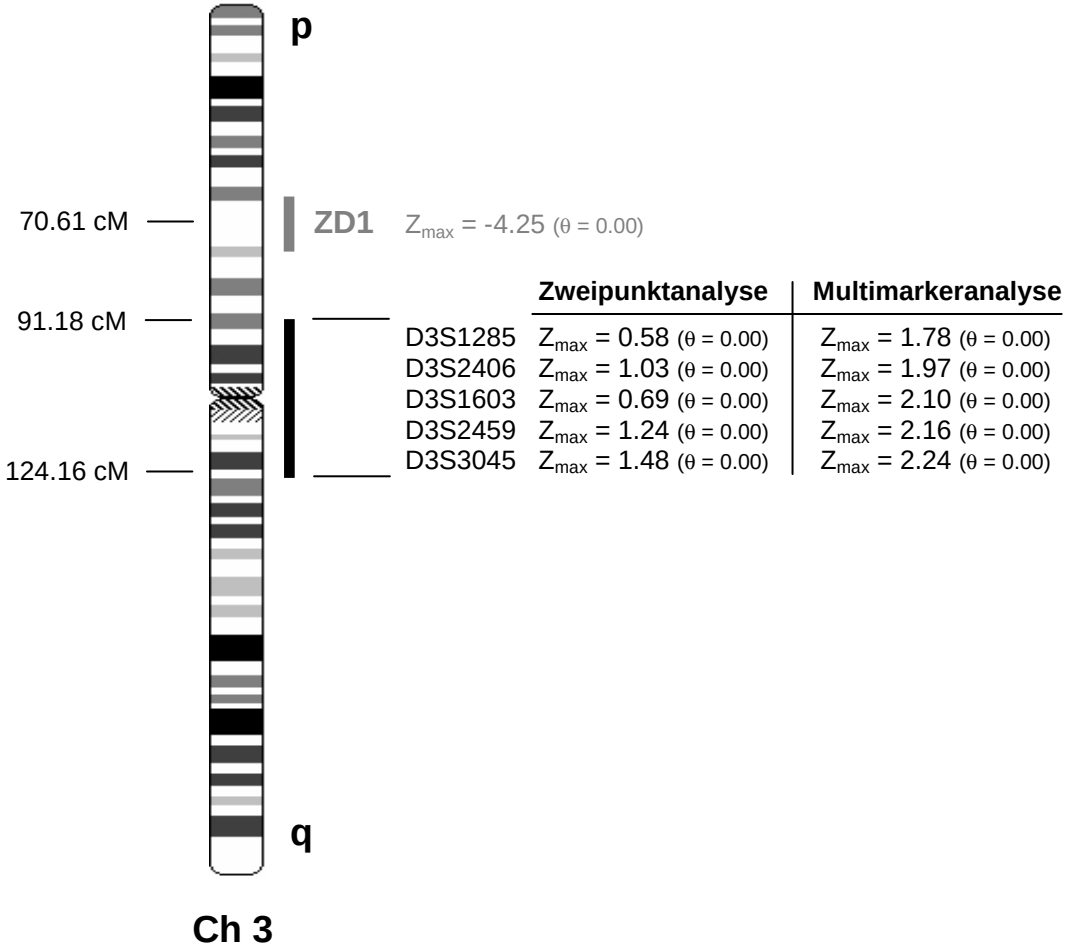

Abbildung 5-4: Kandidatenlocus auf Chromosom 3
Der schwarze Balken kennzeichnet den Kandidatenlocus mit fünf Mikrosatellitenmarkern, der graue Balken markiert den ausgeschlossenen ZD1-Locus

5.6 Ausblick

Die fünf in dieser Arbeit analysierten Chromosomen 1, 2, 3, 10 und 17 machen einen Anteil von 30,24% des kompletten Genoms aus. Durch Testung dieser fünf Chromosomen konnten 28,57% des Genoms für eine Kopplung zum Krankheitslocus ausge-schlossen werden.

Der nächste sinnvolle Schritt bei der Suche nach dem Krankheitslocus ist die Analyse der verbleibenden 17 Autosomen. Nach etwaiger Identifikation weiterer interessanter Loci sollten für alle in Frage kommenden Kandidatenloci Feinkartierungen durch-geführt werden.

Der höchste LOD-Wert, der in den Zweipunktanalysen für den Stammbaum der Familie mit allen in dieser Arbeit typisierten Personen erreicht wurde, beträgt $Z_{max} = 1.94$ ($\theta = 0.00$). Die Identifikation des Krankheitslocus wird also erst dann möglich, wenn weitere Familienmitglieder für die Feinkartierungen rekrutiert werden. Im Hinblick darauf wurden bereits vor Beginn der Kopplungsanalysen LOD-Wert-Simulationen durchgeführt. Aufgrund dieser Simulationen ist bekannt, wie viele und welche weiteren Familienmitglieder nötig sein werden, um für den Stammbaum einen signifikant positiven LOD-Wert zu erzielen. Die Hinzunahme der Personen 504, 406 und 407 erhöht den maximal erreichbaren LOD-Wert in der Zweipunktanalyse auf $Z_{max} = 2.68$ ($\theta = 0.00$). Es müssen daher noch mindestens zwei weitere Personen, beispielsweise Kinder der Personen 203 und 502, rekrutiert werden, damit ein signifikanter LOD-Wert von $Z_{max} > 3.00$ ($\theta = 0.00$) in den Feinkartierungen der Kandidatenloci erreicht werden kann.

Um den Krankheitslocus möglichst eng eingrenzen zu können, sind Feinkartierungen mit einer großen Anzahl an Mikrosatellitenmarkern und einem möglichst geringen Intermarkerabstand von ein bis zwei Zentimorgan durchzuführen. Ist eine Region zweifelsfrei als Krankheitslocus identifiziert, folgt die Suche nach Kandidatengenen in dieser Region und eine Mutationssuche innerhalb dieser Kandidatengene.

Aufgrund der klinischen Heterogenität der Kamptodaktylie ist am ehesten davon auszugehen, dass die Kamptodaktylie auch genetisch heterogen ist und wahrscheinlich mehrere Gene zur Manifestation einer Kamptodaktylie führen können. Dies bedeutet, dass die Ursache einer Kamptodaktylie in unterschiedlichen Familien nicht in demselben Gen begründet sein muss.

6 Zusammenfassung

Die isolierte, nicht syndromale Kamptodaktylie ist eine schmerzlose Beugekontraktur im proximalen Interphalangealgelenk und betrifft fast ausschließlich die Kleinfinger. Man unterscheidet eine Form mit familiär gehäuftem Auftreten von der sporadischen Form. Die familiär gehäufte Form der Kamptodaktylie folgt in der Regel einem autosomal dominanten Erbgang. Die sporadische Form kann beispielsweise durch Verbrennungen oder einen Unfall erworben sein. Ist die sporadische Form nicht traumatischer Genese, kommen Neumutationen als wahrscheinlichste Ursache in Betracht. Neumutationen werden dann autosomal dominant weitervererbt. Als seltene Ursache für die sporadisch auftretende, isolierte Kamptodaktylie kann auch eine autosomal rezessiv vererbte Form nicht ausgeschlossen werden. Die Kamptodaktylie tritt außerdem syndromal, beispielsweise beim Jacobs-Syndrom, auf.

In dieser Arbeit stand eine fünf Generationen umfassende Familie mit isolierter, nicht syndromaler Kamptodaktylie für Kopplungsanalysen zur Verfügung. Die Kamptodaktylie folgt in dieser Familie einem autosomal dominanten Erbgang. Von 17 noch lebenden Personen sind 8 Personen betroffen. Eine männliche Person ist Genträger, zeigt jedoch als Ausdruck reduzierter Penetranz keine Kamptodaktylie. Die Expressivität der Kamptodaktylie ist in dieser Familie variabel. Der Ausprägungsgrad der Kleinfingerkontraktur sowie die Geschlechterverteilung weisen eine deutliche Gynäkotropie auf. Die LOD-Wert-Simulation erreichte für den Stammbaum der Familie mit allen in dieser Arbeit verfügbaren Familienmitgliedern einen maximalen LOD-Wert von $Z_{max} = 1.94$ ($\theta = 0.00$) für die Zweipunktanalysen.

Für die Genotypisierung wurden Mikrosatellitenmarker in einem durchschnittlichen Intermarkerintervall von 10 cM ausgewählt. Die DNA-Fragmente der Mikrosatellitenmarker wurden mit der Methode der Polymerasekettenreaktion amplifiziert und mit der GeneScan-Methode auf ihre Allellängen hin analysiert. Zunächst wurden die Kandidatengene *PRG4*, *HOXD13*, *SDTY1*, *KLF6*, *KRT9* sowie der Locus ZD1 und anschließend die gesamten Chromsomen 1, 2, 3, 10 und 17 auf Kopplung zur Kamptodaktylie getestet. Somit wurden in dieser Arbeit insgesamt 30,24% des kompletten Genoms analysiert.

Die Kandidatengene *PRG4* auf 1q24-25 ($Z_{max} < -5.93$; $\theta = 0.00$), *SDTY1* auf 2q34-36 ($Z_{max} < -4.62$; $\theta = 0.00$) sowie der Locus ZD1 auf 3p21.31 ($Z_{max} < -4.25$; $\theta = 0.00$) konnten durch signifikant negative LOD-Werte in den Zweipunktanalysen ausgeschlossen werden. Die Kandidatengene *HOXD13* auf 2q31 ($Z_{max} < -7.41$; $\theta = 0.00$) sowie *KRT9* auf 17q12-21 ($Z_{max} < -5.33$; $\theta = 0.00$) wurden durch signifikant negative LOD-Werte in der Multimarkeranalyse ausgeschlossen. Das Kandidatengen *KLF6* auf 10p15 konnte aufgrund unterschiedlicher Haplotypen der beiden betroffenen Kinder der Indexpatientin für den 10p15-Locus in der Haplotypanalyse ausgeschlossen werden.

Bei der anschließenden Analyse der verbleibenden Loci auf den Chromosomen 1, 2, 3, 10 und 17 konnte ein Kandidatenlocus auf dem langen Arm von Chromosom 1 im Intervall zwischen 134 - 182 cM (D1S1595; Zweipunktanalyse: $Z_{max} = 0.95$; Multimarkeranalyse: $Z_{max} = 1.21$; $\theta = 0.00$) identifiziert werden. Ein zweiter Kandidatenlocus liegt auf Chromosom 3 im Intervall von 80 - 134 cM. Der höchste LOD-Wert wurde für den Marker D3S3045 (Zweipunktanalyse: $Z_{max} = 1.48$; Multimarkeranalyse: $Z_{max} = 2.24$; $\theta = 0.00$) auf dem langen Arm des Chromosoms gefunden. Die Haplotypanalysen zeigten für beide Kandidatenloci gleiche Haplotypen bei der Indexpatientin sowie deren Enkeltochter.

Diese beiden Kandidatenloci sind nun in Feinkartierungen detaillierter zu untersuchen. Vor Durchführung der Feinkartierungen ist es sinnvoll, eine genomweite Analyse durchzuführen, um weitere Kandidatenloci mit möglicherweise höheren LOD-Werten auf den verbleibenden Chromosomen zu identifizieren.

7 Abkürzungen und Symbole

7.1 Abkürzungen

a	Jahre
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
CACP	Kamptodaktylie-Arthropathie-Coxa-vara-Perikarditis-Syndrom
CEPH	Centre d'Etude du Polymorphisme Humain, Frankreich
Ch	Chromosom
cM	Zentimorgan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
engl.	englisch
et al.	und „Mitarbeiter“
EtBr	Ethidiumbromid
F	Vorwärtsprimer
H_0	Nullhypothese
H_1	Alternativhypothese
H_2O	Wasser
HOXD13	Homeobox D13
HPLC	High Performance Liquid Chromatography = H_2O für PCR
KLF	Kruppel-like factor
LOD	Logarithm of odds
M	Mol
M.	Morbus = Krankheit
MIM	Mendelian Inheritance in Man
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
p	kurzer Arm eines Chromosoms
PCR	Polymerasekettenreaktion
PIP-Gelenk	Proximales Interphalangealgelenk
PRG	Proteoglykan
q	langer Arm eines Chromosoms

R	Rückwärtsprimer
RCLB	Red Cell Lysis Buffer
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDTY1	Syndaktylie Typ I
SE	Disodium-EDTA und Sodiumchlorid
SPD	Synpolydaktylie
Tab.	Tabelle
Taq	Polymerase isoliert aus *Thermophilus aquaticus*
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylendiamid
TGF-beta 1	"Zytokin"
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
v. a.	vor allem
ZD	Zygodaktylie
Zf9	"Transkriptionsfaktor"
Z_{max}	Maximal erreichter LOD-Wert

7.2 Symbole

♂	männliches Geschlecht
♀	weibliches Geschlecht
θ	Rekombinationsrate
Ø	Durchschnitt

8 Literaturverzeichnis

Anderson W (1891) Lectures on contractions of the finger and toes. Their varieties, pathology and treatment. Lancet II: 1-5, 57-59, 197-111, 161-169, 213-215, 279, 282

Bayat A, Stanley JK, Watson JS, Furguson MW, Ollier WE (2003, a) Genetic susceptibility to Dupuytren's disease: transforming growth factor beta receptor (TGFbetaR) gene polymorphism and Dupuytren's disease. Br J Plast Surg 56(4): 328-333

Bayat A, Watson JS, Stanley JK, Furguson MW, Ollier WE (2003, b) Genetic susceptibility to Dupuytren's disease: association of Zf9 transcription factor gene. Plast Reconstr Surg 11(7): 2133-2139

Bosse K, Betz RC, Lee Y-A, WienkerTF, Reis A, Kleen H, Propping P, Cichon S, Nöthen MM (2000) Localization of a gene for syndactyly type 1 to chromosome 2q34-q36. Am J Hum Genet 67: 492-497

Brites MM, Moreno A, Salgado M, Batista AP (1998) Familial camptodactyly. Eur J Dermatol 8: 355-356

Cottingham RW, Jr., Idury RM, Schäffer AA (1993) Faster sequential genetic linkage computations. Am J Hum Genet 53: 252-263

Dautel G (2003) Camptodactylies. Chir Main 22:115-124

Donofrio P, Ayala F (1983) Familial streblodactyly. Acta Derm Venereol 63: 361-363

Hu FZ, Nystrom A, Ahmed A, Palmquist M, Dopico R, Mossberg I, Gladitz J, Rayner M, Post JC, Ehrlich GD, Preston RA (2005) Mapping of an autosomal dominant gene for Dupuytren's contracture to chromosome 16q in a Swedish family. Clin. Genet. 68: 424-429

Kruglyak L, Daly MJ, Reeve-Daly MP, Lander ES (1996) Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach. Am J Hum Genet 58:1347-1363

Landouzy L (1906) Camptodactylie stigmate organique precoce du neuro-arthrism. Press Med 14: 251-253

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

Malik S, Schott J, Ali SW, Oeffner F, Amin-ud-Din M, Ahmad W, Grzeschik K-H, Koch MC (2005) Evidence for clinical and genetic heterogeneity in syndactyly type 1: the phenotype of second and third toe syndactyly maps to chromosome 3p21.31. Eur J Hum Genet 13: 1268-1274

Marcelino J, Carpten J D, Suwairi WM, Gutierrez OM, Schwartz S, Robbins C, Sood, R, Makalowska I, Baxevanis A, Johnstone B, Laxer RM, Zemel L and 13 others (1999) CACP, encoding a secreted proteoglycan, is mutated in camptodactyly-arthropathy-coxa vara-pericarditis syndrome. Nature Genet. 23: 319-322

Mc IA, Beare RL (1958) The surgical management of Dupuytren's contracture. Am J Surg 95:197-203

Miller SA, Dykes DD, Poesky HF (1988) A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 16: 1215

Morton NE (1955) Sequential tests for the detection of linkage. Am J Hum Genet 7: 277-318

Mullis KB, Fallona FA (1985) Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalysed chain reaction. Science 230: 335-350

Muragaki Y, Mundlos S, Upton J, Olsen BR (1996) Altered growth and branching patterns in synpolydactyly caused by mutations in *HOXD13*. Science 272: 548-551

Nevin NC, Hurwitz LJ, Neill DW (1966) Familial camptodactyly with taurinuria. J Med Genet 3:265-268

O'Connell JR, Weeks DE (1998) PedCheck: a program for identification of genotype incompatibilities in linkage analysis. Am J Hum Genet 63:259-266

Ott J (1991) Analysis of human genetic linkage. John Hopkins University Press, Baltimore

Parish JG, Horn DB, Thompson M (1963) Familial streblodactyly with amino-aciduria. Br Med J 5367:1247-1250

Reis A, Kuster W, Eckhardt R, Sperling K (1992) Mapping of a gene for epidermolytic palmoplantar keratoderma to the region of the acidic keratin gene cluster at 17q12-q21. Hum Genet (90): 113-116

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning – a laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York

Schallreuter KU, Reimlinger S (1993) Das Syndrom des krummen Fingers. Hautarzt 44:157-159

Siegert JJ, Cooney WP, Dobnys JH (1990) Management of simple camptodactyly. J Hand Surg 15(2): 181-9

Skoog T (1948) Dupuytren's contraction with special references to aetiology and improved surgical treatment: its occurrence in epileptics: note on knuckle-pads. Acta Chir. Scand. 96 (suppl. 139): 1-190, Note P 173

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

Tamplin RW (1846) Lecture on the nature and treatment of deformities. Delivered at the royal orthopaedic hospital. Bloomsbury Square. Longman. Brown, Green and Longmans, London, pp 256

Temtamy SA, McKusick VA (1978) The genetics of hand malformations Vol. 14. New York, Alan R.

Welch JP, Temtamy SA (1966) Hereditary contractures of the fingers (camptodactyly). J Med Genet 3: 104-113

9 Anhang

9.1 Sequenzen der Oligonukleotidprimer

9.1.1 Chromosom 1

Tabelle 9-1: Primer Chromosom 1

Marker	Primer (F)	Sequenz (F)	Primer (R)	Sequenz (R)
D1S2132	GATA68D01	GGGGGTCTACGCTAAACTGA	GATA68D01	ACCAACCTGCACCATTAAAA
D1S244	AFM220yf4a	GAGCAGCACCGTACAAAT	AFM220yf4m	AGCTCCGCTCCCTGTAAT
D1S1597	GATA27E01	TTTATTGAGATATATTTGACATGCA	GATA27E01	AAGGAGGAAAGCTTTTTGGA
D1S1592	GAAT4D10	GGTGACAGGTATTGACTGCC	GAAT4D10	TTGAGGGCAGAGATTGTCTC
D1S1676	GGAA22F10	GGCACAGTTGGCAGAGTAAG	GGAA22F10	CTTGGACTGGAGCTTAGCCT
D1S441	AFM234xb2a	GCACCACTGCACTCCA	AFM234xb2m	TGTAAATGTTTTGTTAAGTCTCCC
D1S2134	GATA72H07	AAAGCACAGTCCACACTCCT	GATA72H07	AGCTCACCTCCTCCAAGAAG
D1S473	AFM286xd9a	GCTGTCCAGGAGCATAGACG	AFM286xd9m	CATGGTTTCCATTTTACAAAGGTG
D1S410	UT2341:A	CACATCATGATTGGGCCAC	UT2341:B	AAAAGTGTGGATGGATATACC
D1S551	GATA6A05	CTGCCAGAGAATAGGGTGAA	GATA6A05	TTGTAATTCTTGGTCCTGCC
D1S2739	AFMb059xb9a	GCAGCATGAAAATAAACTAATACAC	AFMb059xb9m	AAATCAACTGACAGGTCCAA
D1S1595	GATA25B02	ATGGTATGAACCTGGAGGTG	GATA25B02	GGCAGATAAAAGGACTGCAA
D1S1677	GGAA22G10	AGTCAGCTTGATTGACCCAG	GGAA22G10	CTTAGTGTGACAGGAAGGACG
D1S2799	AFMb359xf5a	AGCAAGACCCTGTCTCAAAA	AFMb359xf5m	TGGATAGCTTTCCACCACT
D1S215	AFM150xh4a	GACACAGGTAGGTTAGAAGGATG	AFM150xh4m	TGTCTTGGTGAATTGACCCT
D1S518	GATA7C01	TGCAGATCTTGGGACTTCTC	GATA7C01	AAAAAGAGTGTGGGCAACTG
D1S1660	GATA48B01	TGCTATCCTCTCACCAGTGA	GATA48B01	GTCTGAAGTTCATGGGAACG
D1S1663	GATA50F12	CAACATATGAACAGGCGGAG	GATA50F12	AGCCTCAGAAACTGAGTCCC
D1S2141	GATA87F04	AGACTTACAGCACTGGCTGC	GATA87F04	TGCTCCTAGGAAAGGAAACA
D1S549	GATA4H09	CAAAGAGGACATGTGTTTGTG	GATA4H09	TACCAGCAATGGGTAGTATGG
D1S1656	GATA44E05	GTGTTGCTCAAGGGTCAACT	GATA44E05	GAGAAATAGAATCACTAGGGAACC
D1S3462	ATA29C07	TTTCTCACCTTTAAATGTCATCA	ATA29C07	CCAGTACGCAGATGGTCCTA
D1S1609	GATA50F11	ATACATTTATATTTGCATCTGTGTG	GATA50F11	TGATTCTAGGTTGGTCACTCG

(F = Vorwärtsprimer, R = Rückwärtsprimer)

9.1.2 Chromosom 2

Tabelle 9-2: Primer Chromosom 2

Marker	Primer (F)	Sequenz (F)	Primer (R)	Sequenz (R)
D2S2980	GATA158C03	CTAGTCAGAGCCCTGGTGAA	GATA158C03	AAGGACATTCCAACGGGAAT
D2S1780	GATA72G11	TATGGAAGTGGGACTGAGGA	GATA72G11	CAAATTAGCTGGGTATTGTCTAG
D2S2952	GATA116B01	ATGGCCTATTGTGGGATCTT	GATA116B01	ATTCAGCATGCCCACTGTAT
D2S423	GAAT1A5	AAGCATAGATGAGCAGGCAG	GAAT1A5	TACAAGTATTTTGAAGCCATGC
D2S1400	GGAA20G10	TGGAATCGTTTTACCTCTGC	GGAA20G10	TATAGGTCAACGATAACTCATTCG
D2S405	GATA8F07	CAGAAGCGTGGCAGTTTATT	GATA8F07	GAACAGGATGGGGAAAACTT
D2S1788	GATA86E02	AATGGATGGACAAATGGATG	GATA86E02	CCCTCCATAATTAGATGAGCC
D2S1356	ATA4F03	AGGGCAAAACCGCATCTCTA	ATA4F03	TTCTTGGGCTCCAGGATG
D2S441	GATA72A05	TGCACCCAACATTCTAACAA	GATA72A05	ATTGGAGCTAAGTGGCTGTG
D2S1394	GATA69E12	GGCATCTTTATCCTTAGCCC	GATA69E12	CGGGGTCTGCATTACAGTAT
D2S1777	GATA71G04	TCCCCAAGTAAAGCATTGAG	GATA71G04	GTATGTAGGTAGGGAGGCAGG
D2S1790	GATA88G05	ACATGTCGATCTCAGCGTTC	GATA88G05	GAGTTTTATTGGCCAAAGCA
D2S436	GATA5G02	GATATGGGAGCAACATGAGC	GATA5G02	GGAATCAACTTTCAGTATAAACCC
D2S410	GATA4E11	ATGTAGAAGAGTCAGAATTTCAACC	GATA4E11	CAGACACAAATGCACACACA
D2S1328	GATA27A12	GTGGCTTTGGAGGAACACTA	GATA27A12	TGGCACATGTACACCAGAAC
D2S114	AFM052xf8a	TGTTTATGGTCTCTCGTCCC	AFM052xf8m	CTTGGGTTCCAACTCAGAAG
D2S1326	GATA26B04	AGACAGTCAAGAATAACTGCCC	GATA26B04	CTGTGGCTCAAAAGCTGAAT
D2S142	AFM191wg9a	TGGAGACACTGAACGGGTAG	AFM191wg9m	TGAAAAGTTTTGAGATGGAGAGATT
D2S2330	AFMc015yd9a	AGTCATCTTATAGAAAATAGCAAGC	AFMc015yd9m	AGTTTTACAACTTAATTNTTGGGTG
D2S1776	GATA71D01	AGGAGCTACTGAGGAGGCAT	GATA71D01	TTTCTCACTGCTGGAAAAGG
D2S1391	GATA65C03	CTCACTGTCTGGATTTCTTGG	GATA65C03	TAAGGACAAGTTAAAAAAGCTGG
D2S1384	GATA52A04	AATAGAGGGCCCTTGCTTAA	GATA52A04	TTTGGGATAAAAGGTATTTTGC
D2S1649	Dieser Marker ist nicht in der Marshfield-Liste aufgeführt.			
D2S2208	AFMa246xc5a	CTATTTGTAAACATGCGGGA	AFMa246xc5m	AGCTAAGTACCTGCTCAGGAAA
D2S1345	ATA21C10	GCACTAAAACCCGTGTGATC	ATA21C10	AAAAGCTACAGGCCAGTGTG
D2S164	AFM234xb8a	GTCCTAACAGGCCACAGACC	AFM234xb8m	GCTGGCAGTATCACATGACA
D2S1371	GATA29E02	GTTGGGGGAAGCATTAAAAT	GATA29E02	GATAGCAAGAAGGGCTTTCC
D2S434	GATA4G12	TAAATCACTAGCCTTTGCCG	GATA4G12	GCCATCTGTACTGTTCCCAG
D2S1338	GGAA3A09	CCAGTGGATTTGGAAACAGA	GGAA3A09	ACCTAGCATGGTACCTGCAG
D2S1363	GATA23D03	TTCTGCTTTCTCTGACTGTATCA	GATA23D03	ATTCTTTGTCTCGCCAGTTG
D2S206	AFM259yc9a	TTAAAAATTAAGTAGGCTTTTGGTT	AFM259yc9m	GTCCTCATGTGTTTATGCTGT
D2S1279	UT8067:A	GGCAACAAGAGCGAAACTC	UT8067:B	GGCTTTGTGGGCTTCTAGTA
D2S338	AFM276zf5a	AGAGCCCAAAACAAAACTTCC	AFM276zf5m	TGGAATTTTGATTTTCAGATTTG
D2S125	AFM112yd4a	GCAACAGAGTGAGACCCTGA	AFM112yd4m	TTCTGAGAACCAGATTGTGATTG

(F = Vorwärtsprimer, R = Rückwärtsprimer)

9.1.3 Chromosom 3

Tabelle 9-3: Primer Chromosom 3

Marker	Primer (F)	Sequenz (F)	Primer (R)	Sequenz (R)
D3S3050	GATA88H04	TGGTGGTATGCATTTGTCAG	GATA88H04	ATTCCCTGACTTCAAGTGCA
D3S1560	AFM217xd6a	GCATCTACAGGGGGTGTCT	AFM217xd6m	AGGCTGATTTTCAGCACAA
D3S1304	AFM234tf4a	TTCGCTCTTTGATAGGC	AFM234tf4m	ATTTCATTTGTAATTTACTAGCAG
D3S3680	AFMb363xd5a	AAGGAATTGCAAATGAAAATAGAAA	AFMb363xd5m	GCCTGGTCCCTAACATAACT
D3S3038	GATA73D01	CATCTTTCTTTTCCTGTTCCC	GATA73D01	GATACCATATTCAACATGAAGAGG
D3S2432	GATA27C08	GGCAGGCAGGTAGATAGACA	GATA27C08	ACACTAAACAAGCATAGTCAGGC
D3S1768	GATA8B05	GGTTGCTGCCAAAGATTAGA	GATA8B05	CACTGTGATTTGCTGTTGGA
D3S3564	AFMa162wd9a	AGCTAAACACAGTCTAACTGCAT	AFMa162wd9m	CCCACAGAGTGATAGGGA
D3S3647	AFMb320vc1a	GGCTCAGAGCAGGCATAC	AFMb320vc1m	CCTAACTAATAAAATGTGTTCCCAG
D3S3597	AFMa344zg5a	CACACCCATTAGGATGGAA	AFMa344zg5m	GCAAATAGTAGGTGCTCAATAAACA
D3S3582	AFMa231xe9a	CGATGTGGCTCTGAACTC	AFMa231xe9m	AGGGCCTGTTTCCCTAAG
D3S2409	ATA4D09	GGTGACAGAGACTCTTGTCTCA	ATA4D09	CATTCTGGTTGGGGAACATA
D3S3666	AFMb347zg9a	GGGACTGGNCAAAGTT	AFMb347zg9m	CAAATACCCTGTAAGGCACT
D3S1766	GATA6F06	ACCACATGAGCCAATTCTGT	GATA6F06	ACCCAATTATGGTGTTGTTACC
D3S1285	AFM191yg5a	ATTTAGAAAACCCATACAGCATGGC	AFM191yg5m	TCTGTTCATCACAGGGGTAGCATC
D3S2406	GGAT2G03	GGCTGGATGATCCACTTTAA	GGAT2G03	CCAGTTCCTGCTTCTTGAAA
D3S1603	AFM311vh1a	CCCTAACTCCACTTGAAAGC	AFM311vh1m	TCAGCGAACAGCAACAAAT
D3S2459	GATA68D03	CTGGTTTGGGTCTGTTATGG	GATA68D03	AGGGACTTAGAAAGATAGCAGG
D3S3045	GATA84B	ACCAAATGAGACAGTGGCAT	GATA84B	ATGAGGACGGTTGACATCTG
D3S2460	GATA68F07	ATTGCTTCCCCTTTACCTGA	GATA68F07	GACAGGAGACAGAATGTTATAAGTT
D3S4009	ATA28H11	TGCCCTAACACATCATGTTG	ATA28H11	GGGCACGTGTAACCTTATGT
D3S3528	AFM141xa3a	AAGAGCCCAGATTTTCCACT	AFM141xa3m	AGCTTGTGGCTAATGACAGA
D3S1744	GATA3E04	TTTAAGCGGAAGGAAGTGTG	GATA3E04	CTGGCCCCATCTCTCTCTAT
D3S1763	GATA3H01	AAACCGCTGTGCACTTTATC	GATA3H01	GGAAGGTGCGTATGAATGAG
D3S3053	GATA92B06	AATCCCAAGTGCACAGTGTT	GATA92B06	AAGGCAGAAGAGTGAGAGAGC
D3S2427	GATA22F11	CTCCTCGTCACTGCAGTCTT	GATA22F11	CTGCCTCATCTGTTCAGGAT
D3S3609	AFMb031zg5a	AGCTGGGGACCAGTCT	AFMb031zg5m	CGAGAGTAACTTGTACGGTG
D3S2436	GATA32D12	TCCAATCTCATCCAGGTTTC	GATA32D12	ATGCCCATCAATCAATGAGT
D3S2398	GATA6G12	AGCCTGAGCAAAACAGTGAA	GATA6G12	GAAGACCTACGGATTGGGTC
D3S2418	ATA22E01	GTACATTCTGCACACGTACCC	ATA22E01	AGGACTGTAGGATTCCAAAGG
D3S1311	AFM254ve1a	GGAAGTTTCAGCCAACG	AFM254ve1m	TTAGTCCCACTGATGTTACATTT

(F = Vorwärtsprimer, R = Rückwärtsprimer)

9.1.4 Chromosom 10

Tabelle 9-4: Primer Chromosom 10

Marker	Primer (F)	Sequenz (F)	Primer (R)	Sequenz (R)
D10S1435	GATA88F09	TACTTGGGATGCTAAGGTGG	GATA88F09	TTGGGTTTCCTGACTTGTGT
D10S1153	UT5199:A	CACTACCAGCCTGGGCAA	UT5199:B	GCAGCTTTAAATCCAGGGG
D10S189	AFM063xf4a	CAAAAGTAACCATTGAGCCC	AFM063xf4m	TTGATAGAAGAAGCGATAGATCG
D10S1412	ATA31G11	GCTCCCTGCGTACTGAGATA	ATA31G11	GCACAGTACTTCTCCCTCCA
D10S674	GATA6E06	GCTGGGCCTAGAGTTTTCTT	GATA6E06	GAGGTGGGTGAATCATTTGA
D10S1423	GATA70E11	GGCAGCCTAATAGTTCCGAT	GATA70E11	AGTTTGCAGTGAGCATGGTT
D10S1426	GATA73E11	TTGGTGGTGTCATCCTCTTT	GATA73E11	CTCTTAACTGATTTGGCCGA
D10S1220	ATA20B07	GATTGCTTTAGAAGTGGGCA	ATA20B07	TGTAGGTTTTCACATGTTCAGC
D10S1225	ATA24F10	TCCTTTGTCAGTCATGCTCA	ATA24F10	GTTACATAGGAAGCCCGGAT
D10S1432	GATA87G01	CAGTGGACACTAAACACAATCC	GATA87G01	TAGATTATCTAAATGGTGGATTTCC
D10S2327	GGAT1A4	CCCAGAGCAAGTACTCACCT	GGAT1A4	ATAGTTTTGTGCTTATTGACATGA
D10S1419	GATA115E01	CCTCCTAGCTCCTCAAGCTT	GATA115E01	CAGGACAGATTTCCTGTGGT
D10S571	AFM269xg9a	CAGTCCTTGCTTTGTCAGAA	AFM269xg9m	ATGTACACTGTGTCTGTAATCCCT
D10S1709	AFMb050zc5a	GTGAGTCCAGAATCACCCC	AFMb050zc5m	CAGTGGAATGGCTCATTTG
D10S603	AFM350wa5a	GCTGGATTATCCTCGGTAAC	AFM350wa5m	GTTCATCTCCCAAGGCAA
D10S1239	GATA64A09	CCCTAGCTAATGTTAAAATATCACG	GATA64A09	CAGAGTGAGACCCTGTTTCA
D10S1237	GATA48G07	CTTGTCCTGCCTTTGGACTA	GATA48G07	CTCTGTCCTAGTCAGGTTCTCC
D10S1230	ATA29C03	GACTCTGCTAAGCACATTTCC	ATA29C03	GCACAGAAACAGGAAGTATGC
D10S1223	ATA24A05	CCTGGCCAGCTACTTTGTTA	ATA24A05	GCAGCACACCATTCATGG
D10S212	AFM198zb4a	GAAGTAAAGCAAGTTCTATCCACG	AFM198zb4m	TCTGTGTACGTTGAAAATCCC
D10S169	Mfd187CA	GATCTGTGACTGCCTTCCT	Mfd187GT	AAGAGGAGGAGTCCATTCAG

(F = Vorwärtsprimer, R = Rückwärtsprimer)

9.1.5 Chromosom 17

Tabelle 9-5: Primer Chromosom 17

Marker	Primer (F)	Sequenz (F)	Primer (R)	Sequenz (R)
D17S1308	GTAT1A05	TGTGAAACTTTGTCATCACTATACC	GTAT1A05	TTGGTGACAAAGAAAGTCTCC
D17S1298	GAAT2C03	TTCACACTTTTAGTGTTGGTGG	GAAT2C03	TGACCTGAGTTTGACTGGGT
D17S1844	AFMb304xd5a	CATTCCAGCCTGGGTGA	AFMb304xd5m	GGAACCATAGGAGGCGTTTT
D17S945	AFM282yd1a	AACCAATCTGGACTCCCC	AFM282yd1m	CCTGAAGCCTGACCCC
D17S969	GATA10H07	ATCTAATCTGTCATTCATCTATCCA	GATA10H07	AACTGCAGTGCTGCATCATA
D17S921	AFM191xh12a	CTTGGACTCCTACAAATCCTGGCA	AFM191xh12m	GGCCACCATAATCATGTCAGACAAT
D17S122	IMG3342	CAGAACCACAAAATGTCTTGCATTC	IMG3343	GGCCAGACAGACCAGGCTCTGC
D17S1294	GGAA9D03	TGGCATGCAATTGTAGTCTC	GGAA9D03	TTCTTTCCTTACTAAGTTGAGAACG
D17S1293	GGAA7D11	TGGAGGCTAGGAGTTTTCCT	GGAA7D11	GGAGGCAGTGAGTTGTGATT
D17S1299	GATA25A04	TAGCACTTGAGCACACATGG	GATA25A04	GTGCATTATGGGGACCATTA
D17S809	AFM248tb9a	CAAAAAGGCAGAATGCAGTA	AFM248tb9m	TCCAGAGTCAAAAACACAGG
D17S1290	GATA49C09	GCCAACAGAGCAAGACTGTC	GATA49C09	GGAAACAGTTAAATGGCCAA
D17S2059	GATA31B11	TGTAATGCTTGTGCAGATGG	GATA31B11	TGCAGTGATTTTCACATTGC
D17S1301	GATA28D11	AAAGAAGATGAAATTGCCATG	GATA28D11	TAAAAAGAATGAAGGTAAAAATGTG
D17S663	nm00099.A	GGCAACAAGAGCAAAATTCCG	nm00099.B	TCATTCGTGGCCATTATTTTAACCTC
D17S784	AFM044xg3a	GAGTCTCCTAAATGCTGGGG	AFM044xg3m	AGCTCCTGCACAGTTCTTAAATA
D17S928	AFM217yd10a	TAAAACGGCTACAACACATACA	AFM217yd10m	ATTTCCCCACTGGCTG

(F = Vorwärtsprimer, R = Rückwärtsprimer)

9.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer

9.2.1 Universität zu Köln

Taraz
Hoffmann

9.2.2 Justus-Liebig-Universität Gießen

Schneider

9.2.3 Philipps-Universität Marburg

A-C

Alfke
Arnold
Aumüller
Barth
Basler
Baum
Becker
Cetin
Christiansen
Czubayko

D-H

Daut
Gotzen
Griss
Grzeschik
Gudermann
Hasilik
Hofmann

J-K

Jungclas
Kann
Kill
Klenk
Klose
Koch
Koolmann
Kroll
Kunz

L-J

Löffler
Lohoff
Lorenz
Max
Moll
Moosdorf
Mueller

N-R

Neubauer
Oertel
Radzak
Renz
Rieder
Röhm
Röper
Rothmund

S-W

Schäfer
Seitz
Seyberth
Steininger
Voigt
Wagner
Weihe
Werner
Westphal

9.3 Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name	Jörg Schott
Geburtsdatum	09.10.1978
Geburtsort	Mannheim

Schule

1985 – 1988	Grundschule in Freinsheim
1988 – 1998	Werner-Heisenberg-Gymnasium in Bad Dürkheim Abschluss Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

1998 – 1999	Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz in Bad Dürkheim Ausbildung zum Rettungssanitäter an der Lehranstalt für Rettungsdienst in Mainz

Berufsausbildung

1999 – 2000	Berufsausbildung zum staatlich geprüften Rettungsassistenten an der Franz-Anton-Mai-Schule in Mannheim
2000 – 2001	Einjährige Anstellung als Rettungsassistent beim Deutschen Roten Kreuz in Bad Dürkheim

Studium

2001	Ein Semester Studium der Mineralogie an der Universität zu Köln mit Anrechnung dieses Semesters auf das Studium der Humanmedizin gemäß §12 der Approbationsordnung für Ärzte
2001 - 2008	Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg
2004 - 2006	Promotionsarbeit am Zentrum für Humangenetik des Klinikums der Philipps-Universität Marburg Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. Manuela C. Koch
2006	Erstes Tertial des Praktischen Jahres des Medizinstudiums im Klinikum Schwalmstadt, Abteilung Chirurgie
2008	Staatsexamen im Fach Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg

Auslandsaufenthalte

2006	Zweites Tertial des Praktischen Jahres des Medizinstudiums im Kantonspital Zweisimmen, Schweiz, Abteilung Anästhesie
2007	Drittes Tertial des Praktischen Jahres des Medizinstudiums im Spital Uster, Schweiz, Abteilung Innere Medizin

Sonstiges

Fremdsprachen	Grundkenntnisse in Englisch und Französisch

9.4 Danksagung

Die AG Koch dankt Frau Prof. Baum für die Vermittlung der Familie dieser Arbeit und der Familie für die bereitwillige Teilnahme an dieser Studie.

Herrn Prof. Grzeschik möchte ich dafür danken, dass ich meine Promotionsarbeit am Zentrum für Humangenetik in Marburg durchführen konnte. Frau Prof. Koch danke ich herzlich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die sehr gute Betreuung sowie die stets zügigen Korrekturen meiner Manuskripte.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Sajid Malik für die Einarbeitung in die Methodik, die überaus freundliche Hilfe bei der Datengewinnung und -auswertung und vor allem für seine grenzenlose Geduld und aufopferungsvolle Mühe, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Frau Gerti Panzner möchte ich die mentale Unterstützung während meiner Laborarbeit danken. Herrn Benjamin Frick danke ich für das Korrekturlesen sowie die Hilfe bei der Formatierung dieser Arbeit, Frau Anna Junge für die hilfreichen Diskussionen und Herrn Jan Thomas für die abschließende Durchsicht der Arbeit.

Ein besonders herzlicher Dank gebührt meiner Mutter Brigitte Schott für ihre Liebe und die grenzenlose Unterstützung auf allen meinen Wegen, auch wenn es nicht immer leicht war. Meinem lieben Bruder Steffen danke ich für den Anreiz, diese Arbeit zu schreiben.

Abschließend möchte ich der Musik und dem Leben danken und allen Menschen und Freunden, die mein Leben in den letzten 29 Jahren bereichert und lebenswert gemacht haben.

anyway the wind blows…

9.5 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

„Kandidatengenanalyse in einer Familie mit Kamptodaktylie“

selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Inhalte der vorliegenden Arbeit wurden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Malik S, Schott J, Schiller J, Junge A, Baum E, Koch MC (2008) Fifth finger camptodactyly maps to chromosome 3q11.2-q13.12 in a large German kindred. Eur J Hum Genet 16: 265-269

Marburg 2008

_____

Jörg Schott