

**Aus dem
Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für allgemeine Kinderheilkunde
Direktor: Univ. Prof. Dr. Harms**

**Molekulargenetische Kartierung
des Cystinose-Gens**

**Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster**

**vorgelegt von
Rähmann, Michael
aus Ibbenbüren
2006**

**Gedruckt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster**

Dekan:

Erster Berichterstatter:

Zweiter Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Univ. Prof. Dr. H. Jürgens

Univ. Prof. Dr. E. Harms

Univ. Prof. Dr. T. Deufel

11. Oktober 2006

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für allgemeine Kinderheilkunde

- Direktor: Univ. Prof. Dr. med. Harms -

Referent: Univ. Prof. Dr. med. Harms

Koreferent: Univ. Prof. Dr. med. Deufel

Zusammenfassung

Molekulargenetische Kartierung des Cystinose - Gens

Rählmann, Michael

In der vorliegenden Arbeit sollte das krankheitsverursachende Gen der Cystinose durch Kopplungsanalyse in 22 betroffenen Stammbäumen kartiert werden. Es ergaben sich insgesamt 60 Nachkommen, von denen 28 an Cystinose erkrankt waren. Als genetische Marker dienten Mikrosatelliten - Sequenzen, deren Lage zueinander im Genom bekannt waren. Mit Hilfe der Marker wurde die Segregation der Haplotypen verfolgt. Mittels mathematischer Programme wurde anschließend die Wahrscheinlichkeit berechnet, mit der das gesuchte Gen und einer der Marker gekoppelt sind, bzw. mit der das gesuchte Gen auf diesem Chromosomenabschnitt liegt. Folgende Ergebnisse wurden im Einzelnen erzielt:

1. Eine Kopplung des gesuchten Gens konnte für 60% des Genoms mathematisch ausgeschlossen werden. Die errechneten „Lod - Scores“ ergaben Zahlenwerte unter - 2. Ein sicherer Ausschluss kann damit für diese Areale angenommen werden.
2. Es konnte eine Kopplung des Gens mit der Region 17p13 mathematisch bewiesen werden. Die Berechnung mit der „Zwei - Punkt - Methode“ ergab einen maximalen Wert von 4,41 für die Kopplung mit dem Locus D17 S1584 (zugehöriger Mikrosatelliten - Marker AFMa 061za9). Der mathematisch wahrscheinlich erscheinende Bereich erstreckte sich über ein 7 centiMorgan großes Areal.
3. Durch günstig liegende Rekombinationsereignisse konnte die mathematisch errechnete Region auf ein Areal von 2,6 centiMorgan eingegrenzt werden. Das Areal wird telomer vom Locus D17S1583 und centromer vom Locus D17 S1828 flankiert.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	4
1.1.	Die infantile Form der Cystinose	4
1.1.1.	Klinische Charakterisierung	4
1.1.2.	Diagnostik	7
1.1.3.	Pathobiochemie	8
1.1.4.	Behandlung der Patienten	9
1.1.5.	Epidemiologie und Genetik	9
1.2.	Genkartierung durch genetische Kopplungsanalyse	11
1.2.1.	Genkopplung	11
1.2.2.	Mikrosatelliten als genetische Marker	11
1.2.3.	Kopplungsanalyse	13
1.2.3.1.	Zweipunktanalyse	13
1.4.	Ziele der Arbeit	13
2.	Material und Methoden	15
2.1.	Patientenstammbäume	15
2.2.	Reagenzien und Geräte	17
2.2.1.	Reagenzien	17
2.2.2.	Geräte	18
2.3.	DNA - Isolierung	18
2.3.1.	Isolierung genomischer DNA aus EDTA - Vollblut	18
2.3.2.	Reinheitsbestimmung der Nukleinsäuren	19
2.3.3.	Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren	20
2.4.	Die Polymerase - Ketten - Reaktion	20
2.4.1.	Geneton Mikrosatelliten	21
2.4.2.	Standard PCR - Bedingungen	21
2.5.	Elektrophoretetechniken	22
2.5.1.	Agarosegele	22
2.5.2.	Polyacrylamidgele	23
2.5.3.	Die Direkt - Blotting - Elektrophorese	25
2.6.	Nachweis der geblotteten DNA	25
2.6.1.	Primermarkierung mit DIG - Oligo 3' Endlabeling - Kit	25
2.6.2.	Hybridisierung	26
2.6.3.	5' - DIG - Markierung der Primer durch Veresterung	27
2.6.4.	Autoradiographie	28

2.7.	Auswertung und genetische Kopplungsanalyse	28
2.7.1.	Cyrillic	28
2.7.2.	M - Link	29
3.	Ergebnisse	30
3.1.	Zusammenstellung der Lod - Scores der einzelnen Chromosomen	31
3.1.1.	Sichere Ausschlüsse	31
3.1.2.	Kandidatenregionen	34
3.1.2.1.	Kandidatenregion auf Chromosom 5	35
3.1.2.2.	Kandidatenregion auf Chromosom 11	36
3.2.	Bestätigung der Kandidatenregion 17p13	37
3.3.	Einengung der kritischen Region durch Rekombinationsereignisse	39
4.	Diskussion	44
4.1.	Methodische Aspekte	44
4.2.	Kandidatenregion auf Chromosom 5 und 11	46
4.3.	Charakterisierung der Kandidatenregion auf Chromosom 17p13	47
4.4.	Die Arbeit im wissenschaftlichen Kontext	51
5.	Zusammenfassung	56
6.	Literaturliste	58
7.	Anhang	I

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
apua dest.	destilliertes Wasser
bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
cM	centiMorgan
CTNS	Gen des Cytinosin
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxiribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiaminessigsäure
g	Gramm
h	Stunde
Lod - Score	logarithm of the odds
M	Mol
mg	Milligramm
ml	Milliliter
min	Minuten
mM	Millimol
nm	Nanometer
PCR	Polymerase chain reaction
RFLP	Restriktionsfagmentlängenpolymorphismus
PMNL	polymorphonuclear leukocytes
rpm	round per minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNPS	Single nucleotide polymorphism
SSC	Natriumcitratdihydrat
TBE	Tris - Borat - EDTA
TE	Tris - EDTA
TEMED	N',N',N',N'- tetraethylen - methlendiamid
Tris	Tris (hydroxymethyl-) aminoethan
U	Unit
V	Volt
Vol	Volumenprozent
W	Watt
µl	Microliter

1. Einleitung

Die Cystinose ist eine autosomal rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung. Sie führt zur lysosomalen Speicherung von kristallinem Cystin. Dieses Phänomen ist in verschiedenen Zelltypen unterschiedlich stark ausgeprägt. Es führt zu einer zeitlich festgeschriebenen Reihenfolge einer Beeinträchtigung verschiedener Organfunktionen.

Es werden zwei Formen der Cystinose unterschieden. Die infantile nephropathische Form und die adulte benigne Form. Die führende Symptomatik der infantilen Form wird durch renale Funktionsstörungen verursacht, die als renales Debré-de Toni- Fanconi-Syndrom bezeichnet werden. Wachstumsvermindierungen, Sehverschlechterungen sowie neurologische und endokrinologische Funktionseinbußen runden das Bild ab. Die adulte Form der Cystinose kann auf Grund kornealer Veränderungen zwar diagnostiziert werden, ist aber nicht mit manifesten Funktionseinbußen der verschiedenen Gewebe verbunden.

1.1. Die infantile Form der Cystinose

In der vorliegenden Arbeit sollte die molekulargenetische Charakterisierung des verantwortlichen Erkrankungsgens der Cystinose durchgeführt werden. Der dabei verwendete experimentelle Ansatz beruht auf einer genetischen Kartierung der Erkrankten mit dem Ziel, an einem so gefundenen Locus ein Erkrankungsgen zu identifizieren! Dabei wurde die Untersuchung auf Familien mit dem einheitlichen Phänotyp der infantilen nephropathischen Cystinose beschränkt. Damit sollten mögliche Probleme bei der Kopplungsanalyse durch genetische Heterogenität vermieden werden.

1.1.1. Klinische Charakterisierung

Die Patienten sind zum Zeitpunkt der Geburt unauffällig, allenfalls das Geburts-

gewicht ist etwas geringer und die Kinder erscheinen weniger stark pigmentiert (Schnapper et al. 1992). Sie entwickeln sich zunächst normal (Broyer et al. 1981).

In der zweiten Hälfte des ersten Lebensjahres stagniert das Wachstum und erste Symptome renaler Funktionsstörungen, die als Debré-de Toni-Fanconi-Syndrom zusammengefasst werden, treten auf. Es kommt zur Polydipsie, Polyurie und häufigen Symptomen einer Dehydratation (Gahl et al. 1988a). Der Verlust vieler niedermolekularer Substanzen über die Niere führt zu Störungen im Aminosäure-, Calciumphosphat- und Säure-Base-Haushalt der Kinder. Sie gedeihen schlecht und neigen zu metabolischen Azidosen. Fortschreitende Destruktionsprozesse der Niere führen durchschnittlich im Alter von neun Jahren zu einer terminalen Niereninsuffizienz (Gretz et al. 1983). Das Längenwachstum und die Gewichtsentwicklung der Patienten stagnieren. Es kommt zum Krankheitsbild der hypophosphatämischen Rachitis und die Kinder fallen schon im ersten Jahrzehnt unter die 3. Perzentile (Gahl, Kaiser-Kupfer 1987). Im weiteren Verlauf stellt sich das Bild eines Zwergwuchses ein. Die Gewichts- und Längenproportionen bleiben mit Ausnahme des Kopfumfanges erhalten, es kommt zu einer relativen Makrozephalie (Gahl 1986).

Schon im Kleinkindalter zeigen sich erste Veränderungen am Auge, die durch eine auffallende Lichtscheu der Patienten ihren Ausdruck finden (Gahl, Kaiser-Kupfer 1987). Es lassen sich Cystinkristalle in der Kornea nachweisen. Die Verteilungsdichte der Kristalle nimmt stetig zu, wobei im Zentrum nur die vordere Schicht betroffen ist. Am Rand lagern alle Kornealschichten Cystinkristalle ein (Gahl et al. 1988a). Diese randbetonte Häufung der Kristalle verleiht der Kornea ein für diese Krankheit charakteristisches Muster. Auch Konjunktiva, Retina und Linse zeigen Veränderungen, die mit Funktionseinbußen einhergehen. Im zweiten und dritten Lebensjahrzehnt werden Visusverschlechterungen, Skotome und Blindheit beobachtet (Gahl et al. 1988a).

Seitdem die Patienten durch therapeutische Fortschritte älter werden, konnten auch Veränderungen an Organen wie der Schilddrüse, dem Pankreas, dem Darm, der Leber und den Gonaden beobachtet werden. Manche Patienten erhalten schon im Kindesalter eine Schilddrüsenhormonsubstitution (Kimonis et al. 1995). Es

werden Fälle beschrieben, in denen sich ein Diabetes mellitus entwickelt (Broyer, Tete, Gubler 1987). Der Nachweis von Cystinkristallen im Gewebe der Bauchspeicheldrüse sowie das Vorkommen einer exokrinen Pankreasinsuffizienz sprechen für einen weiteren Manifestationsort der Erkrankung (Fivush et al. 1987). Im Alter von 14 bis 26 Jahren weisen 42 Prozent der Cystinosepatienten eine Hepatomegalie auf. Einige Patienten bieten Zeichen einer portalen Hypertension (Broyer, Tete, Gubler 1987). Einlagerungen kristallinen Materials lassen sich in der Darmmucosa nachweisen. Ob diese Veränderungen allerdings einen Effekt auf die Funktion der Darmmucosa haben und damit möglicherweise in direktem Zusammenhang mit gastroenterologischen Symptomen stehen, ist bisher rein spekulativ (Iancu, Lerner, Shiloh, 1987). Bei beiden Geschlechtern werden die Gonaden betroffen. Besonders männliche Patienten bieten postpubertal das Bild eines hypertrophen Hypogonadismus. Weibliche Patienten leiden unter einer verspäteten Menarche, anfänglichen Regelwidrigkeiten, hormonellen Störungen und einer Dysmenorrhö (Theodoropoulos et al. 1993), sind aber durchaus fortpflanzungsfähig (Andrews, Sacks, van't Hoff 1994).

Auch wenn die Symptome nicht bei allen Patienten auftreten, lassen morphologisch - pathologische Veränderungen im Gehirn (Broyer et al. 1996), eine häufig vorkommende Atrophie, ein im Durchschnitt geringerer IQ (Williams, Schneider, Trauer 1994) und die zu messende intrazelluläre Cystinanreicherung der Nervenzellen (Jonas et al. 1987) einen weiteren Manifestationsort der Erkrankung vermuten. Ein weiteres Symptom ist eine generalisierte Muskelschwäche, die in erster Linie die kleinen Handmuskeln befällt (Charnas et al. 1994). Eine Beeinträchtigung der Lungenfunktion scheint direkt auf die Myopathie zurückzuführen zu sein. Ob die Myopathie ursächlich im Zusammenhang mit der intrazellulären Einlagerung von Cystin ins Muskelstützgewebe steht oder auf hohe renale Carnitinverluste zurückzuführen ist, muss noch erforscht werden (Bernardini et al. 1985).

Berücksichtigt man die steigende Lebenserwartung der Patienten auf Grund moderner Behandlungsmöglichkeiten, so werden sicherlich noch weitere Manifestationen und Symptome der Krankheit beobachtet werden können. Schon jetzt ist zu vermuten, dass diese lysosomale Speicherkrankheit sowohl Gewebe

ektodermalen, mesodermalen und entodermalen Ursprungs betrifft und es nur eine Frage der Zeit ist, bis der intrazelluläre Cystinanstieg die Funktion aller Zellen schädigt, so dass es nach und nach zu Funktionseinbußen aller Körperorgane kommt.

1.1.2. Diagnostik

Es stehen verschiedene Methoden zur pränatalen und postnatalen Diagnose der Cystinose zur Verfügung. In Deutschland existiert keine Screeninguntersuchung für Neugeborene, da die Inzidenz der Krankheit mit 1-2 auf 100 000 (Manz, Gretz 1985) gering und die labormedizinische Diagnostik aufwendig und teuer ist. Häufig wird die Diagnose erst im Alter von einem bis zwei Jahren gestellt, wenn die Kinder durch erste Symptome des Debré-de Toni-Fanconi-Syndroms oder Wachstumsstörungen auffallen. Der Zeitpunkt der Diagnosestellung ist damit eigentlich zu spät, da schon erste Organveränderungen eingetreten sind.

Zur **pränatalen** Diagnostik wird das zu untersuchende Zellmaterial klassischerweise durch eine Amniozentese in der 14. bis 16. Woche gewonnen. Die Amnionzellen betroffener Feten speichern bis 100 mal mehr Cystin als Zellen gesunder Feten (Boman, Schneider 1981). Die Chorionzottenbiopsie ist zur Materialgewinnung ebenfalls geeignet. Zur anschließenden Diagnosestellung wird auch hier der Cystingehalt der Zellen bestimmt (Smith et al. 1987).

Postnatal bedient man sich häufig der Leukocytcystingehaltsbestimmung. Die weißen Blutkörperchen der homozygot Betroffenen enthalten durchschnittlich 6 $\mu\text{mol}/\text{mg}^{1/2}$ Cystin, das ist das 80-fache einer nicht betroffenen Person (Schneider, Bradley, Seegmiller 1967). Die Cystinmessung kann über eine Gaschromatographie (Schierbeck et al. 1990), über ein Aminosäureanalysegerät, mit Hilfe der Puls-Labeling-Methode (Schulmann et al. 1970) oder über die proteingebundene Untersuchungsmethode (Oshima et al. 1974) erfolgen. Weitere Möglichkeiten bieten sich in der Cystingehaltsbestimmung cystinhaltigem Medium ausgesetzter Fibroblasten (Kroll, Becker, Schneider 1974), dem histologischen Nachweis von hexagonalen Cystinkristallen in der Konjunktiva (Wong,

Schulmann, Seegmiller 1970), dem Knochenmark (Schneider, Wong, Seegmiller 1969) oder in einer Biopsie der Darmmukosa (Iancu, Lerner, Shiloh, 1987). Auch eine Infrarotmessung von Patientenhaaren eignet sich zur Diagnostik der Erkrankung (Lubec, Nauer, Pollak 1983).

Ab einem Alter von einem Jahr ist es in der Regel möglich, die Diagnose von einem erfahrenen Augenarzt mittels Spaltlampenmikroskopie stellen zu lassen. An der Spaltlampe erscheint die feine Tüpfelung der Kornea so deutlich und in ihrer Verteilung in einem so charakteristischen Muster, dass sie zur alleinigen Diagnosestellung ausreicht (Kaiser - Kupfer et al. 1986)

1.1.3. Pathobiochemie

Bei Cystinosepatienten werden große Mengen Cystin in den Lysosomen gespeichert (Seegmiller et al. 1968). Der Ursprung des lysosomalen Cystins besteht aus freiem extrazellulärem Cystin oder aus dem zellulären Proteinabbau (Harms, E. et al. 1981, Thone, Lemons 1982). Die Neusynthese der Aminosäure Cystein scheint auf einem anderem Stoffwechselweg abzulaufen und kommt nach heutigem Erkenntnisstand nicht als Quelle des lysosomalen Cystins in Frage (Thone et al. 1977).

1969 wurde von JA Lucy zum ersten Mal die Idee eines defekten lysosomalen Transportsystems für die Aminosäure Cystin als Erklärungsmodell vorgeschlagen. Diese Theorie wurde nach und nach gemeinhin akzeptiert. Durch verschiedene Versuchsaufbauten konnten Eigenschaften dieses Carriers beschrieben werden. Man fand heraus, dass eine stereospezifische Affinität für L-Cystin besteht und dass dieses Transportmolekül nicht mit dem Plasmamembrantransportmolekül identisch sein kann (Gahl et al. 1983). Ob es sich jedoch um einen primären Defekt des Carriers handelt oder ob dieser nur sekundär beeinträchtigt wird, war unklar. Auch haben alle biochemischen und zellbiologischen Untersuchungen der Vergangenheit diesen Carrier nicht weiter charakterisieren bzw. isolieren können. Seit etwa zehn Jahren waren keine neuen Erkenntnisse hinzugekommen.

1.1.4. Behandlung der Patienten

Neben symptomatischen Maßnahmen wurde schon früh versucht, eine ursächliche Behandlungsmethode zu finden. Erste Versuche mit einer diätetischen Behandlung der Patienten konnten keine Erfolge verzeichnen (Feist, Lutz, Schmidt 1971). Nachdem 1976 (Thone et al.) gezeigt werden konnte, dass unter der Behandlung mit Cysteamin der Cystingehalt von cystinotischen Fibroblasten signifikant gesenkt wird und diese Erfolge auch *in vivo* erreicht werden können, wurde Ende der siebziger Jahre Cysteamin als wichtiges Agens in die Behandlung der Patienten aufgenommen (Gahl et al. 1987). Da immer noch korneale Ulzerationen unter der alleinigen oralen Therapie auftraten (Kaiser-Kupfer, Datiles, Gahl 1987) und bewiesen werden konnte, dass cysteaminhaltige Augentropfen den Verlauf lindern, haben auch diese Mitte der achtziger Jahre einen festen Platz in der Therapie erhalten (Kaiser-Kupfer et al. 1987). Insgesamt muss zum jetzigen Zeitpunkt davon ausgegangen werden, dass Cysteamin das Fortschreiten der Zelledestruktion zwar deutlich verlangsamt aber nicht in der Lage ist, die Erkrankung zu heilen.

Neben der oben beschriebenen Verlangsamung des intrazellulären Cystinanstiegs durch eine Therapie mit Cysteamin erfolgen symptomatische Behandlungen wie: die des Flüssigkeit- und Elektrolytersatzes bei manifestem Debré-de Toni-Fanconi-Syndrom (Gahl 1986), die der Reduktion einer Polyurie durch Indomethacin (Haycock et al. 1982), die der Behandlung renaler Carnitin- und Vitamin D -Verluste mit L-Carnitin (Gahl et al. 1988b) und Vitamin D (Steinherz et al. 1983), die der Dialyse oder Nierentransplantation bei Niereninsuffizienz (Broyer et al. 1981), die der Wachstumshormongabe zur Förderung des Längenwachstums (Andersson et al. 1992), die der Schilddrüsenhormonsubstitution bei manifester Hypothyreose (Kimonis et al. 1995) oder die der Insulininjektion bei manifestem Diabetes (Fivush et al. 1987).

1.1.5. Epidemiologie und Genetik

Als Erster beschrieb Emil Abderhalden 1903 einen 21 Monate alten männlichen

Patienten, der „an Entkräftung verstarb“ (zitiert nach Gahl, Thone, Schneider 2002). *Post mortem* zeigten histologische Untersuchungen punktuelle Läsionen in seinen Organen. Chemische Untersuchungen ergaben, dass es sich bei dem gespeicherten Material um die Aminosäure Cystin handelte. Im historischen Verlauf wurden viele weitere Krankheitsfälle veröffentlicht. Alle Berichte stimmen in einem autosomal rezessiven Erbgang dieser Stoffwechselerkrankung überein. Zu Beginn der hier vorgestellten Arbeit war bis auf den autosomal rezessiven Erbgang keine weitere Lokalisation des Cystinoselocus im Genom möglich.

Zur Inzidenz der Erkrankung gibt es unterschiedliche Angaben. Sie wird mit einem Maximum von 1 zu 26.000 in der französischen Bretagne (Bois et al. 1976), 1 zu 179.000 in Deutschland (Manz, Gretz 1985) bis hin zu 1 zu 346.000 für das restliche Frankreich (Bois et al. 1976) angegeben. Es häufen sich Untersuchungen, die die Inzidenz mit 1 - 2 / 100 000 angeben (Hutchesson et al. 1998; Tsilou et al. 2003). Dies entspricht anderen Stoffwechselerkrankungen und ergibt eine Heterozygotenfrequenz von 1/200 in den großen Bevölkerungsgruppen westlicher Industrienationen. Die Dunkelziffer der Erkrankung liegt außerhalb der westlichen Industrienationen wahrscheinlich höher als die publizierten Zahlen verraten, da zu vermuten ist, dass Cystinose-Patienten undiagnostiziert versterben. Beispielsweise werden nur vereinzelt Fälle in Entwicklungsländern wie Südafrika (Sochett et al. 1984), Brasilien (Galhardo et al. 1983) oder Indien (Gera, Metha, Shah 1985) beschrieben.

Frühe Studien ließen vermuten, dass männliche Patienten häufiger betroffen sind als weibliche, seitdem jedoch immer mehr Patienten diagnostiziert werden, relativiert sich dieses Verhältnis und man geht davon aus, dass beide Geschlechter gleich stark betroffen sind (Bois et al. 1976; Manz, Gretz 1985).

Wie bei anderen rezessiv vererbten Stoffwechselerkrankungen fallen Heterozygote klinisch nicht weiter auf. Es ist allerdings möglich, insbesondere durch sorgfältige Standardisierung der zellulären Cystinbestimmung, heterozygote Träger mit hinreichender Sicherheit zu identifizieren. (Smolin, Clark, Schneider 1987). Dies kann von besonderer Bedeutung sein, wenn Kopplungsanalysen mit relativ kleinen Stammbäumen für einen genomweiten Scan eingesetzt werden, wie es in der vorliegenden Arbeit der Fall ist. Die Differenzierung zwischen klinisch

nicht betroffenen Heterozygoten und homozygot Gesunden kann die Informativität der verfügbaren Stammbäume und damit die Power der genetischen Analyse erhöhen. Auch die Einschränkung eines kritischen Areals durch informative Meiosen kann auf Grund der Differenzierung zwischen homozygot Gesunden und nicht betroffenen heterozygoten Trägern enger gefasst werden, wie die vorliegende Arbeit zeigen wird.

1.2. Genkartierung durch genetische Kopplungsanalyse

1.2.1. Genkopplung

Die Informationen des menschlichen Bauplans werden auf den Chromosomen vererbt. Als diploides Wesen besitzt der Mensch die autosomal gelegenen Informationen zweimal und verteilt diese auf die einzelnen Schwester-Chromatiden während der meiotischen Teilung nach den Gesetzen des Zufalls, d.h. unabhängig voneinander (Erstes Mendelsches Gesetz der unabhängigen Vererbung). Liegen zwei Informationen /Gene auf einem Chromosom, so werden diese, so lange sie nicht durch meiotische Rekombinationen voneinander getrennt werden, gemeinsam vererbt. Das Prinzip der Kopplung zweier Gene beruht darauf, dass zwei Gene um so seltener voneinander getrennt werden, desto näher sie auf einem Chromosom nebeneinander liegen (Mc Kusiak 1991).

1.2.2. Mikrosatelliten als genetische Marker

Bei der molekularbiologischen Untersuchung des Genoms nach dem Prinzip der reversen Genetik wird versucht, auf Grund der Kopplung eines defekten Gens mit bekannten Markern eine Lokalisation im Genom vorzunehmen. Frühe Versuche, die sich polymorpher Proteinmarker wie beispielsweise der Kopplung an HLA-Antigenen, den Blutgruppen und verschiedenen Enzym oder Strukturproteinen bedienten, bewiesen mit ihren Arbeiten, dass es möglich ist, auf diesem Weg Geneorte bzw. Gene im Genom zu lokalisieren. Auf Grund der geringen An-

zahl der zur Verfügung stehenden Marker musste allerdings schnell die Grenze dieser Methode erkannt werden. Proteine werden nur in einem kleinen Teil des Genoms kodiert und die Anzahl der verwendeten Marker musste so zwangsläufig gering ausfallen.

Mit der Entwicklung der RFLP's konnten zunehmend genauere genetische Karten erstellt werden. Die meist di- oder triallelischen RFLP Marker wiesen gegenüber den Proteinen zwar den Vorteil auf, dass sie über das Genom statistisch verteilt waren (Donis - Keller et al. 1987), brachten jedoch den Nachteil eines geringen Informationsgehaltes mit sich.

Als weitere Gruppe molekularbiologischer Marker boten die Minisatelliten den Vorteil der Allelvielfalt, waren aber nicht gleichmäßig über das Genom verteilt. Die Eignung für die reverse Genetik wurde damit wiederum eingeschränkt (Vergnaud et al. 1991). Kombinierte Karten konnten die Aussagefähigkeit der beschriebenen Marker erhöhen (NIH/CEPH Collaborative mapping Group 1992), auf Grund der komfortablen Darstellungsweise der Mikrosatelliten, der hohen Aussagekraft und der gleichmäßigen Verteilung im Genom haben sich diese jedoch durchgesetzt.

Als Mikrosatelliten bezeichnet man einen repetitiven Sequenzbereich aus einem einfachen Sequenzmotiv von 1-6 bp (Tautz 1993). Die Anzahl dieser „Repeats“ ist unterschiedlich, hochpolymorph und wird kodominant nach den Mendelschen Regeln vererbt (Weber 1990; Weber und Wong 1993). Häufig unterscheiden sich diese Bereiche nur um eine Repeateinheit. Wird die Mikrosatellitensequenz mittels PCR amplifiziert, erhält man als Produkt DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe, die verschiedenen Allele für diesen Mikrosatelliten.

Mit der Verfügbarkeit von Chip-Plattformen und damit der Möglichkeit, eine sehr große Anzahl von Polymorphismen gleichzeitig mit vertretbarem Aufwand zu untersuchen, haben sich in jüngster Zeit die sogenannten SNPS durchgesetzt. Es werden damit wieder diallelische Marker verwendet. Ihr Haupteinsatzgebiet ist allerdings weniger die Untersuchung einzelner Stammbäume mit monogenetischen Erkrankungen als die Durchführung von Assoziationsanalysen an großen Patientengruppen zur Aufklärung komplexer Erkrankungen.

1.2.3. Kopplungsanalyse

Die Kopplungsanalyse macht sich die Segregation von Allelen (zutreffend für „echte Gene“ und „anonyme Marker“) an zwei oder mehreren aufeinanderfolgenden Loci zu Nutze. Das Prinzip der Berechnung beruht darauf, dass zwei Gene um so seltener durch meiotische Rekombination voneinander getrennt werden, desto näher sie beieinander liegen. Bei der genetischen Kartierungsmethode wird die Segregation von Allelen an zwei oder mehr Loci in der Meiose verfolgt und errechnet, mit welcher Wahrscheinlichkeit die genetischen Merkmale miteinander gekoppelt sind. Die Aussagekraft der genetischen Kopplungsanalyse hängt stark von den in die Berechnung eingehenden informativen Meiosen ab, damit bestimmen Größe der untersuchten Stammbäume und Anzahl der eindeutig phänotypisierbaren Familienmitglieder ganz wesentlich die Power dieser Analysen (Botstein 1980). Bei autosomal dominanten Merkmalen werden sich eher große Mehrgenerationenstammbäume rekrutieren lassen, so daß unter Umständen die Untersuchung eines einzigen Stammbaumes eine Kartierung erlaubt. Bei autosomal rezessiven Erkrankungen hingegen werden in den Familien häufig nur die Kinder einer Generation erfasst, so dass für eine genomweite Kartierung in der Regel viele kleine Familien kummulativ betrachtet werden müssen. Dabei muss in Betracht gezogen werden, dass die Erkrankung genetisch heterogen sein kann und damit möglicherweise nur ein Teil der Stammbäume für die Kartierung relevant ist. Einen Sonderfall bilden grosse konsanguine Stammbäume aus genetischen Isolaten, in denen auch rezessive Erkrankungen in grosser Zahl auftreten und z. B. durch Zygotiekartierung lokalisiert werden können. Weitere Einflussgrößen, die die Aussagekraft der Berechnung betreffen, sind die Penetranz des Erkrankungsmerkmals sowie die Frequenz des untersuchten Allels (Ott, Rabinowitz 1997).

1.2.3.1. Zweipunktanalyse

Um die Wahrscheinlichkeit der Kopplung zweier Allele abschätzen zu können, bedient man sich eines indirekten statistischen Verfahrens. In der Naturwissenschaft bezeichnet die „likelihood“ die Wahrscheinlichkeit des Eintretens eines

Ereignisses und damit die Richtigkeit einer Hypothese gegenüber der gegenteiligen Annahme. Die likelihood ratio (R) drückt das Verhältnis der Wahrscheinlichkeit für die Hypothese „Kopplung“ zur Wahrscheinlichkeit der Nullhypothese „freie Rekombination“ aus. Üblicherweise gibt man als dekadischen Logarithmus der likelihood den „Lod-Score“ (logarithm of the odds) an. Als Nachweis der genetischen Kopplung wird ein Lod-Score von $\geq 3,0$ gefordert, d.h. die Hypothese „genetische Kopplung“ ist 1000 mal wahrscheinlicher als die Nullhypothese „zufällige Segregation“. Für einen signifikanten Ausschluss der Hypothese Kopplung und damit das Zutreffen der Alternativhypothese freie Rekombination ist ein Lod-Score von ≤ -2 festgelegt worden. Das bedeutet, die Wahrscheinlichkeit der freien Rekombination ist um den Faktor 100 größer als die Wahrscheinlichkeit der Kopplung. Die Rekombinationsfraktion (0) kann mittels der Haldane-Funktion in den genetischen Abstand der beiden Loci in centiMorgan (cM) umgerechnet werden (Lathrop, Lalouel 1984).

1.3. Ziele der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, den zum Zeitpunkt unserer Untersuchungen noch nicht bekannten Genort für die infantile nephropathische Cystinose zu identifizieren. Hierfür sollte an 22 klinisch und biochemisch gut charakterisierten Familien mit insgesamt 60 Kindern, von denen 28 an Cystinose erkrankt waren, eine genomweite Suche mit einem Set von Mikrosatelliten-Markern und anschließender genetischer Kopplungsanalyse durchgeführt werden.

Ein so identifizierter Locus sollte durch Einsatz weiterer, in dieser Region gelegener Marker soweit eingegrenzt werden, dass im verbleibenden Chromosomenabschnitt ein Erkrankungsgen identifiziert werden kann.

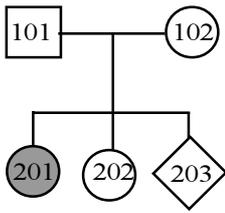
2. Material und Methoden

2.1. Patientenstammbäume

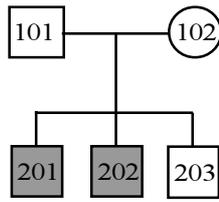
Zur genetischen Kopplungsanalyse wurden die unter Abbildung 1 aufgeführten 22 Familien verwendet. Es handelt sich um Zwei-Generationen-Familien, fünf dieser Familien hatten zwei betroffene Kinder, die restlichen hatten jeweils ein an Cystinose erkranktes Kind. Bei den aufgeführten Familien variierte die Zahl der gesunden Geschwister zwischen null und sechs. Insgesamt ergaben sich damit 60 Nachkommen unter denen sich 28 an Cystinose erkrankte Kinder befanden. Abgesehen von der Familie 96, die aus der Türkei stammt, kamen alle Familien aus der Schweiz oder Deutschland. Es gab bei keiner der aufgeführten Familien Erkenntnisse über Blutsverwandschaften der Eltern.

Die klinische Charakterisierung der an Cystinose erkrankten Personen wurde im Rahmen der routinemäßigen Untersuchung der Patienten vorgenommen. Die Bestätigung dieser Diagnose erfolgte anhand der Bestimmung des Cystingehaltes der PMNL (Smolin, Clark, Schneider 1987) aus heparinisiertem Vollblut durch ein Aminosäureanalysegerät, sowie über eine Kationenaustausch - Säulenchromatographie (Lee et al. 1974).

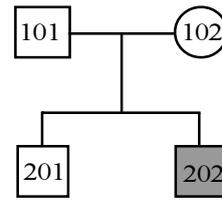
Die in der Klinik für allgemeine Kinderheilkunde der WWU- Münster verwendete Untersuchungsmethode wurden auch auf die Unterscheidung von heterozygoten Trägern und homozygot Gesunden hin validiert (E. Harms, T. Deufel, persönliche Mitteilung). Das Blut wurde den Familienangehörigen nach mündlicher und schriftlicher Aufklärung und Vorliegen der unterzeichneten Einverständniserklärung abgenommen. Alle im Rahmen der Studie erhobenen genetischen und klinischen Daten unterliegen der ärztlichen Schweigepflicht und wurden während der Untersuchungen pseudonymisiert behandelt.



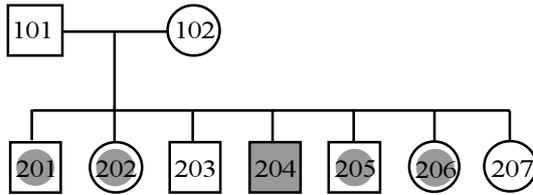
Familiennummer: MS 0065



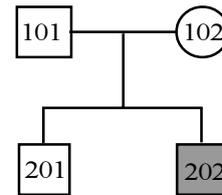
Familiennummer: MS 0076



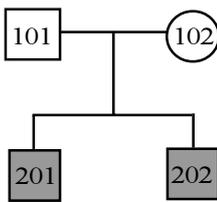
Familiennummer: MS 0082



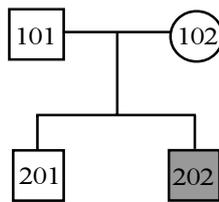
Familiennummer: MS 0096



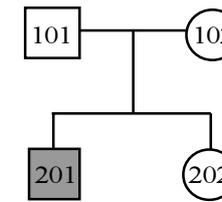
Familiennummer: MS 0109



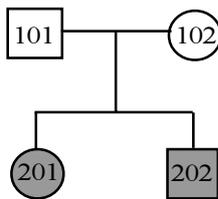
Familiennummer: MS 0114



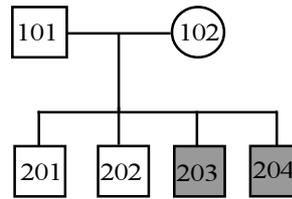
Familiennummer: MS 0126



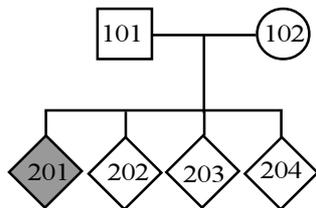
Familiennummer: MS 0131



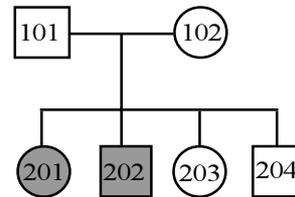
Familiennummer: MS 0133



Familiennummer: MS 0176



Familiennummer: MS 0199



Familiennummer: MS 0200

Abbildung 1a Familien MS 0065 bis MS 0200 - Erkrankte Personen sind dunkel hinterlegt, untersuchte heterozygote Träger sind zum Teil dunkel markiert.

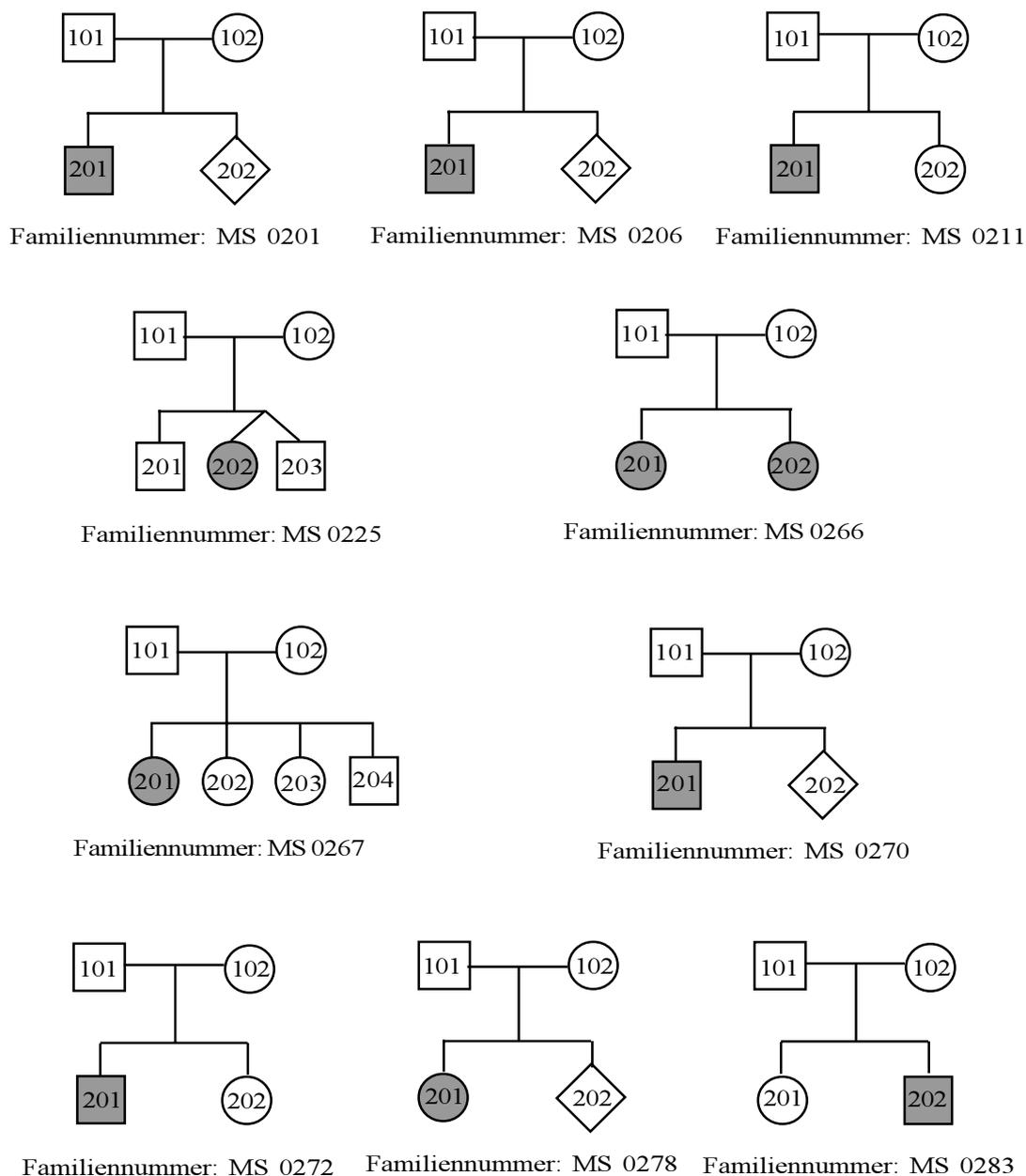


Abbildung 1b Familien MS 0201 bis MS 0283 - Erkrankte Personen sind dunkel hinterlegt.

2.2. Reagenzien und Geräte

2.2.1. Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien wurden im analytischen Reinheitsgrad bei den Firmen Braun AG (Melsungen, Deutschland), Biochrom KG (Berlin, Deutsch-

land), Boehringer GmbH (Mannheim, Deutschland), Fluka AG (Buchs, Schweiz), Gibco BRL (Gaithersburg, USA), Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Serva Feinbiochemica (Heidelberg, Deutschland), Sigma (St. Louis, USA) und United States Biochemicals Corporation (Cleveland, USA) bezogen.

2.2.2. Geräte

Autoklav	S 2000, Medizin Mechanik, München
Elektrophoreseapparatur	Gel-Elektrophoresis, Modell MPH, International Biotechnologies, New Haven, USA
Direct Blotting Elektrophoresis	GATC 1500, MWG Biotech, Konstanz
Filmentwickler	Kodak, RP X-OMat Processor
Hybridisierungsinubator	ATP line, Biometra, Göttingen
Rotor	Variospeed, Renner GmbH, Darmstadt
Thermo-Cycler	Omnigene, Hybaid Limited, MWG-Biotech, Ebersberg
UV-Crosslinker	XL-1000, Spectronics Corporation, New York
UV-Transilluminator	Vetter GmbH, Wiesloch
Vacuumkonzentrator	Bachofer, Reutlingen
Zentrifuge	Eppendorf 5417, Hamburg

2.3. DNA-Isolierung

2.3.1. Isolierung genomischer DNA aus EDTA-Vollblut

10 ml EDTA-Vollblut wurden mit kaltem Lysis-Puffer auf 50 ml aufgefüllt. Das

Gemisch wurde auf Eis 15 min lang geschwenkt und anschließend bei 4° C mit 1500 rpm 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit 30 ml Lysis-Puffer resuspendiert, um dann erneut abzentrifugiert zu werden (s.o.). Der Überstand wurde erneut verworfen und in angegebener Reihenfolge 250 µl SDS Puffer 20%, 25 µl Proteinase K (10 mg/ml) und 5 ml SE Puffer hinzu pipetiert. Die Lösung wurde bei 55°C über Nacht inkubiert. Durch Zugabe von 1,5 ml 5 M NaCl wurden die Proteine denaturiert. Die ausgefallenen Proteine wurden bei 3500 rpm 10 min abzentrifugiert. Der DNA-haltige Überstand wurde dekantiert und mit zwei Vol Ethanol vermischt. Unter leichtem Schwenken fiel die DNA aus. Der feine DNA Faden wurde mit einer Pipette in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml 70% kaltem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen der DNA wurde diese in 500µl TE - Puffer über Nacht auf dem Rotor gelöst. Reagenzien:

Lysis-Puffer :	NH ₄ Cl	155 mM
	KHCO ₃	10 mM
	Na ₂ EDTA	0,1 mM
		pH 7,4 einstellen
SE-Puffer :	NaCl	75 mM
	Na ₂ EDTA	25 mM
		pH 8,0 einstellen
SDS-Puffer (20%) :	Natriumdodecylsulfat	20 g ad 100 ml Aqua bidest
TE-Puffer :	Tris-HCL	10 mM
	Na ₂ EDTA	1 mM
		pH 7,5 einstellen

2.3.2. Reinheitsbestimmung der Nukleinsäuren

Nukleinsäuren haben ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, Proteine bei 280 nm. Aufgrund der verschiedenen Absorptionsmaxima lässt sich durch photometrische

Messung der optischen Dichte einer Nucleinsäure-Protein-Lösung eine Aussage über das Verhältnis der Bestandteile machen. Standardisiert ist der Quotient OD 260 / OD 280 ein Maß für die Reinheit der Nucleinsäuren und beträgt für doppelsträngige DNA 1,8 - 1,9 (Maniatis, Sambrook, Fritsch 1989).

2.3.3. Konzentrationsbestimmung der Nucleinsäuren

Die Extinktion bei 260 nm einer DNA-haltigen Lösung lässt eine Aussage über den Konzentrationsgehalt der Lösung zu. Der spezifische Extinktionskoeffizient E für DNA-Lösungen ist definitionsgemäß eins bei einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Für die Berechnung ergibt sich die allgemeine Formel:

$$c = OD_{260} \times E \times F$$

c	=	Konzentration
OD ₂₆₀	=	Optische Dicht bei 260 nm
E	=	Extinktionskoeffizient
F	=	Verdünnungsfaktor

Die Extinktion der Nucleinsäuren wurde in einer Verdünnung von 1 : 100 und einem Volumen von 1 ml in Quarzküvetten mit 1 cm Schichtdicke gemessen. Zur Bestimmung des Leerwertes diente TE-Puffer.

2.4. Die Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR (Polymerase chain reaction) ermöglicht die *in vitro* Vervielfältigung (Amplifikation) spezifischer DNA-Fragmente. Durch iterative Reaktionsfolgen werden die DNA-Stränge getrennt (Denaturierung), das zu untersuchende Stück durch Primer flankiert (Annealing) und mittels enzymatischer DNA-Synthese mit einer thermostabilen DNA-Polymerase vervielfältigt (Extension).

Die Abfolge der Reaktion wird durch die Vorgabe der entsprechenden Tempera-

turen geregelt. Die Komplementarität der Primer zu den Endbereichen der zu untersuchenden DNA-Region gewährleistet die Amplifikation des zwischen den beiden Primern liegenden spezifischen Stückes, so dass sich eine vorherige Selektion aus einem DNA-Gemisch erübrigt.

2.4.1. Genethon Mikrosatelliten - Markerset

Für die genomweite Suche wurde in der vorliegenden Arbeit ein Markerset aus dem erweiterten Genethon human genetic linkage map, das in „Nature“ 7/94 veröffentlicht ist, genutzt. Das zugrundeliegende Sequenzmotiv in der von Genethon erstellten Markersammlung lautet (CA) bzw. (AC) (Weissenbach et al. 1992; Gyapay et al. 1992).

Die Markersammlung von Genethon besteht aus einer Anzahl von Primerpaaren, durch die hochselektiv in einer PCR nur ein Mikrosatellitenbereich amplifiziert wird. Die Lage dieser Mikrosatelliten im Genom sind zueinander bekannt. Sie verteilen sich relativ gleichmäßig über das Genom und die Heterozygotenfrequenz liegt zu 60 % oberhalb von 0,7. Durch die unterschiedliche Anzahl der Repeateinheiten innerhalb dieser Region werden in der PCR Produkte verschiedener Größe amplifiziert. Primer, die nicht im Genethon human genetic linkage map enthalten sind, werden im Anhang unter I - II gesondert aufgeführt.

Da anfangs keine engere Eigrenzung, als die einer autosomal rezessiv vererbten Erkrankung, gemacht werden konnte, nutzten wir zur genomweiten Suche Marker aus dem Set, deren einzelne Loci willkürlich in Abständen von ca. 10 - 20 centi Morgan über die Chromosomen verteilt waren.

2.4.2. Standard PCR Bedingungen

Für alle PCR-Reaktionen wurden die AmpliTaq DNA Polymerase von Perkin Elmer Cetus und die mitgelieferten Reaktionspuffer verwendet. Die 2'-Desoxynucleosid -5-Triphosphatlösung wurde aus dem Ultrapure dNTP set

(Pharmacia) in einer Arbeitskonzentration von zwei mM je dNTP hergestellt. Zur Vermeidung von Konzentrationsänderungen durch Verdunstung wurden die Ansätze mit Mineralöl (Sigma) überschichtet.

Standard PCR-Ansatz:	DNA	100 ng
	Puffer I (10 x)	5 µl
	dNTP (8 mM)	5 µl
	Primer F (20 pMol/µl)	2,5 µl
	Primer R (20 pMol/µl)	2,5 µl
	Taq - Polymerase	1 U
		ad 50 µl H ₂ O

Standard PCR-Programm:

Denaturierung	92°C 5 min	
Denaturierung	94°C 1 min	35 Zyklen
Annealing	55°C 1 min	
Extension	72°C 1 min	35 Zyklen
Extension	72°C 5 min	

Zeigte die PCR bei den angegebenen Standardbedingungen nicht das gewünschte Ergebnis, wurde die Reaktion durch Variation einzelner Parameter, z. B. Mg²⁺ Konzentration, Annealing-Temperatur oder Zykluszahl optimiert.

2.5. Elektrophoresetechniken

2.5.1. Agarosegele

Die Matrix bestand aus einer Agaroselösung (2%, UltraPure, USB) in 1 x TAE Puffer. Nach dem Aufkochen der Mischung wurde diese in die dafür vorgesehenen Träger gegossen und nach dem Aushärten mit 1 x TAE bedeckt. Die DNA-Proben wurden mit $\frac{1}{5}$ Volumen Beladungspuffer vermengt und in die vorbereiteten Geltaschen pipetiert. Zur Orientierung über die zurückgelegte Laufstrecke

innerhalb des Gels enthielt der Beladungspuffer Bromphenolblau. Die angelegte Spannung variierte zwischen 80 und 160 V.

Zum Färben der Produkte wurde die hohe Affinität des Ethidiumbromids zur DNA genutzt. Die Agarosegele wurden in einer Lösung aus 1 x TAE und einigen Tropfen Ethidiumbromidstammlösung (5 mg/ml) gefärbt. Durch kurzes Tauchen in ein aqua dest. Bad wurden freie Ethidiumbromidmoleküle ausgewaschen, die zwischen den Basenpaaren interkalierten Moleküle blieben ortsständig. Unter UV-Transillumination wurden die ortsständigen Ethidiumbromidmoleküle sichtbar gemacht.

Reagenzien:

TAE Puffer (50x):	Tris-Base	242 g
	Eisessig	57,1 ml
	EDTA	14,7 g
	ad aqua dest. 1000 ml	
Beladungspuffer:	Bromphenolblau	0,25 %
	Ficoll	25,0 %
	in 1 x TAE	
Molekulargewichtsmarker:	100 bp Leiter (1 µg/µl)	20 µl
	Beladungspuffer	200 µl
	1 x TE - Puffer	980 µl
TE - Puffer:	siehe DNA-Isolierung.	

2.5.2. Polyacrylamidgele

Die Trennung der PCR-Produkte erfolgte über 4%ige Polyacrylamidgele in einer Vertikalapparatur (Direkt Blotter GATC 1500, Biotech). Zur Herstellung des Gel-Sandwichs wurden die Empfehlungen des Herstellers befolgt. Nach dem Säubern der Glasplatten mit Tensiden und Methanol wurden diese mit Silan vorbehandelt. Zum Erstellen der Gelmatrix wurden 6,7 ml Acrylamidlösung 30 %

und 43,3 ml 4% Urea-Diluent vermenget. 20 ml dieser Lösung wurden für ein Gel-Sandwich mit 90 µl Ammoniumpersulfat 10 % und 20 µl TEMED zur Polymerisation gebracht. Bis zur gebrauchsfertigen Aushärtung der Gele verging eine halbe bis eine Stunde.

Vor dem Beschicken der Kammern mit den vorbereiteten Proben wurden diese mit 1 x TBE als Laufpuffer bedeckt. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen denaturiert und im Verhältnis eins zu eins mit Ladepuffer gemischt. Als Größenstandard diente der 100 bp Standard von Pharmacia.

Reagenzien:

Acrylamidlösung 30%:	Acrylamid	29,4 g
	Bisacrylamid	0,6 g
	ad 100 ml H ₂ O, (steril filtrieren)	
Urea-Diluent 4 %:	Harnstoff	84 g
	10 x TBE	18,7 g
	aqua dest.	73,4 g
	auf heizbarem Rührer lösen	
Ladepuffer:	Bromphenolblau	0,25%
	Xylencyanol	0,25%
	ad Formamid	
TBE (10 x) :	Tris	154,5 g Tris Base
	Borsäure	26,2 g Borsäure
	EDTA	9,0 g EDTA
	ad 1000 ml H ₂ O, (autoklavieren)	
Silan Lsg. :	Silan	50 µl
	Essigsäure (100%)	30 µl
	Bidest	300 µl
	Ethanol (98 % p A)	9,62 ml

2.5.3. Direkt Blotting Elektrophorese

Bei der Direkt Blotting Elektrophorese werden die DNA-Fragmente am Laufende des vertikal aufgerichteten Gels nach der Auftrennung in der Elektrophorese direkt auf eine Nylonmembran übertragen (blotten). Durch die Veränderung der Membranlaufgeschwindigkeit lässt sich die DNA-Fragmentauftrennung stauchen oder spreizen.

Der Direkt Blotter GATC 1500 der Firma Biotech wurde entsprechend den Empfehlungen des Herstellers genutzt. Im gesamten Gel optimale, d.h. gleiche Laufbedingungen erforderten 30 min Vorlauf bei 30 W und 1700 V. Die Ausnutzung der Methode ließ sich durch mehrfaches Nutzen eines Gels erhöhen. Die Laufgeschwindigkeit der Membran betrug 19 cm/h. Über den Zeitpunkt des Membranstarts orientierten die Bromphenolblau- und die Xylencyanolbande. Nach Beendigung eines Blottingvorgangs wurde die Membran getrocknet und die sich auf der Membran befindliche DNA mittels UV-Bestrahlung (Transluminatation 2 min) an die Membran gebunden.

2.6. Nachweis der geblotteten DNA

Die geblottete DNA wurde durch Hybridisierung mit DIG markierten Sonden nachgewiesen. Als Sonden wurden die PCR-Primer verwendet. Nach der Hybridisierung wurden die Sonden durch Digoxigenin-Antikörper, die fest an eine alkalische Phosphatase gebunden waren, detektiert. Bei Zugabe von Lumigen-PPD wurde die Substanz durch die alkalische Phosphatase enzymatisch gespalten und emittierte Photowellen, die mit einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden konnten.

2.6.1. Primermarkierung mit DIG-Oligo-Endlabeling-Kit

Die Digoxigenin-Markierung der DNA-Sonden wurde unter Verwendung des DNA „Labeling and Detection“ Kits (Boehringer Mannheim, Mannheim), den Angaben des Herstellers entsprechend, durchgeführt.

Zur Herstellung wurden 4 µl Reaktionspuffer, 4 µl CaCl₂, 5 µl H₂O, 5 µl Primer (20 pmol/µl), 1 µl DIG-ddUTP und 1 µl Transferase 30 min bei 37° C inkubiert und 5 min auf Eis gekühlt.

2.6.2. Hybridisierung

Die Membran wurde 1 h lang bei 42 °C in 100 ml Hybridisierungslösung vorhybridisiert und anschließend mit den produktkomplementären DIG-markierten Primern gemischt in 10 ml Hybridisierungslösung über Nacht bei 42°C hybridisiert.

Überschüssige Primer wurden durch folgende Waschstschritte entfernt: 1. Waschvorgang: 100 ml 2 x SSC mit, 0,1% SDS 2 x 5 min; 2. Waschvorgang: 100 ml 0,5 x SSC mit 0,1% SDS 2 x 15 min.

Vor der Antikörperzugabe wurden antigene Determinanten der Membran bei Raumtemperatur durch Blockingreagenz abgedeckt. Dafür wurde die Membran kurz (ca. 1 min) in Waschpuffer gewaschen und 30 min lang in Puffer II inkubiert. Anschließend wurde die Membran 30 min in 80 ml eines Gemisches aus Anti-DIG-AP-Konjugat (75 U/l, 1:10.000 in Puffer II verdünnt) inkubiert. Nach der Inkubation wurden überschüssige Antikörperkonjugate durch zweimaliges Waschen (jeweils 15 min in 100 ml Waschpuffer) entfernt.

Die Membran wurde daraufhin 5 min in 40 ml Puffer III äquilibriert und danach 5 min mit der Lumigen PPD-Lösung (10 mg/ml, Boehringer Mannheim 1:100 in Puffer III verdünnt) inkubiert. Die so behandelte Membran wurde zwischen Whatman-3MM-Papier getrocknet und in Klarsichtfolie verpackt. Nach einer Inkubation von 15 min bei 37°C wurde die Membran zur Belichtung des Röntgenfilms verwendet .

Reagenzien:

Hybridisierungs- lösung:	50 % Formamid 5 x SSC 2 % Blockingreagenz 0,1 % N-Lauroylsarkosin 0,02 % SDS
Puffer I: (Maleinsäure- puffer)	0,1 mol/l Maleinsäure 0,15 mol /l NaCl pH 7,5 eingestellt mit NaOH - Pellets
Puffer II:	Blockingreagenz 1:10 verdünnt in Puffer I
Puffer III:	0,1 mol/l Tris-HCL 0,1 mol/l NaCl 50 mmol/l MgCl ₂ pH 9,5
Waschpuffer:	Puffer I + 0,3 % Tween - 20
SSC (20x):	3 mol NaCl 0,3 mol Natriumcitratdihydrat ad 1000 ml H ₂ O

2.6.3. 5'-DIG-Markierung der Primer durch Veresterung

Dieses Verfahren spart den zeitaufwendigen Schritt der Hybridisierung. Da die OH-Gruppe am 3'-Ende der Primer unangetastet bleibt, besteht die Möglichkeit, die DIG-Markierung schon vor der PCR vorzunehmen. Prinzip dieses Verfahrens ist der chemische Einbau eines DIG-NHS-Esters am 5' Ende des Primers.

Für die Markierung wurden 100 µl Oligonukleotide (200 pmol/µl) mittels 10 µl NaAc (3 mol/l) und 220 µl Ethanol (2 Vol) bei -20°C gefällt und 15 min bei 15000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde erneut in 500 µl 70% Ethanol gewaschen und

bei 15000 rpm 15 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 100 µl Natriumtetraborat (0,1 mol/l) gelöst. Durch Zugabe von 100 µl DIG-NAS-Ester-Lsg. (Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl-E-aminocaproicacid-N-hydroxy-succinimidester) wurde die Reaktion gestartet. Nach der Inkubation über Nacht wurde die Flüssigkeit auf dem Speedvac verdampft, das Pellet in 1 ml 1 x TE aufgenommen und über eine NAP 5-Säule entsalzen.

2.6.4. Autoradiographie

Durch die Photoemission der enzymatischen Lumineszenzspaltung wird der Röntgenfilm belichtet.

Hierfür wurden die bereits getrockneten und in Klarsichtfolie verpackten DIG-detektierten Blotts 30 min unter Lichtausschluss bei 37°C inkubiert und anschließend mit einem Röntgenfilm in eine Kassette gelegt. Nach einer Belichtungszeit von 6 - 12 h konnte der Film entwickelt und das Ergebnis abgelesen werden.

2.7. Auswertung und genetische Kopplungsanalyse

Die belichteten Filme wurden ausgewertet, in dem die Allele ihrer Größe nach nummeriert wurden. Jeder Film wurde von zwei Personen unabhängig voneinander ausgewertet. Allele, die nicht eindeutig einer Phase zugeordnet werden konnten, wurden nicht in die Berechnungen aufgenommen.

2.7.1. Cyrillic

Die Stammbaumverwaltung mit der Zuordnung der einzelnen Phasen zum jeweiligen Chromosom wurde mit dem Programm Cyrillic Version 2.1.0 (erhältlich bei <http://www.cyrillicsoftware.com>) durchgeführt.

2.7.2. M-Link

Die Lod-Score-Berechnung wurde innerhalb des Institutes mit der Softwareanwendung M-Link des Programms Linkage (Version 5.1, Lathrop und Lalouel 1984) durchgeführt. Die Heterozygoten-Frequenz wurde mit 0,001 festgelegt. Für die verschiedenen Markerallele wurde die gleiche Frequenz angenommen. Für die Penetranz der Erkrankung wurde ein Wert von 1,0 eingesetzt. Der Heterozygotenstatus wurde für die hier vorliegende Arbeit nicht bei allen Personen bestimmt. In die Berechnung flossen nur eindeutig als erkrankt identifizierte Personen ein, Heterozygote und nicht erkrankte Personen wurden bei der Berechnung nicht berücksichtigt (affected only).

3. Ergebnisse

Die PCR-Produkte wurden vor der weiteren Analyse auf Agarosegelen kontrolliert. Beispielhaft für eine solche Kontrolle stellt die Abbildung 2 die Erfolgskontrolle der PCR-Produkte des Markers AFM 116xe9 für die Familien MS 96 und MS 200 dar. Die Abbildung lässt erkennen, dass in der elften Spur, d.h. für die Person MS 200 Nr. 101, kein Produkt in der erwarteten Größe vorhanden ist. Die durchgeführte PCR wurde daher für die DNA dieser Person wiederholt, bevor die PCR-Produkte der weiteren Analyse zugeführt wurden.

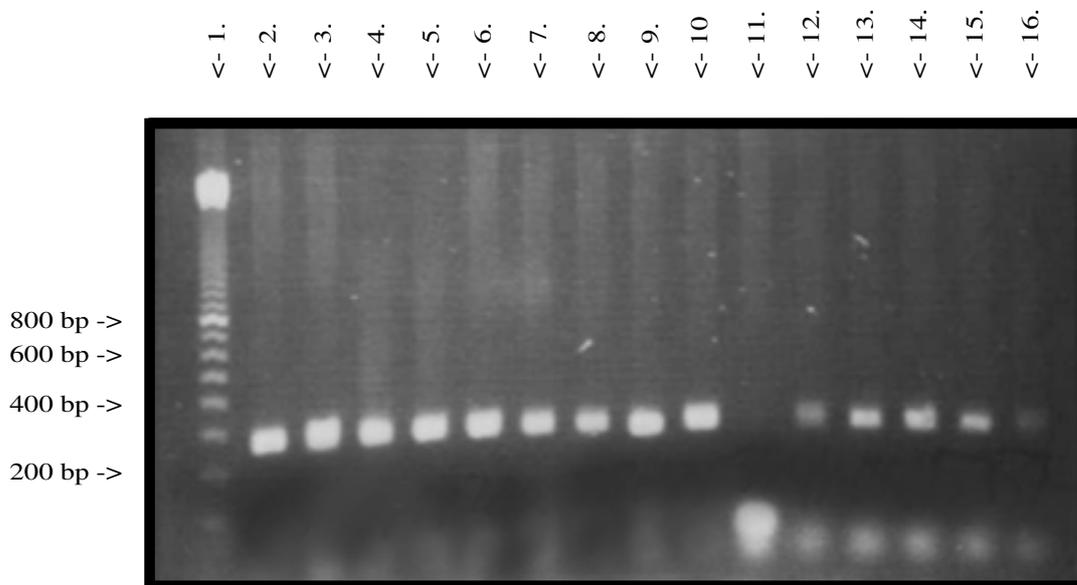


Abbildung 2 Agarosegelkontrolle des Markers AFM116xe9 für die Familien MS 96 und MS 200. - Spurbelegung: 1. 100 bp Leiter; 2. MS 96 Nr.101; 3. MS 96 Nr.102; 4 - 10. MS 96 Nr.201 - 207 (aufsteigend); 11. MS 200 Nr.101; 12. MS 200 Nr.102; 13 - 16. MS 200 Nr. 201 - 204 (aufsteigend); erwartete Produktgröße 260 - 272 bp.

Waren für die PCR eines Markers bei allen Familienmitgliedern Produkte in der erwarteten Größe nachweisbar, wurde die Analyse über die Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt. Zur besseren Übersicht wurden die PCR-Produkte der Familienmitglieder parallel aufgetragen und rechts und links einer Familie eine Spur frei gelassen. Die Abbildung 3 illustriert ein solches Ergebnis beispielhaft für die Familie MS 200 mit dem Marker AFM 207yc1.

<- 1. <- 2. <- 3. <- 4. <- 5. <- 6.

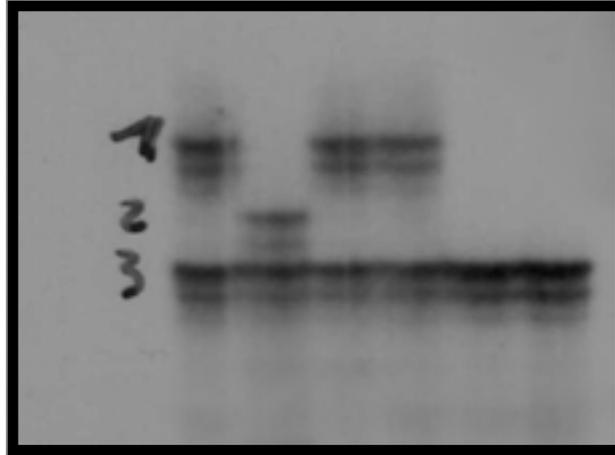


Abbildung 3 Ergebnisse des Markers AFM 207yc1 für die Familie MS 200. - Spurbelegung: 1. MS 200 Nr.101; 2. MS 200 Nr.102; 3 - 6. MS 200 Nr. 201 - 204 (aufsteigend); erwartete Produktgröße 204 - 226 bp.

3.1. Zusammenstellung der Lod-Scores der Chromosomen

In einem initialen Durchgang wurde hier ein Subset der zur Verfügung stehenden Familien MS 76, MS 96, MS 176, MS199 und MS 200 mit einem theoretischen kumulativen Lod - Score von 3,207 verwendet.

3.1.1. Sichere Ausschlüsse

Im folgenden Teil werden die Lod-Scores der untersuchten Regionen anhand der zur Verfügung stehenden Familien aufgeführt. Um eine bessere Übersicht zu gewährleisten, werden große Teile des Genoms in der vorliegenden Arbeit lediglich graphisch umrissen. Mögliche Kandidatenregionen sind noch einmal detailliert im gleichnamigen Kapitel „3.1.2 Kandidatenregionen“ abgehandelt.

Die dargestellten genetischen Karten der Abbildung 4 orientieren sich an der

Wahrscheinlichkeit der genetischen Rekombination, eingeteilt in Rekombinationswahrscheinlichkeiten mit der Einheit centiMorgan (cM). In der Darstellung entspricht die Länge von 0,5 mm 1 cM. Da die genetischen Karten die Entfernung zweier Loci in Wahrscheinlichkeiten angeben, sind sie nicht mit den physikalischen Chromosomenkarten vergleichbar. Wie sich aus der Abbildung 4 ergibt, konn-

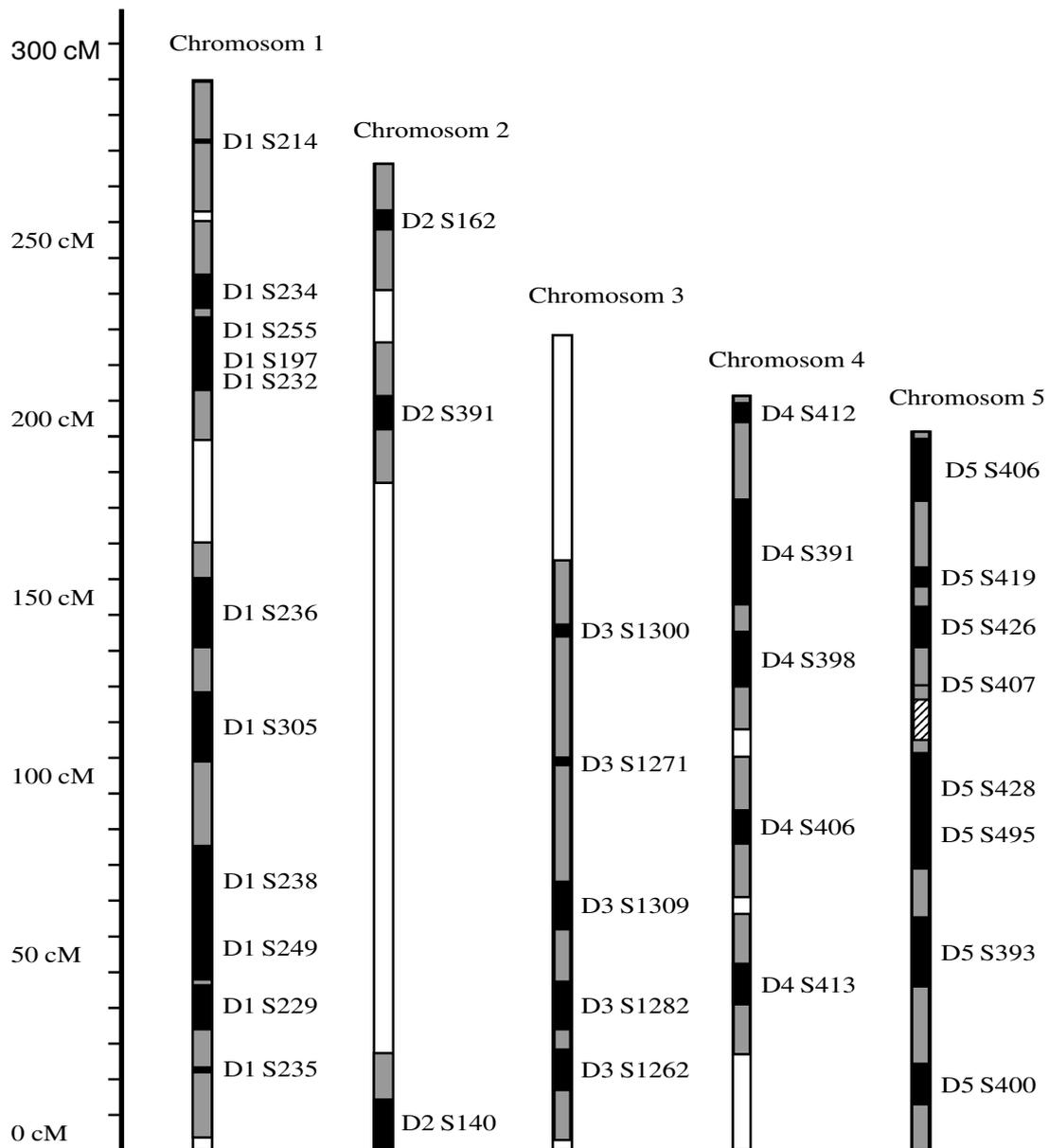


Abbildung 4a Genetische Karten der Chromosomen 1-5. - ■ Sicherer Ausschluss in diesem Bereich / Lod - Score < -2. ■ Region mit Hilfe der Zweipunktanalyse berechnet, kein signifikantes Ergebnis. □ Nicht untersuchter Bereich. ▨ Kandidatenregion siehe 4.1.2.

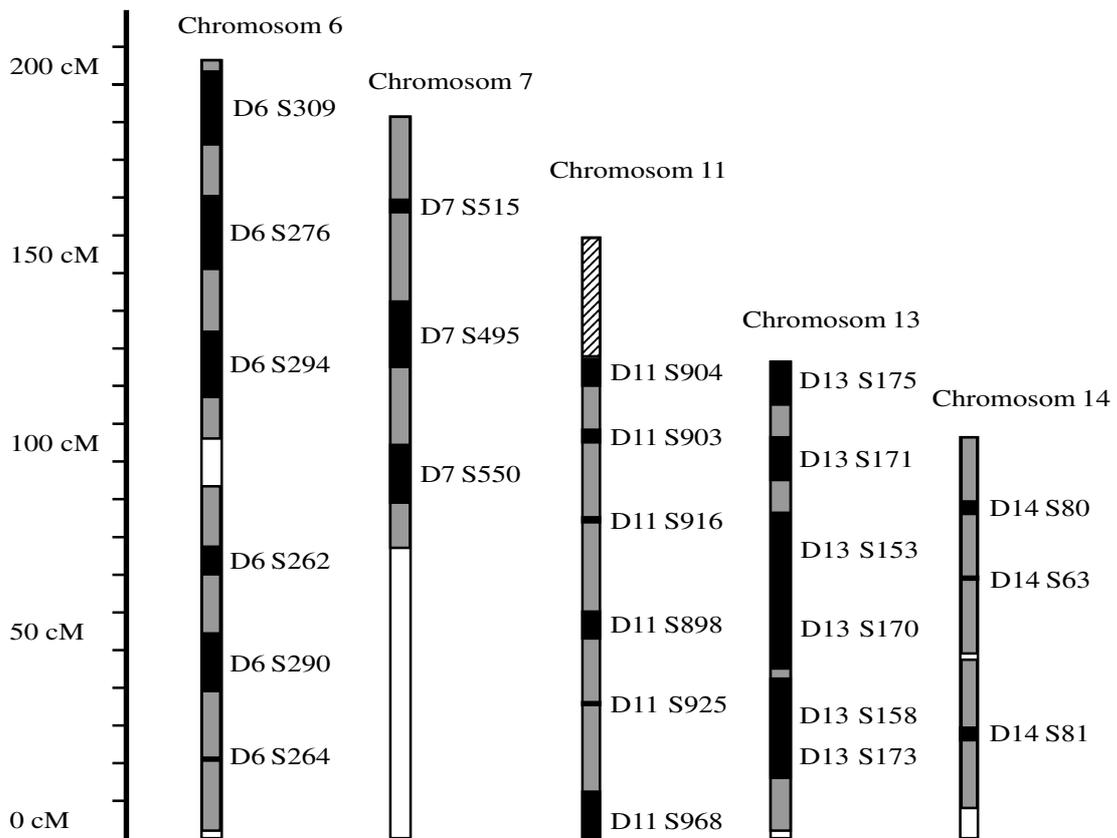


Abbildung 4b Genetische Karten der Chromosomen 6, 7, 11, 13, 14.

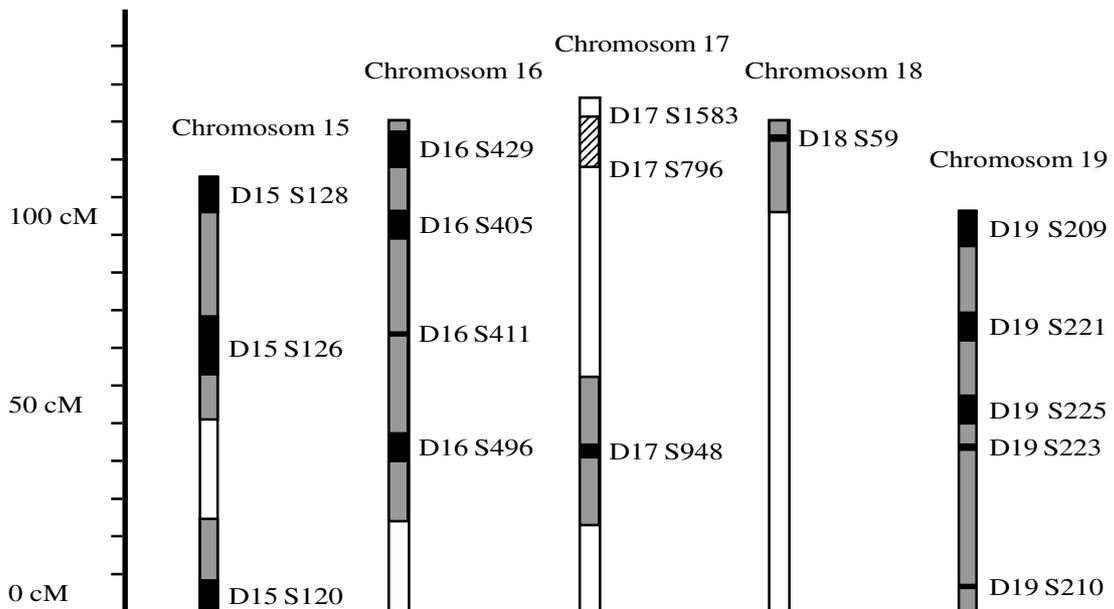


Abbildung 4c Genetische Karten der Chromosomen 15 - 19. ■ Sicherer Ausschluss in diesem Bereich / Lod - Score < -2. □ Region mit Hilfe der Zweipunktanalyse berechnet, kein signifikantes Ergebnis. □ Nicht untersuchter Bereich. ▨ Kandidatenregion siehe 4.1.2.

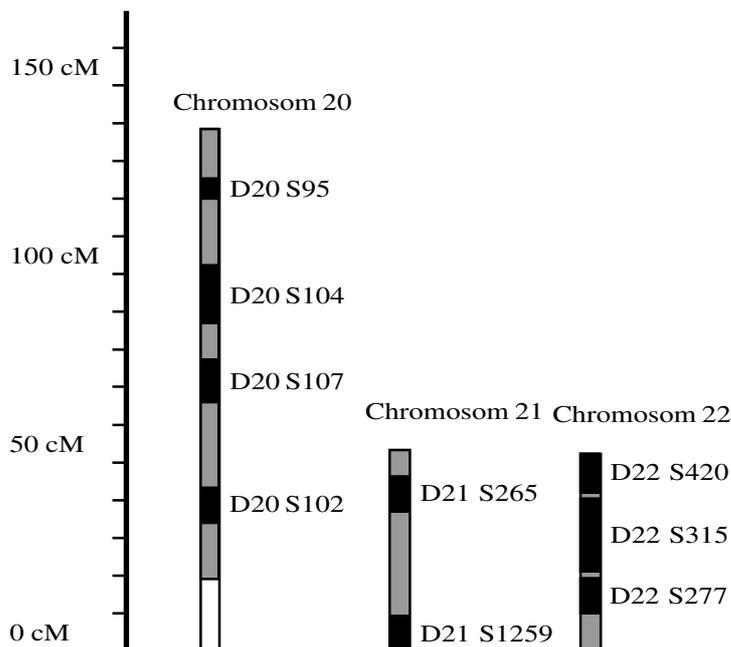


Abbildung 4d Genetische Karten der Chromosomen 20 - 22. ■ Sicherer Ausschluss in diesem Bereich / Lod - Score < -2. ▨ Region mit Hilfe der Zweipunktanalyse berechnet, kein signifikantes Ergebnis. □ Nicht untersuchter Bereich. ▩ Kandidatenregion siehe 4.1.2.

ten bereits im ersten Durchgang große Teile des Genoms als mögliche Lage des gesuchten Gens sicher ausgeschlossen werden (Lod - Score < -2)

3.1.2. Kandidatenregionen

Bei dem in dieser Arbeit durchgeführten „Genomsearch“ wurden neben der Region 17p13 zwei weitere Regionen mit besonderer Aufmerksamkeit betrachtet. Beide Regionen erreichten nicht den geforderten Lod-Score von + 3. Allerdings lieferte die Zweipunktberechnung anhand der zur Verfügung stehenden Stammbäume innerhalb kurzer Entfernungen positive Lod-Scores, so dass eine Kopplung hier zumindest möglich erschien. Um die Aussagekraft dieser Untersuchungen zu erhöhen, wurden die Kandidatenregionen mit allen zur Verfügung stehenden Stammbäumen berechnet.

3.1.2.1. Kandidatenregion auf Chromosom 5

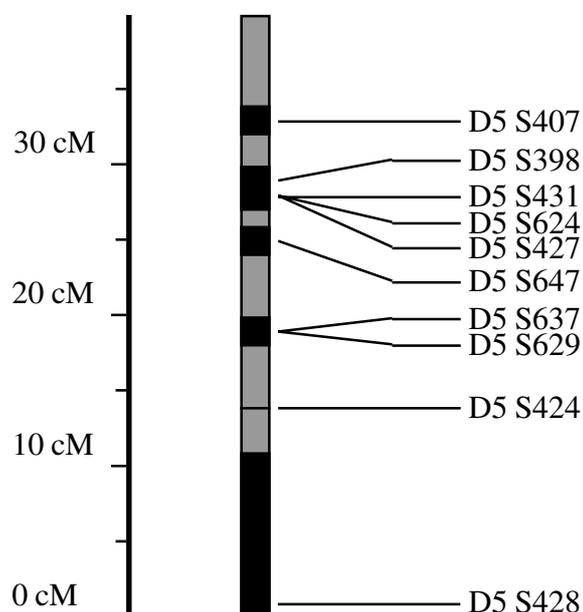


Abbildung 5 Kandidatenregion auf Chromosom 5. - ■ Sicherer Ausschluss in diesem Bereich.

■ Region mit Hilfe der Zweipunktanalyse berechnet, der Lod -Score der flankierenden Marker lag zwischen -2 und 3.

Tabelle 1

Zwei -Punkt Lod - Scores für die Cystinose-Kandidatenregion auf dem Chromosom 5

Locus	Q = 0.00	Q = 0.01	Q = 0.02	Q = 0.03	Q = 0.04	Q = 0.05	Zmax	Qmax
D5 S407*	-∞	-10,52	-1,52	-0,64	0,15	0,37	0,89	0,14
D5 S398	-∞	-5,47	-0,42	0,91	1,15	1,30	1,45	0,11
D5 S431	-∞	-5,86	0,03	0,52	0,76	0,9	1,08	0,09
D5 S624	-∞	-6,68	-0,72	-0,18	0,11	0,13	0,13	0,05
D5 S427	-∞	-5,86	0,04	0,54	0,79	0,94	1,15	0,10
D5 S647	-∞	-3,48	1,97	2,22	2,33	2,37	2,37	0,05
D5 S637	-∞	-8,48	-1,72	-0,94	-0,52	-0,21	-0,08	0,07
D5 S629	-∞	-9,35	-0,56	-0,07	0,19	0,23	0,27	0,06
D5 S424	-∞	-6,50	-0,58	-0,05	0,23	0,54	0,54	0,05
D5 S428*	-∞	-32,1	-8,26	-6,41	-5,33	-4,57	-0,79	0,25

* Die Loci D5 S428 und D5 S407 sind in die Tabelle mit aufgenommen worden, um eine bessere Übersicht zu gewährleisten.

Eine der oben angesprochenen Regionen befand sich auf dem langen Arm des Chromosom 5. Wie die Tabelle 1 deutlich veranschaulicht, ergibt die Berechnung einen maximalen Lod-Score von 2,37 in Verbindung mit dem Marker AFM 292ve1 (zugehöriger Locus D5 S647) in einem Abstand von 5 cM. Der gesamte in Abbildung 5 und Tabelle 1 dargestellte 29 cM umfassende Bereich bietet weitere Lod-Score-Spitzen, beispielsweise der Wert 1,45 gekoppelt mit dem Marker AFM 095zb7 (zugehöriger Locus D5 S398) in einem Abstand von 11 cM oder der Wert 1,08 gekoppelt mit dem Marker AFM 254yb5 (zugehöriger Locus D5 S431) in einem Abstand von 9 cM.

3.1.2.2. Kandidatenregion auf Chromosom 11

Eine weitere Kandidatenregion für das Cystinosegen lag auf dem kurzen Arm des Chromosom 11 (vgl. Abb. 6). Wie die Werte der Tabelle 2 darstellen, ergaben die Berechnungen einen maximalen Lod-Score von 1,35 in Verbindung mit dem Marker AFM 022th2 (zugehöriger Locus D11 S899) in einem Abstand von 15 cM.

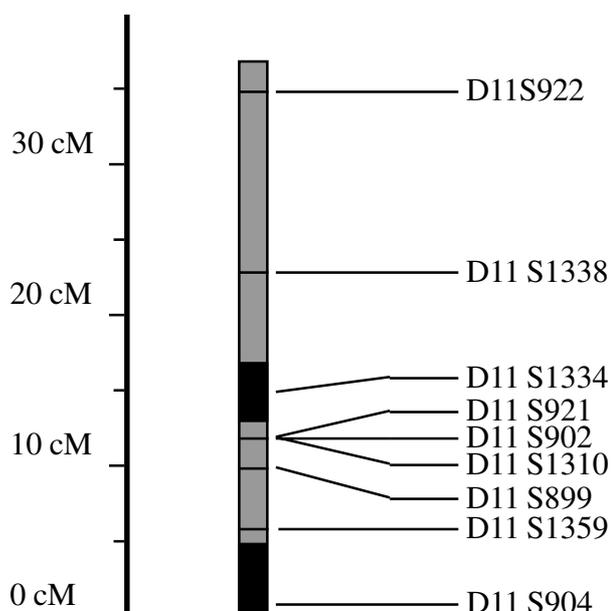


Abbildung 6. Kandidatenregion auf Chromosom 11. - ■ Sicherer Ausschluss in diesem Bereich. ■ Region mit Hilfe der Zweipunktanalyse berechnet, der Lod-Score der flankierenden Marker lag zwischen -2 und 3.

Viele der untersuchten Marker in diesem Areal wiesen lediglich eine geringe Allelfrequenz auf. Dieser Umstand erklärt die geringe Aussagekraft der Lod-Score-Berechnung. Auch unter Verwendung aller zur Verfügung stehenden Familien konnte kein Lod - Score von + 3 oder größer errechnet werden. Viele der untersuchten Marker der 34 cM umfassenden Region ergaben positive Ergebnisse für eine Kopplung des Markers mit dem Cystinosegen in einem Abstand von nur wenigen centiMorgan.

Tabelle 2

Zwei - Punkt Lod - Scores für die Cystinose - Kandidatenregion auf dem Chromosom 11

Locus	Q = 0.00	Q = 0.01	Q = 0.02	Q = 0.03	Q = 0.04	Q = 0.05	Zmax	Qmax
D11 S922	-∞	-10,2	-1,28	-0,69	-0,37	-0,12	-0,12	0,05
D11 S1338	-∞	-6,65	-0,93	-0,0,39	-0,10	0,04	0,54	0,14
D11 S1334	-∞	-8,63	-2,10	-1,34	-0,91	-0,63	-0,43	0,07
D11 S921	-∞	-2,59	-0,85	-0,22	0,13	0,26	0,93	0,13
D11 S902	-∞	-1,98	-1,15	-0,87	-0,41	-0,27	0,18	0,09
D11 S1310	-∞	-6,30	-0,80	-0,49	-0,32	-0,18	0,04	0,11
D11 S899	-∞	-0,65	0,01	0,24	0,56	0,71	1,35	0,15
D11 S1359	-∞	-0,68	-0,30	-0,13	-0,02	0,05	0,05	0,05
D11 S904*	-∞	-17,7	-4,73	-3,32	-2,54	-2,01	-1,18	0,08

* Der Locus D 11 S 904 wurde zur besseren Übersicht in die Tabelle aufgenommen.

3.2. Bestätigung der Kandidatenregion 17p13

Während der laufenden Analyse wurden wir von einer konkurrierenden Arbeitsgruppe über eine mögliche Kandidatenregion auf Chromosom 17 informiert. Darauf hin haben wir diese Region, welche von uns zu diesem Zeitpunkt noch nicht untersucht worden war, mit allen uns zur Verfügung stehenden Stammbäumen untersucht. Die Zahlenwerte der Berechnung sind in der Tabelle 3 abgebildet. Die Berechnungen der verschiedenen Marker dieser Region ergaben über große Bereiche positive Lod-Scores. Vier der durchgeführten Berechnungen ergaben für benachbarte Marker Werte oberhalb von 3 in kurzen Abständen zu den jeweiligen Markern. Einen maximalen Wert von 4,41 ergab die Berechnung in

Verbindung mit dem Locus D17 S1584 (zugehöriger Marker AFMa 061za9) mit einem Abstand von 2 cM (vgl. Tabelle 3). Damit wurde diese Kandidatenregion eindeutig bestätigt.

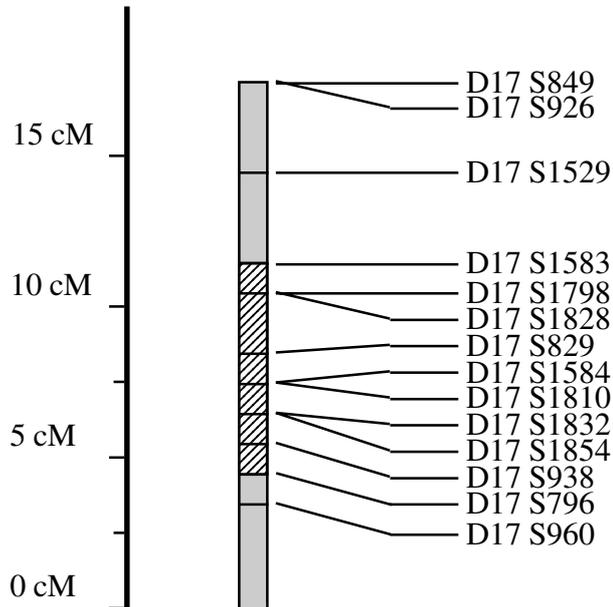


Abbildung 7 Genetische Karte der Kandidatenregion 17p13. - ■ Punktueller Bereich als Lagemarkierung der Loci innerhalb dieser Karte. ▨ Errechnete Kandidatenregion.

Tabelle 3

Zwei-Punkt-Lod-Scores für die Cystinose-Kandidatenregion auf Chromosom 17p13

Locus	Q =	Q =	Q =	Q =	Z max	Q max
	0.00	0.01	0.05	0.10		
D17 S1583	-∞	2,03	2,29	2,03	2,31	0,04
D17 S1798	2,73	2,66	2,38	2,01	2,73	0,00
D17 S1828	-∞	3,42	3,48	3,00	3,58	0,03
D17 S1584	-∞	4,29	4,24	3,62	4,41	0,02
D17 S1810	3,63	3,50	3,01	2,42	3,63	0,00
D17 S1832	4,20	4,09	3,62	3,01	4,20	0,00
D17 S1854	-∞	0,36	1,29	1,32	1,35	0,08
D17 S 938	-∞	1,90	2,19	1,99	2,20	0,04
D17 S 796	4,43	4,28	3,68	- *	4,43	0,00

* Für den nicht in dieser Tabelle aufgeführten Locus ergab die Berechnung kein verwertbares Ergebnis.

3.3. Einengung der kritischen Region auf Chromosom 17p13 durch Rekombinationsereignisse

Nachdem anhand der Berechnungen eine Kopplung mit der Region 17p13 nachgewiesen war, wurde in der Folge versucht, die Region auf Grund kritisch liegen-

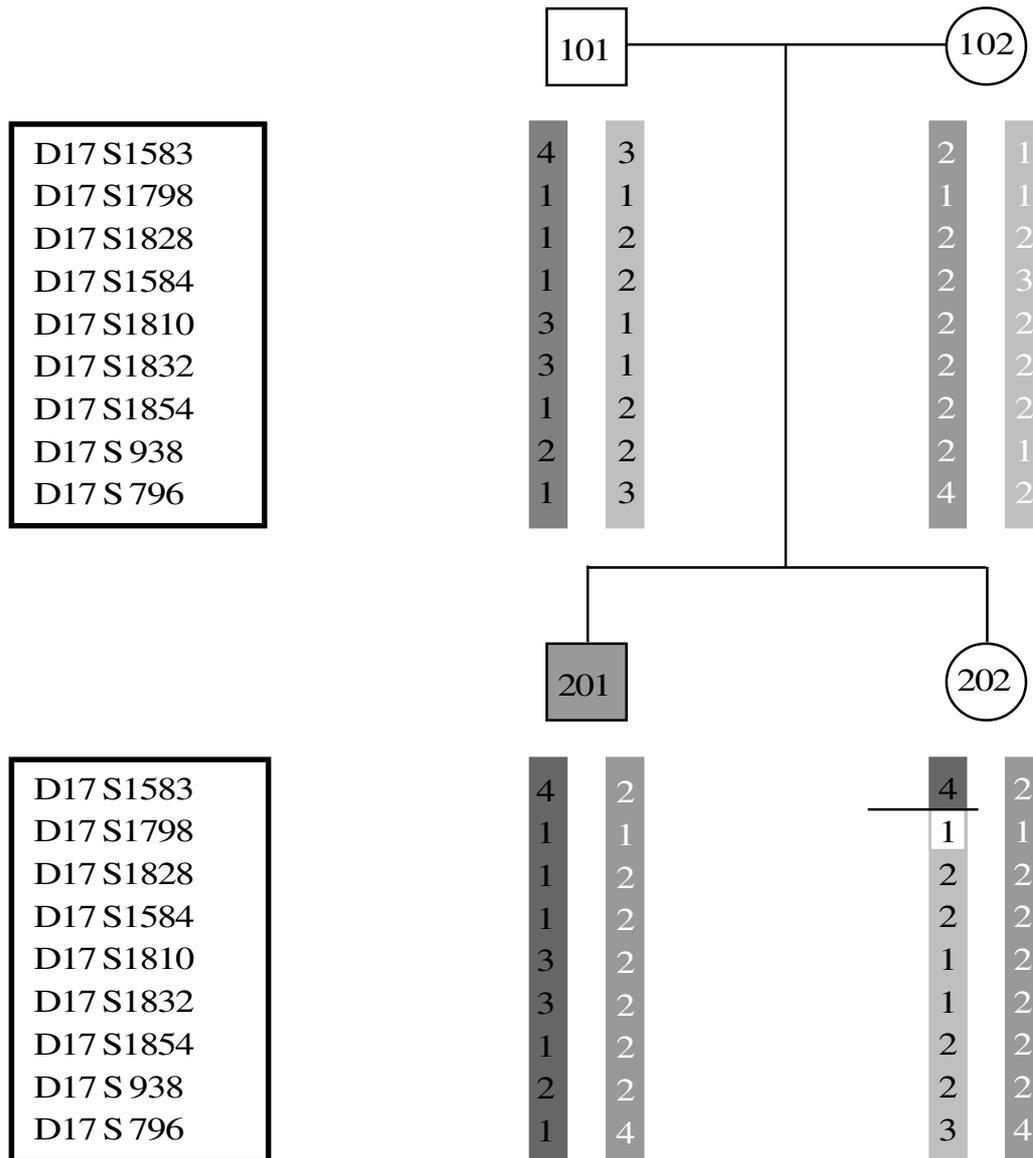


Abbildung 8 FamilieMS 131 mit ausgewiesener Haplotypenzuordnung für die Region 17p13. Chromosomenareale, bei denen keine Kopplung anzunehmen ist, sind hell hinterlegt. Chromosomenareale, bei denen eine Kopplung wahrscheinlich ist, sind dunkel hinterlegt. Der kindliche Chromosomenbereich, der durch die geringe Allelfrequenz des Markers AFMa 202xf5 (D17 S1798) in dieser Familie nicht sicher zugeordnet werden kann, ist weiß hinterlegt. Die relevante Rekombination ist durch einen schwarzen Balken gesondert hervorgehoben.

der Rekombinationsereignisse möglichst weit einzugrenzen. Bei der Durchsicht der verwendeten Familien konnten drei Familien mit meiotischen Rekombinationen im kritischen Bereich beobachtet werden. Zur besseren Übersicht sind die Familien in diesem Kapitel noch einmal graphisch dargestellt (Abb. 8 - Familie MS 131; Abb. 10 - Familie MS 200; Abb. 11 - Familie MS 096).

Durch eine Rekombination im kritischen Bereich der Familie MS 131 (durch einen schwarzen Balken hervorgehoben, vgl. Abb. 8) wird der Locus D17 S1583 nach distal von der kritischen Region abgegrenzt. Auf Grund der mangelnden Allelfrequenz dieser Familie, bezogen auf den Marker AFMa 202 xf5 (zugehöriger Locus D17 S1798), kann keine proximalere Eingrenzung mit Hilfe dieser Familie vorgenommen werden.

In einer weiteren Familie konnten gleich mehrere Rekombinationen im kritischen Bereich beobachtet werden. Auch wenn es in dieser Familie auffallend viele Rekombinationsereignisse gibt, so waren die Phasen der einzelnen Marker doch so eindeutig zuzuordnen, dass die einzelnen Haplotypen eindeutig bestimmt wer-

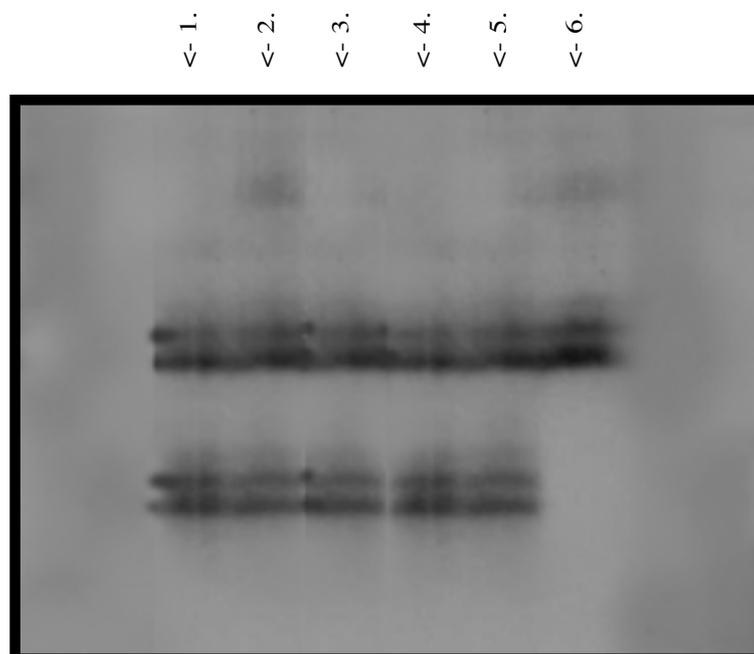


Abbildung 9 Ergebnisse des Markers AFMb 307xg5 für die Familie MS 200. - Spurbelegung: 1. MS 200 Nr.101; 2. MS 200 Nr.102; 3 - 6. MS 200 Nr. 201 - 204 (aufsteigend).

den konnten. Beispielhaft für die Ergebnisse dieser Familie illustriert die Abbildung 9 den Röntgenfilm des Marker AFMb 307zg5 (zugehöriger Locus D17 S1583).

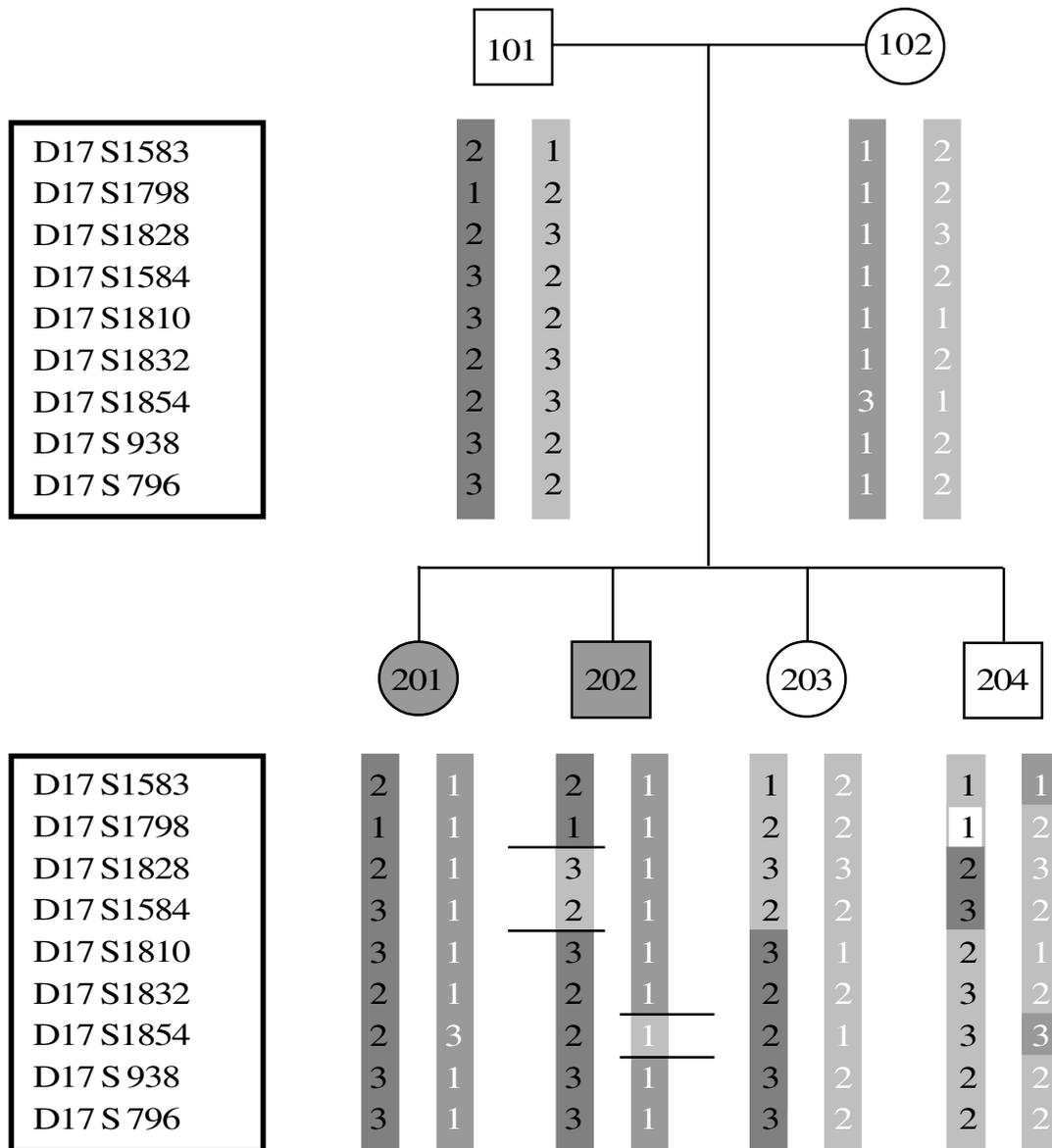


Abbildung 10 Familie MS 200 mit ausgewiesener Haplotypenzuordnung für die Region 17p13. Chromosomenareal, bei denen keine Kopplung anzunehmen ist, sind hell hinterlegt. Chromosomenareale, bei denen eine Kopplung wahrscheinlich ist, sind dunkel hinterlegt. Der kindliche Chromosomenbereich, der durch die geringe Allelfrequenz des Markers AFMa 202xf5 (D17 S1798) in dieser Familie nicht sicher zugeordnet werden kann, ist weiß hinterlegt. Die relevanten Rekombinationen sind durch schwarze Balken gesondert hervorgehoben.

Abbildung 10 stellt die einzelnen Haplotypen der Familienmitglieder für den Stammbaum MS 200 geordnet dar. Meiotische Rekombinationen sind durch Grau-

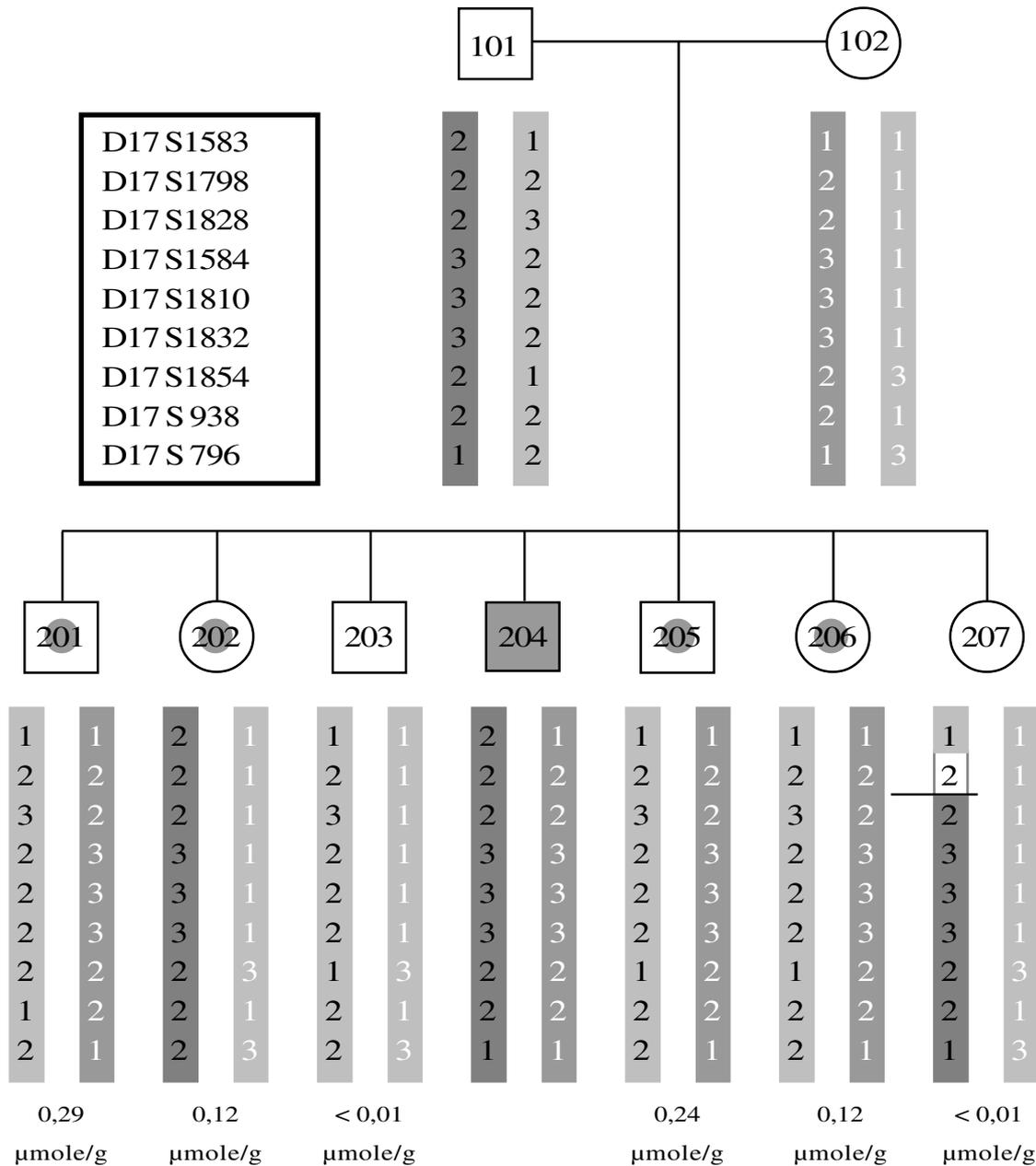


Abbildung 11 Familie MS 96 mit ausgewiesener Haplotypenzuordnung für die Region 17p13. Chromosomenareale bei denen keine Kopplung anzunehmen ist, sind hell hinterlegt. Chromosomenareale, bei denen eine Kopplung wahrscheinlich ist, sind dunkel hinterlegt. Der kindliche Chromosomenbereich, der durch die geringe Allelfrequenz des Markers AFMa 202xf5 (D17 S1798) in dieser Familie nicht sicher zugeordnet werden kann, ist weiß hinterlegt. Die relevante Rekombination ist durch einen schwarzen Balken gesondert hervorgehoben.

schattierungen farblich hervorgehoben. Die für die Eingrenzung der kritischen Region wichtigen Rekombinationen sind durch schwarze Balken gesondert gekennzeichnet. Wie anhand der Abbildung 10 deutlich wird, schließen die gekennzeichneten Rekombinationen das Areal zwischen den Loci D17 S1828 und D17 S1584 aus. Eine weitere Rekombination im mütterlichen Chromatid des Familienmitgliedes Nr. 202 macht eine Kopplung mit dem Locus D17 S1854 unmöglich. Nach der Betrachtung der Familie MS 200 bleiben von dem ursprünglich berechneten Bereich die Teilbereiche distal des Locus D17 S1828, proximal des Locus D17 S1584 bis zum Locus D17 S1854 und proximal des Locus D17 S1854 übrig.

In der Familie MS 96 konnte eine weitere meiotische Rekombination im kritischen Bereich bei einem nicht an Cystinose erkrankten Kind beobachtet werden. Um mit Hilfe dieser Rekombination das kritische Areal weiter einzugrenzen, wurde für die gesunden Kinder dieser Familie der Heterozygotenstatus durch biochemische Cystingehaltsmessung bestimmt. Wie die eingetragenen Werte in der Abbildung 11 verdeutlichen, war die Zuordnung der Nachkommen (homozygot gesund - heterozygoter Träger der Anlage) eindeutig vorzunehmen. Die Rekombination des Individuums Nr. 207 grenzt den Locus D17 S1828 nach proximal vom kritischen Areal ab. Auf Grund der mangelnden Allelvielfalt des Markers AFMa 202 xf5 für die väterlichen Schwesterchromatiden kann für den zugehörigen Locus D17 S1798 keine Aussage getroffen werden.

4. Diskussion

Schon lange versucht man, einzelne Gene und damit die entsprechenden Proteintranskripte der verschiedenen Stoffwechselerkrankungen näher zu definieren. Der rein biochemische Ansatz, d.h. die Isolierung eines defekten Proteins, ist häufig sehr problematisch, da für viele Stoffwechselerkrankungen lediglich erhöhte Konzentrationen eines Zwischenproduktes nachgewiesen werden können, man aber keinerlei Erkenntnisse über Syntheseweg, Abbau oder intrazellulären Transport dieser Produkte hat. Auch in der Cystinoseforschung zeigte der rein biochemische Ansatz keine weiteren Erfolge. Seit ungefähr 10 Jahren war ein Stillstand im Erkenntniszuwachs zu verzeichnen.

Der molekulargenetische Ansatz der Positionsklonierung, früher auch als reverse Genetik bezeichnet, bot hier die Möglichkeit, bei bekanntem Vererbungsmodus systematisch die Lage des Gens zu bestimmen. Über die nähere Eingrenzung des Genortes, der Sequenzanalyse dieser Region und der anschließenden Entschlüsselung des Gens ist man damit in der Lage, Proteintranskripte herzustellen und die Erkrankung ursächlich zu verstehen.

Das Ziel dieser Arbeit war die genetische Kartierung des Cystinose - Locus als Voraussetzung des damals noch nicht identifizierten Erkrankungsgens. Zu Beginn der Untersuchung gab es keinerlei Anhaltspunkte für eine Einschränkung im Gesamtgenom. Lediglich der autosomal rezessive Erbgang konnte aus Literaturrecherchen als gesichert angenommen werden (Manz und Gretz 1985). Die Wahrscheinlichkeit auf einem der zweiundzwanzig Autosomen das gesuchte Gen zu vermuten, war damit annähernd gleich groß.

4.1. Methodische Aspekte

Zur Lokalisation des Gens standen DNA Proben von 22 Familien mit insgesamt 60 Nachkommen zur Verfügung. Es wurden nur Familien in die Untersuchung aufgenommen, die mindestens ein Kind mit klinisch manifester Cystinose hat-

ten. Die Diagnose der Indexpatienten wurde durch die Bestimmung des Cystingehaltes der freien PMNL bestätigt. Die Cystinmengenbestimmung wurde mit einem Aminosäureanalysegerät und mit Hilfe der Kationenaustausch-säulenchromatographie durchgeführt. Die Diagnose galt als bestätigt, wenn mit beiden Verfahren eindeutig positive, sprich erhöhte Cystinwerte bestimmt wurden. Die so durchgeführte Diagnosestellung sollte eine ausreichende Sicherheit gewährleisten.

Da eine kummulative Berechnung den geforderten Lod - Score von drei weit übertraf, wurden für den ersten Arbeitsschritt des Screenings lediglich DNA - Proben der Familien MS 76, MS 96, MS 176, MS 199 und MS 200 genutzt. Der Vorteil dieser Vorgehensweise lag in der besseren Geräteausnutzung. Auf Grund der reduzierten DNA - Proben - Anzahl war es möglich, zwei Primeransätze parallel im Heizblock zu bearbeiten. Diese Vorgehensweise sparte Zeit und Material. Häufig war es nach einer gelungenen PCR sogar möglich, die Produkte auf einem Blott auszuwerten. Die Produkte wurden mit einer Latenzzeit von 0,5 h aufgetragen. Waren die Produkte unterschiedlich groß, so wurden die kleineren zuerst aufgetragen.

Aufgrund der großen Aussagekraft der Microsatelliten - Marker - Sammlung von Geneton konnte mit dieser Vorgehensweise eine Kopplung des Cystinosegens für 60 % des Gesamtgenoms ausgeschlossen werden. Der Umfang der ausgeschlossenen Genomanteile und das Auffinden des Genlocus sind ein Beleg für das riesige Potential der Microsatelliten - Marker und für die Korrektheit des methodischen Ansatzes.

Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit anhand der Berechnung deutlich machen, lieferten die einzelnen Untersuchungen höchst unterschiedliche Resultate. Einige Kalkulationen lieferten Ausschlüsse in großen Bereichen unterhalb und oberhalb der untersuchten Region mit Lod - Scores kleiner -2, obwohl nur ein kleiner Teil der zur Verfügung stehenden Familien genutzt wurde (beispielsweise die Marker AFM 016xf3 - zugehöriger Locus D4 S391 - Abb. 4a, AFM 240wh2 - zugehöriger Locus D13 S170 - Abb. 4b). Andere Berechnungen lieferten lediglich einen eng umschriebenen Ausschluss der untersuchten Region (bei-

spielsweise die Marker AFM 079zb7- zugehöriger Locus D6 S264, AFM185ya1 - zugehöriger Locus D11 S916 - Abb. 4b). Wieder andere Ergebnisse machten eine Kopplung des gesuchten Locus mit dem Marker im Abstand einiger cM sogar wahrscheinlich, wie die Bereiche zwischen den Loci D5 S407 und D5 S428 (vgl. Abb. 5) und der Bereich telomer von D11 S904 (vgl. Abb. 6). Es konnten positive Lod - Scores ermittelt werden (Werte aufgelistet in Tabellen 1 und 2). Letztgenannte Regionen wurden als Kandidatenregion betrachtet und engmaschiger untersucht.

4.2. Kandidatenregionen auf Chromosom 5 und 11

Die Kandidatenregion auf dem Chromosom 5 lieferte bei der Untersuchung der verschiedenen Marker immer wieder Berechnungsergebnisse, die eine Kopplung des Cystinosegens in einem geringen Abstand wahrscheinlich erschienen ließen. Bei genauerer Betrachtung der einzelnen Chromosomenareale wurde jedoch mit jedem neuen Ergebnis eine Kopplung mit der Region unwahrscheinlicher. Betrachtet man beispielsweise den maximalen Wert von 2,37. Dieser Wert wird in einem Abstand von 5 cM zum Locus D5 S647 (zugehöriger Marker AFM 292ve1) erreicht. Bei ausschließlicher Betrachtung des Zahlenwertes ein Ergebnis, welches eine Kopplung durchaus wahrscheinlich erscheinen lässt. Sieht man diesen Zahlenwert jedoch im Zusammenhang mit dem Locus D5 S637 (zugehöriger Marker AFM 281yh9), der nach den aktuell gültigen genetischen Karten nicht einen centiMorgan vom Locus D5 S647 entfernt liegt, so erscheint eine Kopplung deutlich unwahrscheinlicher als der initiale Zahlenwert vermuten lässt.

Anders verhielten sich die Ergebnisse der Kandidatenregion auf Chromosom 11. Nach den Berechnungen konnte ein maximaler Zahlenwert von 1,34 errechnet werden, bei der Betrachtung einzelner Schwesterchromatiden fiel auf, dass viele der untersuchten Familien für die untersuchten Marker eine so geringe Allelfrequenz aufwiesen, dass eine Kopplung nicht ausgeschlossen werden konnte, jedoch aufgrund der geringen Allelfrequenz auch nicht nachzuweisen war.

4.3. Charakterisierung der Kandidatenregion auf Chromosom 17p13

Die Kandidatenregion auf dem Chromosom 17 überstieg in der Berechnung die geforderten Signifikanzschwellen und bewies eine Kopplung des Cystinosegens mit dieser Region. Gleichzeitig bestätigen auch andere Arbeitsgruppen, die ihre Arbeit mit dem gleichen Ziel aufnahmen, den Locus auf Chromosom 17p13. Alle Untersuchungsergebnisse überschritten den geforderten Lod - Score von 3. Damit kann der Locus als gesichert angenommen werden (The Cystinosis Collaborative Group 1995; Jean et al. 1996).

Nach der Identifikation des Genlocus besteht die weitere, wichtige Aufgabe, die in Frage kommende genomische Region auf einen möglichst kleinen Bereich einzugrenzen, in dem dann die Suche nach einem Erkrankungsgen aussichtsreich ist. Ein wesentlicher Teil der hier vorgestellten Ergebnisse dient der genetischen Feinkartierung der Kandidatenregion.

Anhand der hier vorgestellten Ergebnisse war es möglich die mathematisch berechnete Region, die sich vom Locus D17 S1583 bis zu Locus D17 S796 erstreckt und damit ein 7 cM großes Areal umfasste, weiter einzugrenzen. Der Stammbaum MS 200 mit zwei betroffenen und zwei nicht betroffenen Geschwistern zeigte, dass sich die beiden betroffenen Geschwister in der kritischen Region genotypisch unterschieden. Wie die Abbildung 10 des Ergebnisteils illustriert, konnten die meisten Marker eindeutig einer Phase zugewiesen und damit die Haplotypen festgelegt werden. Auf der Basis der kleinstmöglichen Anzahl der anzunehmenden Rekombinationsereignisse konnte die kritische Region für das Cystinose - Gen anhand dieses Stammbaums auf drei Areale eingegrenzt werden. Wie die Abbildung 10 deutlich macht, war nach den vier anzunehmenden abgebildeten Rekombinationen im Chromosom des männlichen betroffenen Kindes Nr. 202 die Lage des Cystinose - Gens distal des Locus D17 S1828, zwischen den Loci D17 S1584 und D17 S1854 sowie proximal des Locus D17 S1854 möglich. Die Loci der Marker AFMb 013zb1 (zugehöriger Locus D17 S1828) und AFMa 061za9 (zugehöriger Locus D17 S1584) waren aufgrund der Heterozygotie für

die beiden erkrankten Nachkommen Nr. 201 und Nr. 202 ausgeschlossen. Gleiches gilt für den weiter proximal gelegenen Locus D17 S1854 (zugehöriger Marker AFMb 346c5). Da beide Kinder erkrankt waren, muss für eine Kandidatenregion eine Homozygotie beider Kinder gefordert werden. Die Betrachtung dieses Stammbaumes liess also eine Einschränkung des Bereichs distal des Locus D17 S1828, zwischen den Loci D17 S1584 und D17 S1854 sowie proximal des Locus D17 S1584 zu.

In einem weiteren Stammbaum, dem Stammbaum MS 131 wurde durch eine Rekombination der Locus D17 S1583 (zugehöriger Marker AFMb 307zg5) nach distal vom kritischen Bereich abgegrenzt (vgl. Abb. 8). Wie deutlich zu sehen ist, sind beide Nachkommen für den Marker an diesem Locus homozygot. Da die Tochter der Familie jedoch nicht erkrankt ist, muss für den Locus der Erkrankung eine Heterozygotie beider Nachkommen gefordert werden. Es kam also nur der Bereich proximal des Locus D17 S1583 in Frage. Auf Grund der mangelnden Allelzahl für den Marker AFMa 202xf5 (zugewiesener Locus D17 S1798) für die Familie MS 131 konnte anhand der Ergebnisse dieser Familie keine weitere Aussage getroffen werden, so dass eine enger gefasste telomere Grenze des Areals anhand dieser Familie nicht möglich war.

Schon nach der Betrachtung der Rekombinationen dieser beiden Familien war das kritische Areal zwischen den Loci D17 S1583 und D17 S1828, D17 S1584 und D17 S1854 sowie proximal des Locus D17 S1854 einzugrenzen.

In einer weiteren Familie, der Familie MS 96, gab es eine meiotische Rekombination im kritischen Bereich bei einem gesunden Mädchen. Da diese Rekombination bei einem nicht an Cystinose erkranktem Kind aufgetreten war, wurden für diese Familie die Cystingehaltsmengen der freien PMNL bei den nicht betroffenen Geschwistern bestimmt. Wie die Messwerte der Abbildung 11 illustrieren, konnte der Heterozygotenstatus der Nachkommen auf Grund dieser Untersuchung eindeutig bestimmt werden. Da das Kind Nr. 207 nach den Messwerten der Untersuchung als homozygot gesund diagnostiziert wurde, der Locus D17 S1828 (zugehöriger Marker AFMb 013zb1) und der weiter proximal gelegene Bereich aber bei dieser Familienkonstellation mit dem Cystinosegen gekoppelt wäre, musste sich das gesuchte Gen distal des Locus D17 S1828 befinden.

Diese Rekombination ist bei der Eingrenzung des Locus von erheblicher Wichtigkeit, da sie das kritische Areal auf eine Größe von 2,6 cM begrenzt. Zwei der möglichen Areale, die nach der Betrachtung der ersten beiden Familien als Kandidatenregionen in Frage kamen, werden durch diese Rekombination ausge-

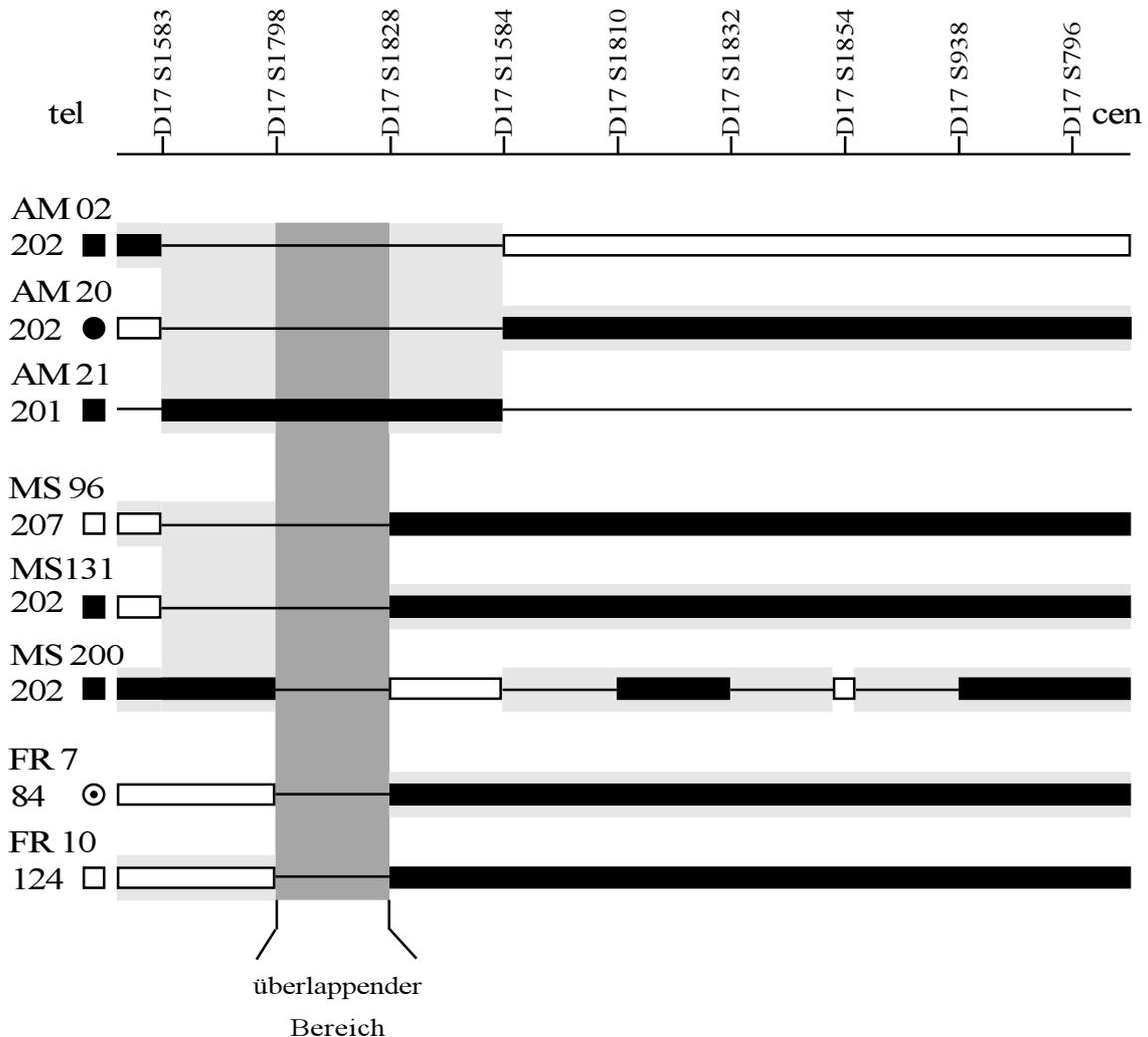


Abbildung 12 Rekombinante Chromosomen der kritischen Region. - Teilergebnisse der amerikanischen Arbeitsgruppe (The Cystinosis Collaborative Research Group 1995) und der Französischen Arbeitsgruppe (Jean et al 1996) sind übernommen worden, um eine übersichtliche Darstellungsweise zu erhalten. Interessante Bereiche sind grau hinterlegt. Der Bereich, der nach den relevanten Rekombinationen beider Arbeitsgruppen als wahrscheinliches Areal für die Lage des Cystinosegens angesehen werden muß, ist doppelt grau hinterlegt.

- Bereich des Chromosoms, der wahrscheinlich mit dem Cystinosegen gekoppelt ist.
- Bereich des Chromosoms, der wahrscheinlich mit einem unbetroffenen Allel des Cystinosegens gekoppelt ist.
- Nicht aussagfähiger Bereich.

geschlossen. Für das dritte Areal, zwischen den Loci D17 S1583 und D17 S1828 wird durch diese Rekombination die telomere Grenze noch einmal bestätigt. Die Kandidatenregion konnte damit auf den Bereich zwischen den Loci D17 S1828 und D17 S1583 begrenzt werden. Damit ergibt sich gegenüber den Ergebnissen der Originalbeschreibung eine wesentliche Einengung des kritischen Areals (siehe Abb. 12). Unsere Untersuchungsergebnisse mit der Festlegung von D17 S 1828 als proximale Grenze bestätigten die fast gleichzeitig publizierten Ergebnisse der französischen Arbeitsgruppe, die zusätzlich das Intervall auch distal einengen konnten (Jean et al. 1996).

Betrachtet man die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse im Kontext mit den Ergebnissen von „The Cystinosis Collaborative research Group“ (1995), so stellt man fest, daß ähnliche Ergebnisse bei den Untersuchungen erzielt wurden. Aufgrund günstig liegender meiotischer Rekombinationen konnte das mögliche Areal in der vorgestellten Arbeit enger gefasst werden. (vgl. Abb. 12 - doppelt grau hinterlegt). Das Areal wird distal durch den Locus D17 S1583 begrenzt (ersichtlich aus den Rekombinationen der Stammbäume MS131 sowie AM 02 (vgl. Abb. 12) und proximal durch den Locus D17 S1828 (ersichtlich aus der Rekombination der Familie MS 96, vgl. Abb. 11/12). Weitere mögliche Areale zwischen den Loci D17 S1584 und D17 S1854 sowie proximal des Locus D17 S1854, die nach den initialen Betrachtungen der Familien MS 131 und MS 200 als mögliche Kandidatenregionen in Frage kamen, erscheinen aufgrund der Rekombination des amerikanischen Stammbaums AM 02 (vgl. Abb. 12.) sowie der Rekombination in der Familie MS 96 ausgeschlossen.

Bei weiteren Betrachtungen im Zusammenhang mit den von Jean et al. (1996) vorgestellten Untersuchungsergebnissen (vgl. Abb. 12) wird das bisher ermittelte 2,6 cM große Areal noch einmal eingeschränkt. Aufgrund einer günstig liegenden Rekombination gelang es der französischen Arbeitsgruppe um G. Jean den Locus D17 S1798 sowie den distal dieses Locus gelegenen Bereich als mögliche Kandidatenregion auszuschließen. Wie die Abbildung 12 verdeutlicht, gab es in dem Individuum Nr. 84 der in Frankreich untersuchten Familien eine meiotische Rekombination zwischen den Loci D17 S1798 und D17 S1828. Diese Rekombination wurde bei einem klinisch gesunden Mädchen beobachtet.

Laborchemisch konnte dieses Kind einwandfrei als „obligat heterozygot“ für den Cystinoselocus diagnostiziert werden. Da der Chromosomenbereich telomer dieses Locus nicht mit dem erkrankten Cystinosegen gekoppelt ist, muss das erkrankte Gen auf dem Chromosom proximal des Locus D17 S1798 lokalisiert sein. In einer weiteren Rekombination bei einem gesunden Jungen konnte G. Jean noch einmal die centromere Grenze des Bereichs distal des Locus D17 S1828 bestätigen.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der französischen Arbeitsgruppe sowie bei der Einschränkung durch die meiotische Rekombination des Individuums 207 der Familie MS 96 ist zu beachten, dass die Einschränkungen auf Grund beobachteter meiotischer Rekombinationen in klinisch gesunden Individuen gemacht wurden. Zur Beurteilung dieser Rekombinationen musste der Heterozygotenstatus bestimmt werden. Bereits G. Jean berichtet bei den Interpretationen seiner Untersuchungsergebnisse über Unsicherheiten bei der Bestimmung des Heterozygotenstatus und nutzte die Informationen der Heterozygotenbestimmung nur mit einem „at risk error“ von 1,5%. Weiter ist zu beachten, dass der geringe genetische Abstand zwischen den flankierenden Loci nicht zwangsläufig mit einem ähnlich kurzem physikalischen Abstand einhergehen muss. Allerdings konnte unsere Arbeitsgruppe mit der hier dargestellten Eingrenzung einen YAC - Klon identifizieren, der die gesamte kritische Region und damit das gesuchte Erkrankungsgen enthält (Peters et al. 1997).

4.4. Die Arbeit im wissenschaftlichen Kontext

Nach dem Auffinden und Eingrenzen eines Locus ging es um die Isolierung eines Gens, dessen Defekt der Erkrankung der Cystinose zugrunde liegt. Wie bereits erwähnt, ist das geringe kritische Areal von 1 cM (Jean et al. 1996) nicht unbedingt mit einem ähnlich kurzen physikalischen Abstand einhergehend.

Die systematische Vorgehensweise folgender Arbeiten bestand nun in der Etablierung eines kontinuierlichen Arrays von YAC - Klonen der eingegrenzten Region (Mc Dowell 1996, Peters et al. 1996), der physikalischen Kartierung der

Kandidatenregion, der Isolierung möglicher Gene, der Charakterisierung dieser und der Suche nach Mutationen innerhalb dieser Gene bei an Cystinose erkrankten Personen.

Die schließlich gelungene Identifizierung eines Erkrankungsgens durch die britische Arbeitsgruppe um M. Town (1998) beruhte allerdings auf der Beobachtung, dass bei der Typisierung des Markers AFM023 fg5 (zugehöriger Locus D17 S829) betroffene Probanden ein Null-Allel zeigten. Dieser Befund wurde als Hinweis auf eine Deletion gewertet, wie genaue Analysen schliesslich bestätigten und die Identifizierung des Cystinosegens erlaubten. Zufällig befindet sich der Marker auf einem Intron innerhalb des Cystinosegens. Bei einigen der untersuchten Stammbäume fehlte aufgrund einer Deletion das komplette Intron mit angrenzenden wichtigen codierenden Sequenzen. Dieser Umstand beschleunigte die Suche nach dem verantwortlichen Gen und bestätigte die Lage des Gens zwischen den Loci D17 S1798 und D17 S1828. Zur heutigen Zeit sind sowohl der molekulare Aufbau des Gens (Forestier et al. 1999; Anikster et al. 1999; Touchmann et al. 2000), die Struktur des Proteins und der verschiedenen möglichen Mutationen (Anikster, Shotelersuk, Gahl 1999; Attard et al. 1999, Thone et al. 1999, Kiehntopf et al. 2001, Kiehntopf et al. 2002) bekannt.

Das Auffinden und die Clonierung des für die Cystinose verantwortlichen Gens sowie die anschließende Sequenzierung und Entschlüsselung des dazugehörigen Proteins (Town et al. 1998) haben nach und nach dazu geführt, dass sich das Wissen über die Erkrankung und ihre Pathophysiologie deutlich vergrößert hat. Heute weiß man, dass es sich bei dem fehlerhaften Proteintranskript „Cytosin“ um ein Membranprotein handelt, das aus 367 Aminosäuren besteht, sieben transmembranäre Domänen aufweist und ein stark glykolysiertes lysosomales Ende besitzt. Das Membranprotein ermöglicht einen Co - Transport zwischen L - Cystin und Protonen (Kalatzis et al. 2001). Veränderungen des Membranpotentials sowie des pH's haben eine Auswirkung auf die Aktivität des Moleküls (Smith et al. 2003). Die intrazelluläre Lokalisation dieses Proteins innerhalb der lysosomalen Membran ist bewiesen. Darüber hinaus konnte ein neues Proteinzielmotiv für den intrazellulären Transport zu den Lysosomen identifiziert werden (Cherqui et al. 2001). Auch konnten nach der Entdeckung und Charakterisierung des Gens im-

mer mehr Mutationen beschrieben und charakterisiert werden (Kleta et al. 2001, Kiehntopf et al. 2001, Rupar et al. 2001, Kiehntopf et al. 2002, Kalatzis et al. 2002).

Die hier vorgestellte Arbeit mit dem Ziel der Kartierung eines Locus für das Cystinose - Gen war somit ein wesentlicher Schritt zur Identifizierung des gesuchten Gens. Mit den hier untersuchten Stammbäumen konnte die Region, auf der sich das gesuchte Gen befindet, deutlich eingeschränkt werden. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, das kritische Areal von 4 cM (Eingrenzung durch die amerikanische Arbeitsgruppe) auf 2,6 cM einzugrenzen. Damit konnte auf dem Weg der Identifizierung des Erkrankungsgens ein wesentlicher Beitrag geleistet werden.

Aufgrund der Erkenntnisse über das verantwortliche Gen ist es heute möglich, die Diagnose der Erkrankung unabhängig von der intrazellulären Cystinkonzentration zu stellen. In einer Familie mit einem betroffenen Kind, welche nicht in die Berechnung einbezogen wurde, kam es zu einer Schwangerschaft. Im Rahmen der pränatalen Diagnostik wurde unserer Arbeitsgruppe Zellmaterial aus einer Chorionzottenbiopsie zur Verfügung gestellt. Die Diagnostik wurde mit den zur Verfügung stehenden biochemischen Methoden (direkte Cystinbestimmung in Chorionzotten (Smith et al. 1987), Cystinbestimmung in angezüchteten Chorionzottenzellen (Patrick et al. 1987) und Bestimmung der Aufnahme von markiertem Cystin in angezüchteten Chorionzottenzellen durch Hochspannungselektrophorese) sowie erstmals mit der indirekten Genanalyse basierend auf der Kopplung des Cystinosegens an Mikrosatelliten - Marker durchgeführt (Daten nicht veröffentlicht). Der Fetus wurde mit allen Untersuchungsmethoden als betroffen diagnostiziert, die Schwangerschaft wurde nach genetischer Beratung abgebrochen. Die Validität einer genetischen Diagnostik ist damit etabliert.

Die molekulargenetische Diagnostik kann heute allgemein eingesetzt werden. Sie bringt in der pränatalen Diagnostik sicherlich viele Vorteile. Biochemische Untersuchungsmethoden wie die Untersuchung der kindlichen Zellen mit einem Aminosäureanalysegerät, der Puls - Labeling - Methode (Schulmann et al. 1970) oder der proteingebundenen Untersuchungsmethode (Oshima et al. 1974), die sich der Aminosäuregehaltsbestimmung kindlicher Zellen widmen, benötigen größere Mengen Untersuchungsmaterial. Darüber hinaus können Faktoren wie die

Cystinkonzentration oder die Zusammensetzung des Nährmediums Veränderungen des Ergebnisses herbeiführen (Thoene, Lemons 1980). Eine neue Untersuchungsmethode auf Grund einer molekularen Diagnostik wie sie von Forestier (1999) Anikster (1999) oder Bendavid (2004) beschrieben wird, dürfte diese Nachteile der bekannten diagnostischen Verfahren ausräumen. Es wird weniger Material benötigt, ein Ergebnis kann in kürzerer Zeit geliefert werden und bei bekannter familiärer Deletionsmutation kann die Validität des Untersuchungsergebnisses gesteigert werden.

Ob die postnatale Diagnosestellung durch die neuen Erkenntnisse beeinflusst wird muss abgewartet werden. Auch wenn die Deletion eines 57kb großen Areals als häufigste Mutation betrachtet wird (Mason et al. 2003, Kiehntopf et al. 2002, Anikster et al. 1999), so zeigt die Erkrankung doch eine so starke allelische Heterogenität, dass eine genetische Diagnosestellung bei unbekanntem Mutationen schwierig erscheint. Auch wenn sich inzwischen die Hinweise mehren, dass der Funktionsverlust des lysosomalen Membrancarriers ursächlich für das Krankheitsbild zu sein scheint (Kalatzis et al. 2004), so ist doch bis zum jetzigen Zeitpunkt unklar, wie z.B. milde Mutationen in dieses Bild passen (Anikster et al. 2000). Die genetische Heterogenität und die mangelnde Korrelation zwischen dem Genotyp und dem Phänotyp werden der molekulargenetischen Diagnostik dieser Erkrankung bei unbekanntem Mutationen noch große Schwierigkeiten bereiten.

Ob es sich lohnt, ein Screeningverfahren für diese Erbkrankheit einzuführen, ist bei der geringen Inzidenz von 1 bis 2 auf 100 000 sicherlich fraglich. Erbkrankheiten, die aktuell in Deutschland einem Screening unterliegen, sind die Phenylketonurie mit einer Inzidenz von 1 : 8000 und die Hypothyreose mit einer Inzidenz von 1 : 4000. Hinzu kommt, daß die Materialgewinnung weiterhin invasiv bleibt, damit ein gewisses Risiko nicht ausgeschlossen werden kann und die frühzeitige Diagnosestellung zum jetzigen Zeitpunkt keine therapeutische Konsequenz hat.

Mit der Entdeckung und Charakterisierung des Proteins „Cytosin“ lassen sich viele Fragen beantworten. Es bleiben jedoch immer noch einige Fragen ungeklärt. Nicht alle klinischen Zeichen der Erkrankung können bisher pathophyso-

logisch begründet werden. Es ist noch nicht klar, wie die intralysosomale Cystinanreicherung die Zellen schädigt, ob die auftretende Tubulopathie direkt mit der Cystinanreicherung zu erklären ist oder ob steigende Cystinkonzentrationen die Zellapoptose (Park, Helip - Wooley, Thoene 2002) beeinflussen. Auch ist noch nicht geklärt, welche Rolle in diesem Zusammenhang andere Gene spielen, die bei einer Mutation an diesem Locus mitbetroffen sind (Phornphutkul et al. 2001) beziehungsweise wie der Genotyp mit der Schwere des Phänotyps korreliert werden kann (Anikster et al. 2000).

Die bisherigen Erkenntnisse über die Pathophysiologie der Erkrankung sind damit der Grundlagenforschung zuzuordnen. Wahrscheinlich ist, dass mit dem bisher erreichten Kenntnisstand und den heute vorliegenden Techniken auch weitere Fragen in absehbarer Zeit beantwortet werden können. Vielleicht werden aufgrund neuer gentechnischer Methoden schon bald neue Möglichkeiten einer Therapie zur Verfügung stehen (Eto, Ohasi 2000).

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen an 22 Stammbäumen zur Kartierung des Cystinose-Gens durchgeführt. Bei einer kumulativen Betrachtung standen damit 32 klinisch gesunde und 28 an Cystinose erkrankte Nachkommen zur Verfügung. Zur Lokalisation des Gens wurde nach dem Prinzip der Positionsklonierung gearbeitet. Als genetische Marker dienten Mikrosatelliten-Sequenzen, deren Lage zueinander bekannt waren. Mit Hilfe der Marker wurde die Segregation der Chromosomen verfolgt. Mittels mathematischer Programme wurde anschließend die Wahrscheinlichkeit berechnet, mit der das gesuchte Gen mit einem der Marker gekoppelt ist, bzw. mit der das gesuchte Gen auf diesem Chromosomenabschnitt liegt. Folgende Ergebnisse wurden im Einzelnen erzielt:

1. Eine Kopplung des gesuchten Gens konnte für 60% des Genoms mathematisch ausgeschlossen werden. Die errechneten „Lod-Scores“ ergaben Zahlenwerte unter -2. Ein signifikanter Ausschluss kann damit für diese Areale sicher angenommen werden.

2. Es konnten Kandidatenregionen auf den Chromosomen 5, 11 und 17 identifiziert werden. Bei der genaueren Untersuchung der Kandidatenregionen auf den Chromosomen 5 und 11 erschien eine Kopplung immer unwahrscheinlicher.

3. Eine Kopplung des Gens mit der Kandidatenregion 17p13 konnte mathematisch bewiesen werden. Die Berechnungen ergaben einen maximalen Wert von 4,41 für die Kopplung mit dem Locus D17 S1584 (zugehöriger Mikrosatelliten-Marker AFMa 061za9). Das errechnete Areal hatte eine Größe von 7 cM, es wurde telomer vom Locus D17 S1583 und centromer vom Locus D17 S796 begrenzt.

3. Durch günstig liegende Rekombinationsereignisse der Familien MS 200, MS 131 und MS 96 konnte die mathematisch errechnete Region auf ein 2,6 cM umfassendes Areal eingegrenzt werden. Das eingegrenzte Areal wurde

telomer vom Locus D17 S1583 und centromer vom Locus D17 S1828 begrenzt.

4. Auf Grund der Cystingehaltsbestimmung der PMNL der Familie MS 96 konnten die klinisch unauffälligen Nachkommen in heterozygote Träger und homozygot gesunde Individuen eingeteilt werden.

1. Anderson, H.C., Markello, T., Schneider, J.A., and Gahl, W.A., "Effect of growth hormone treatment on serum creatinine concentration in patients with cystinosis and chronic renal disease," *J.Pediatr.*, Vol. 120, No. 5, **1992**, pp.716 - 720
2. Andrews, P.A., Sacks, S.H. and van't Hoff, W., "Successful pregnancy in cystinosis," *JAMA*, Vol. 272, No. 17, **1994**, pp. 1327 - 1328
3. Anikster, Y., Lucero, C., Touchmann, J. W., Huizing, M., McDowell, G., Shotelersuk, V., Green, E. D. and Gahl, W. A., "Identification and detection of the common 65-kb deletion breakpoint in the nephropathic cystinosis gene (CTNS)," *Mol. Genet. Metab.*, Vol. 66, No. 2, **1999**, pp. 111 - 116
4. Anikster, Y., Shotelersuk, V. and Gahl, W. A., "CTNS mutations in patients with cystinosis," *Hum. Mutat.*, Vol.47, No. 1, **2000**, pp. 17 - 23
5. Anikster, Y., Lucero, C., Guo, J., Huizing, M., Shotelersuk, V., Bernardine, I., McDowell, G., Iwata, G., Kaiser-Kupfer, M. I., Jaffe, R., Thoene, J., Schneider, J.A. and Gahl, W. A., "Ocular nonnephropathic cystinosis: Clinical, biochemical, and molecular correlations," *Pediatr. Res.*, Vol. 47, No. 1, **2000**, pp. 17 - 23
6. Attard, M., Jean, G., Forestier, L., Cherqui, S., van't Hoff, W., Broyer, M., Antignac, C. and Town, M., "Severity of phenotype in cystinosis varies with mutations in the CTNS gene: predicted effect on the model of cystinosis," *Hum. Mol. Genet.*, Vol. 8, No. 13, **1999**, pp. 2507 - 2514
7. Bendavid, C., Kleta, R., Long, R., Ouspenskaia, M., Muenke, M., Haddad, B.R. and Gahl, W.A., "FISH diagnosis of the common 57-kb deletion in CTNS causing cystinosis," *Hum. Genet.*, **2004**
8. Bernardini, I., Rizzo, W. B., Dalakas, M., Bernar, J. and Gahl, W. A., "Plasma and muscle free carnitine deficiency due to renal Fanconi syndrom," *J. Clin. Invest*, Vol. 75, No. 4, **1985**, pp. 1124 - 1130

9. Bois, E., Feingold, J., Frenay, P. and Briard, M., „Infantile cystinosis in France: genetics, incidence, geographic distribution“, *J. Med. Genet.*, Vol. 13, No. 6, **1976**, pp. 434 - 438
10. Boman, H. and Schneider, J.A., „Prenatal diagnosis of nephropathic cystinosis. Pregnancy at risk ascertained through heterozygote diagnosis of parents“, *Acta paediatr. Scand.*, Vol. 70, No. 3, **1981**, pp. 389 - 393
11. Botstein, D., „Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms“, *Am. J. Hum. Genet.*, Vol. 32, **1980**, pp. 314 - 331
12. Broyer, M., Guillot, M., Gubler, M.C. and Habib, R., „Infantile cystinosis: a reappraisal of early and late symptoms“, *Advances in Nephrology/Necker Hosp.*, Vol. 10, **1981**, pp. 137 - 166
13. Broyer, M., Tete, M.J., Guset, G., Bertheleme, J.P., Labrousse, F. and Poisson, M., „Clinical polymorphism of cystinosis encephalopathy. Results of treatment with cystamine“, *J. Inherit. Metab Dis.*, Vol. 19, No. 1, **1996**, pp. 65 - 75
14. Charnas, L.R., Luciano, C.A., Dalakas, M., Gilliatt, R.W., Bernardini, I., Ishak, K., Cwik, V.A., Fraker, D., Brushart, T.A. and Gahl, W.A., „Distal vacular myopathy in nephropathic cystinosis“, *Ann. neurol.*, Vol. 35, No. 2, **1994**, pp. 181 - 188
15. Cherqui, S., Kalatzis, V., Trugnan, G. and Antignac, C., „The targetting of cystinosin to the lysosomal membrane requires a tyrosine-based signal and a novel sorting motif“, *J. Biol. Chem.*, Vol. 276, No. 16, **2001**, pp. 13314 - 13321
16. Donis-Keller, H., Green, P., Helms, C., Cartinhour, S., Weiffenbach, B., Stephens, K., Keith, T.P., Bowden, D.W., Smith, D.R. and Lander, E.S., „A genetic linkage map of the human genome“, *Cell*, Vol. 51, No. 2, **1987**, pp. 319 - 337

17. Eto, Y. and Ohaschi, T., „Gene therapy/cell therapy for lysosomal storage disease“, *J. Inherit. Metab. Dis.*, Vol. 23, No. 3, **2000**, pp. 293 - 298
18. Feist, D., Lutz, H.P. and Schmidt, H., „(Therapy of cystinosis using a synthetic diet)“, *Monatsschr. Kinderheilkd.*, Vol. 119, No. 7, **1971**, pp. 431 - 433
19. Fivusch, B., Green, O.C., Porter, C.C., Balfe, J.W., O'Reagan, S. and Gahl, W.A., „Pancreatic endocrine insufficiency in posttransplant cystinosis“, *Am. J. Dis. Child.*, Vol. 141, No. 10, **1987**, pp. 1087 - 1089
20. Forestier, L., Jean, G., Attard, M., Cherqui, S., Lewis, C., van't Hoff, W., Broyer, M., Town, M. and Antignac, C., „Molecular characterization of CTNS deletions in nephropathic cystinosis: development of a PCR-based detection assay“, *Am. J. Hum. Genet.*, Vol. 65, No. 2, **1999**, pp. 353 - 359
21. Gahl, W.A., Tietze, G., Bashan, N., Bernardini, I., Raiford, D. and Schulman, J.D., „Characteristics of cystine counter-transport in normal and cystinotic lysosome-rich leucocyte granular fractions.“, *J. Biochem.*, Vol. 216, **1983**, pp. 393
22. Gahl, W.A., „Cystinosis coming of age“, *Adv. Pediatr.*, Vol. 33, **1986**, pp. 95 - 126
23. Gahl, W.A. and Kaiser-Kupfer, M.I., „Complications of nephropathic cystinosis after renal failure“, *Pediatr. Nephrol.*, Vol. 1, No. 3, **1987**, 260 - 268
24. Gahl, W.A., Reed, G.F., Thoene, J. G., Schulman, J. D., Rizzo, W. B., Jonas, A.J., Denman, D.W., Schlesselmann, J.J., Corden, B.J. and Schneider, J.A., „Cysteamine therapy for children with nephropathic cystinosis“, *N. Engl. J. Med.*, Vol. 316, No. 16, **1987**, pp. 971 - 977

25. Gahl, W.A., Thoene, J.G., Schneider, J.A., O'Regan, S., Kaiser-Kupfer, M.I. and Kuwabara, T., „NIH conference. Cystinosis: progress in a prototypic disease“, *Ann. Intern. Med.*, Vol. 109, No. 7, **1988 a**, pp. 557 - 569
26. Gahl, W.A., Bernardini, I., Dalakas, M., Rizzo, W.B., Harper, G.S., Hoeg, J.M., Hurko, O. and Bernar, J., „Oral carnitine therapy in children with cystinosis and renal Fanconi syndrome“, *J. Clin. Invest.*, Vol. 81, No. 2, **1988 b**, pp. 549 - 560
27. Gahl, W.A., Thoene, J.G. and Schneider, J.A., „Cystinosis“, *N. Engl. J. Med.*, Vol. 347, No. 2, **2002**, pp. 111- 121
28. Galhardo, F.R., de Mello, V.R., Martini, F. D., Mecelis, L.R., Len, D.O. and Toporovski, J., „(Cystinosis in childhood. Report of 3 cases)“, *AMB. Rev. Assoc. Med. Bras.*, Vol. 29, No. 5 - 6, **1983**, pp. 106 - 108
29. Gera, D., Mehta, M.J. and Shah, B.M., „Cystinosis“, *Indian Pediatr.*, Vol. 22, No. 7, **1985**, pp. 535 - 537
30. Gretz, N., Manz, F., Augustin, R., Barrat, T.M., Bender-Gotze, C., Brandis, M., Bremer, H.J., Brodehl, J., Broyer, M., Bulla, M., Callis, L., Chantler, C., Diekmann, L., Dillon, M.J., Egli, F., Ehrich, J.H., Enders, W., Fanconi, A., Feldhoff, C., Geisert, J., Gekle, D., Gescholl-Bauer, B., Grote, K., Gruttner, R., Hagge, W., Haycock, C.B., Hennemann, H., Klare, B., Leupold, D., Lohr, H., Michalk, D., Oliveira, A., Ott, F., Pistor, K., Rau, J., Scharer, K., Schindera, F., Schmidt, H., Schulte-Wissmann, H., Verrier-Jones, K., Weber, H.P., Willenbockel, U. and Wolf, H., „Survival time in cystinosis. A collaborative study“, *Proc. Eur. Dial. Transplant. Assoc.*, Vol. 19, **1983**, pp. 582 - 589
31. Gyapay, G., Morssette, J., Vignal, A., Dib, C., Fizames, C., Millaseau, P., Marc, S., Bernardi, G., Lathrop, M. and Weissenbach, J., „The 1993 - 94 Genethon human genetic linkage map.“, *Nature Genetics*, Vol. 7, **1992**, pp. 246 - 249

32. Harms, E., Gochman, N. and Schneider, J.A., „Lysosomal pool of free-amino acids“, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 99, No. 3, **1981**, pp. 830 - 836
33. Haycock, G.B., Al Dahhan, J., Mak, R.H. and Chantler, C., „Effect of indomethacin on clinical progress and renal function in cystinosis“, *Arch. Dis. Child.*, Vol. 57, No. 12, **1982**, pp. 934 - 939
34. Hutchesson, A.C., Bunday, S., Preece, M.A., Halls, S.K. and Green, A., „A comparison of disease and gene frequencies of inborn errors of metabolism among different ethnic groups in the West Midlands, UK“, *J. Med. Genet.*, Vol. 35, No. 5, **1998**, pp. 366 - 370
35. Iancu, T.C., Lerner, A. and Shiloh, H., „Intestinal mucosa in nephropathic cystinosis“, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, Vol. 6, No.3, **1987**, pp 359 - 364
36. Jean, G., Fuchshuber, A., Town, M. M., Gribouval, O., Scheider, J.A., Broyer, M., van't Hoff, W., Niaudet, P. and Antignac, C., „High-resolution mapping of the gene for cystinosis, using combined biochemical and linkage analysis“, *Am. J. Med.*, Vol. 83, No. 5, **1987**, pp. 775 - 779
37. Jonas, A.J., Conley, S.B., Marshall, R., Johnson, R.A., Marks, M. and Rosenberg, H., „Nephropathic cystinosis with central nervous system involvement“, *Am. J. Med.*, Vol. 83, No. 5, **1987**, pp. 966 - 970
38. Kaiser-Kupfer, M.I., Caruso, R.C., Minkler, D.S. and Gahl, W.A., „Long-term ocular manifestations in nephropathic cystinosis“, *Arch. Ophthalmol.*, Vol. 104, No. 5, **1986**, pp. 706 - 711
39. Kaiser-Kupfer, M.I., Fujikawa, L., Kuwabara, T., Jain, S. and Gahl, W.A., „Removal of corneal crystals by topical cysteamine in nephropathic cystinosis“, *N. Engl. J. Med.*, Vol. 316, No. 13, **1987**, pp 775 - 779

40. Kaiser-Kupfer, M.I., Datiles, M.B. and Gahl, W.A., „Corneal transplant in boy with nephropathic cystinosis“, *Lancet*, Vol. 1, No. 8528, **1987**, pp. 331
41. Kalatzis, V., Cherqui, S., Antignac, C. and Gasnier, B., „Cystinosin, the protein defective in cystinosis, is a H(+)-driven lysosomal cystine transporter“, *EMBO J.*, Vol. 20, No. 21, **2001**, pp. 5940 - 5949
42. Kalatzis, V., Cohen-Solal, L., Cordier, B., Frishberg, Y., Kemper, M., Nuutinen, E.M., Legrand, E., Cochat, P. and Antignac, C., „Identification of 14 novel CTNS mutations and characterization of seven splice site mutations associated with cystinosis“, *Hum. Mutat.*, Vol. 20, No. 6, **2002**, pp. 439 - 446
43. Kalatzis, V., Nevo, N., Cherqui, S., Gasnier, B. and Antignac, C., „Molecular pathogenesis of cystinosis: effect of CTNS mutations on the transport activity and subcellular localization of cystinosin“, *Hum. Mol. Genet.*, Vol. 13, No.13, **2004**, pp. 1361 - 1371
44. Kiehntopf, M., Coskun, T., Ozen, S., Koch, H.G, Deufel, T. and Harms, E., „Cystinosin(CTNS)mutations in the turkisch population: absence of the 57-kb deletion further corroborates its origin from northern Europe.“ *Jahrestagung 2001 der Deutschen Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin und der Deutschen Gesellschaft für klinische Chemie*, Rostock 16.09.-19.09.-2001. *Clin Chem Lab Med*, **2001**, 39(9) : A47
45. Kiehntopf, M., Schickel, J., Gonne, B., Koch, H.G, Superti-Furga, A., Steinmann, B., Deufel, T. and Harms, E., „Analysis of the CTNS gene in patients of German and Swiss origin with nephropathic cystinosis“, *Hum. mutat.*, Vol. 20, No. 3, **2002**, pp. 237
46. Kimonis, V.E., Troendle, J., Rose, S.R., Yang, M.L., Markello, T.C. and Gahl, W.A., „Effects of early cysteamine therapy on thyroid function and growth in nephropathic cystinosis“, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, Vol. 80, No. 11, **1995**, pp. 3257 - 3261

47. Kleta, R., Anikster, Y., Lucero, C., Shotelersuk, V., Huizing, M., Bernardini, I., Park, M., Thoene, J., Scheider, J. and Gahl, W.A., „CTNS mutations in African American patients with cystinosis“, *Mol. Genet. Metab.*, Vol. 74, No.3, **2001**, pp. 332 - 337
48. Kroll, W.A., Becker, F.L. and Schneider, J.A., „Measurement of intracellular amino acids in cultured skin fibroblasts. The effect of storage on cystine recovery and evaluation of three methods of cell preparation.“, *Biochem. Med.*, Vol. 10, No. 4, **1974**, pp. 368 - 373
49. Lathrop, G.M. and Lalouel, J.M., „Easy calculations of lod scores and genetic risks on small computers“, *Am. J. Hum. Genet.*, Vol. 36, No. 2, **1984**, pp. 460 - 465
50. Lee, P.L., „Single-column system for accelerated amino acid analysis of physiological fluids using five lithium buffers“, *Biochem. Med.*, Vol. 10, No.2, **1974**, pp. 107 - 121
51. Lubec, G., Nauer, G. and Pollak, A., „Non-invasive diagnosis of cystinosis by infra-red spectroscopy of hair“, *Lancet*, Vol. 2, No. 8350, **1983**, pp. 623
52. Maniatis, T., Sambrook, J. and Fritsch, E.F., „Molecular cloning: A laboratory manual. Second edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York. **1989**
53. Manz, F. and Gretz, N., „Cystinosis in the Federal Republic of Germany. Coordination and analysis of the data“, *J. Inherit. Metab. Dis.*, Vol. 8, No. 1, **1985**, pp. 2-4
54. Mason, S., Pepe, G., Dall'Amico, R., Tartaglia, S., Casciani, S., Greco, M., Bencivenga, P., Murer, L., Rizzoni, G., Tenconi, R. and Clementi, M., „Mutational spectrum of the CTNS gene in Italy“, *Eur. J. Hum. Genet.*, Vol. 11, No. 7, **2003**, pp. 503 - 508

-
55. McDowell, G., Isogai, T., Tanigami, A., Hazelwood, S., Ledbetter, D., Polymeropoulos, M.H., Lichter-Konecki, U., Konecki, D., Town, M.M., Van't Hoff, W.V., Weissenbach, J. and Gahl, W.A., „Fine mapping of the cystinosis gene using an integrated genetic and physical map of a region within human chromosome band 17p13“, *Biochem. Mol. Med.*, Vol. 58, No. 2, **1996**, pp. 135 - 141
56. Mc Kusick, V.A., „Current trends in mapping human genes“, *FASEB J*, Vol. 5, No. 1, **1991**, pp. 12 - 20
57. NIH/CEPH Collaborative Mapping Group, „A comprehensive genetic linkage map of the human genome.“, *Science*, Vol. 258, No. 5079, **1992**, pp. 67 - 86
58. Oshima, R.G., Willis, R.C., Furlong, C.E. and Schneider, J.A., „Binding assays for amino acids. The utilization of a cystine binding protein from *Escherichia coli* for the determination of acid-soluble cystine in small physiological samples“, *J. Biol. Chem.*, Vol. 249, No. 19, **1974**, pp. 6033 - 6039
59. Ott, J. and Rabinowitz, D., „The effect of marker heterozygosity on the power to detect linkage disequilibrium“, *Genetics*, Vol. 147, No. 2, **1997**, pp. 927 - 930
60. Park, M., Helip-Wooley, A. and Thoene, J., „Lysosomal cystine storage augments apoptosis in cultured human fibroblasts and renal tubular epithelial cells“, *J. Am. Soc. Nephrol.*, Vol. 13, No. 12, **2002**, pp. 2878 - 2887
61. Patrick, A.D., Young, E.P., Mossman, J., Warren, R., Kearney, L. and Rodeck, C.H., „First trimester diagnosis of cystinosis using intact chorionic villi“, *Prenat. Diagn.*, Vol. 7, No. 2, **1987**, pp. 71 - 74

-
62. Peters, U., Senger, G., Raehlmann, M., Du Chesne, I., Stec, I., Kohler, M.R., Weissenbach, J., Leal, S.M., Koch, H.G., Deufel, T. and Harms, E., „Nephropathic cystinosis (CTNS-LSB): construction of a YAC contig comprising the refined critical region on chromosome 17p13“, *Eur. J. Hum. Genet.*, Vol. 5, No. 1, **1997**, pp. 9 - 14
63. Phornphutkul, C., Anikster, Y., Huizing, M., Braun, P., Brodie, C., Chou, J. Y. and Gahl, W.A., „The promoter of a lysosomal membrane transporter gene, CTNS, binds Sp-1, shares sequences with the promoter of an adjacent gene, CARKL, and causes cystinosis if mutated in a critical region“, *Am. J. Hum. Genet.*, Vol. 69, No. 4, **2001**, pp. 712 - 721
64. Rupar, C.A., Matsell, D., Surry S. and Siu, V., „A G339R mutation in the CTNS gene is a common cause of nephropathic cystinosis in the south western Ontario Amish Mennonite population“, *J. Med. Genet.*, Vol. 38, No. 9, **2001**, pp. 615 - 616
65. Schierbeek, H., Bijsterveld, K., Chapman, T.E., van Luijk, W.H., Reijngoud, D.J. and Berger, R., „Stable isotope dilution analysis of cystine in granulocyte suspensions as cysteine: a powerful method for the diagnosis, the follow-up, and treatment of patients with cystinosis“, *Clin. Chim. Acta.*, Vol. 191, No. 1-2, **1990**, pp. 39 - 47
66. Schnaper, H.W., Cattel, J., Merrill, S., Marcusson, E., Kissane, J.M., Shackelford, G.D., So, S.K., Nelson, R.D., Cole, B.R. and Smith, M.L., „Early occurrence of end-stage renal disease in a patient with infantile nephropathic cystinosis“, *J. Pediatr.*, Vol. 120, No.4 Pt 1, **1992**, pp.575 - 578
67. Schneider, J.A., Bradley, K. and Seegmiller, J.E., „Increased cystine in leukocytes from individuals homozygous and heterozygous for cystinosis“, *Science*, Vol. 157, No. 794, **1967**, pp. 1321 - 1322

-
68. Schneider, J.A., Wong, V. and Seegmiller, J.E., „The early diagnosis of cystinosis“, *J. Pediatr.*, Vol. 74, No. 1, **1969**, pp. 114 - 116
69. Schulman, J.D., Fujimoto, W.Y., Bradley, K.H. and Seegmiller, J.E., „Identification of heterozygous genotype for cystinosis in utero by a new pulse-labeling technique: preliminary report“, *J. Pediatr.*, Vol. 77, No. 3, **1970**, pp. 468 - 470
70. Seegmiller, J.E., Friedmann, T., Harrison, H.E., Wong, V. and Schneider, J.A., „Cystinosis. Combined clinical staff conference at the National Institutes of Health“, *Ann. Intern. Med.*, Vol. 68, No. 4, **1968**, pp. 883 - 905
71. Smith, M.L., Pellett, O.L., Cass, M.M., Kennaway, N.G., Buist, N.R., Buckmaster, J., Golbus, M., Spear, G.S. and Schneider, J.A., „Prenatal diagnosis of cystinosis utilizing chorionic villus sampling“, *Prenat. Diagn.*, Vol. 7, No. 1, **1987**, pp. 23 - 26
72. Smith, M.L., Green, A., Potashnik, R., Mandoza, S.A. and Schneider, J.A., „Lysosomal cystine transport. Effect of intralysosomal pH and membrane potential“, *J. Biol. Chem.*, Vol. 228, **2003**, pp. 1244
73. Smolin, L.A., Clark, K.F. and Schneider, J.A., „An improved method for heterozygote detection of cystinosis, using polymorphonuclear leukocytes“, *Am. J. Hum. Genet.*, Vol. 41, No. 2, **1987**, pp. 266 - 275
74. Sochett, E., Pettifor, J.M., Milner, L., Thomson, P.D. and Berkowitz, F., „Nephropathic cystinosis in black children. Case reports“, *S. Afr. Med. J.*, Vol. 65, No. 10, **1984**, pp. 397 - 398
75. Steinherz, R., Chesney, R.W., Schulman, J.D., DeLuca, H.F. and Phelps, M., „Circulating vitamin D metabolites in nephropathic cystinosis“, *J. Pediatr.*, Vol. 102, No. 4, **1983**, pp. 592 - 594

-
76. Tautz, D., „Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences“, *EXS*, Vol. 67, **1993**, pp. 21 - 28
77. The Cystinosis Collaborative Research Group*, *two groups contributed equally to this work: McDowell, G, Gahl, W.A., Stephenson, L.A., Scheider, J.A., Weissenbach, J., Town, M.M., van't Hoff, W., Farrall, M., Mathew, G and Polymeropoulos, „Linkage of the gene for cystinosis to markers on the short arm of chromosome 17“, *Nat. Genet.*, Vol. 10, No. 2, **1995**, pp. 246 - 248
78. Theodoropoulos, D.S., Krasnewich, D., Kaiser-Kupfer, M.I. and Gahl, W.A., „Classic nephropathic cystinosis as an adult disease“, *JAMA*, Vol. 270, No. 18, **1993**, pp. 2200 - 2204
79. Thoene, J., Lemons, R., Anikster, Y., Mullet, J., Paelicke, K., Lucero, C., Gahl, W., Schneider, J., Shu, S.G. and Campbell, H.T., „Mutations of CTNS causing intermediate cystinosis“, *Mol. Genet, Metab.*, Vol. 67, No. 4, **1999**, pp. 283 - 293
80. Thoene, J.G, Oshima, R.G, Crawhall, J.C., Olson, D.L. and Schneider, J. A., „Cystinosis. Intracellular cystine depletion by aminothiols in vitro and in vivo“, *J. Clin. Invest.*, Vol. 58, No. 1, **1976**, pp. 180 - 189
81. Thoene, J.G, Oshima, R.G, Ritchie, D.G and Schneider, J.A., „Cystinotic fibroblasts accumulate cystine from intracellular protein degradation“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Vol. 74, No. 10, **1977**, pp. 4505 - 4507
82. Thoene, J.G and Lemons, R., „Modulation of the intracellular cystine content of cystinotic fibroblasts by extracellular albumin“, *Pediatr. Res.*, Vol. 14, No. 6, **1980**, pp. 785 - 787
83. Thoene, J.G and Lemons, R.M., „Cystine accumulation in cystinotic fibroblasts from free and protein- linked cystine but not Cysteine“, *Biochem. J.*, Vol. 208, No. 3, **1982**, pp. 823 - 830

-
84. Touchman, J.W., Anikster, Y., Dietrich, N.L., Maduro, V.V., McDowell, G., Shotelersuk, V., Bouffard, G.G., Beckstrom-Sternberg, S.M., Gahl, W.A. and Green, E.D., „The genomic region encompassing the nephropathic cystinosis gene (CTNS): complete sequencing of a 200-kb segment and discovery of a novel gene within the common cystinosis-causing deletion“, *Genome Res.*, Vol. 10, No. 2, **2000**, pp. 165 - 173
85. Town, M., Jean, G., Cherqui, S., Attard, M., Forestier, L., Whitmore, S.A., Callen, D.F., Gribouval, O., Broyer, M., Bates, G.P., van't Hoff, W. and Antignac, C., „A novel gene encoding an integral membrane protein is mutated in nephropathic cystinosis“. *Nat. Genet.*, Vol. 18, No. 4, **1998**, pp. 319 - 324
86. Tsilou, E.T., Rubin, B.I., Reed, G.F., Iwata, F., Gahl, W. and Kaiser-Kupfer, M.I., „Age-related prevalence of anterior segment complications in patients with infantile nephropathic cystinosis“, *Cornea*, Vol. 21, No. 2, **2002**, pp. 173 - 176
87. Vergnaud, G., Mariat, D., Apiou, F., Aurias, A., Lathrop, M. and Lauthier, V., „The use of synthetic tandem repeats to isolate new VNTR loci: cloning of a human hypermutable sequence“, *Genomics*, Vol. 11, No. 1, **1991**, pp. 135 - 144
88. Weber, J.L., „Informativeness of human (dC-dA)n.(dG-dT)n polymorphisms“, *Genomics*, Vol. 7, **1990**, pp. 524 - 530
89. Weber, J.L. and Wong, C., „Mutation of human short tandem repeats“, *Hum. Mol. Genet.*, Vol. 2, **1993**, pp. 1123 - 1128
90. Weissenbach, J., Gyapay, G., Dib, C., Vignal, A., Morissette, J., Millasseau, P., Vaysseix, G. and Lathrop, M., „A second-generation linkage map of the human genome“, *Nature*, Vol. 359, **1992**, pp. 794 - 801

91. Williams, B.L., Schneider, J.A. and Trauner, D.A., "Global intellectual deficits in cystinosis", *Am. J. Med. Genet.*, Vol. 49, No. 1, **1994**, pp. 83 - 87

92. Wong, V.G, Schulman, J.D. and Seegmiller, J.E., „Conjunctival biopsy for the biochemical diagnosis of cystinosis“, *Am. J. Ophthalmol.*, Vol. 70, No. 2, **1970**, pp. 278 - 281

7. Anhang

Ich danke der Kolaboration um J.F. Weissenbach für die zur Verfügungstellung weiterer unveröffentlichter Marker der Region 17p13. Die Sequenzen der zueinander passenden Oligonukleotidprimer lauten wie folgt:

D17 S1798

(Database ID: AFMa202 xf5, ebenfalls bekannt unter w5655 und a202xf5)

Oligonukleotidprimer: Links: CAGTGAAATGCAATGTGATG
Rechts: ATGCCCAGCCTGTGTTAG

Produktlänge: 258

D17 S1828

(Database ID: AFMb013zb1, ebenfalls bekannt unter b013zb1 und w3182)

Oligonukleotidprimer: Links: TGCACTCACAGATTTGCC
Rechts: TTAAGCCAGTTCGGATTTG

Produktlänge: 215

D17 S1810

(Database ID: AFMa282yd9, ebenfalls bekannt unter w5901 und a282yd9)

Oligonukleotidprimer: Links: TGTCCACTGTAACCCCTG
Rechts: CCTAGTGAGGGCATGAAAC

Produktlänge: 114

D17 S1832

(Database ID: AFMbo22wf9, ebenfalls bekannt unter w6209 und b022wf9)

Oligonukleotidprimer: Links: ACGCCTTGACATAGTTGC
Rechts: TGTGTGACTGTTCAGCCTC

Produktlänge: 185

D17 S1854

(DatabaseID: AFMb346yc5, ebenfalls bekannt unter w3275 und b346yc5)

Oligonukleotidprimer: Links: TTTGGGAGGTCACAGACATTC
Rechts: CCTTGCTCTTAGGATTTGAGGA

Produktlänge: 92

D17 S938

(Database ID:ARM263wh5, ebenfalls bekannt unter z23864 und 263wh5)

Oligonukleotidprimer: Links: CCGGATTGCTACACCTAAAT
Rechts: AACAGTCTCTNCTGGAGCAG

Produktlänge: 173

D17 S796

(Database ID: AFM177xh6, ebenfalls bekannt unter z16778 und 177xh6)

Oligonukleotidprimer: Links: CAATGGAACCAAATGTGGTC
Rechts: AGTCCGATAATGCCAGGATG

Produktlänge: 169

Danksagungen

Hern Prof. Dr. Deufel danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und die hilfreiche Unterstützung.

Für die sehr gute Zusammenarbeit und stete Unterstützung danke ich der ganzen Arbeitsgruppe, insbesondere bedanke ich mich bei Frau Dr. Preisler, Frau Dr. Wegener und Frau Dr. Peters.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für das beständige Interesse am Fortgang meiner Dissertation und für die grenzenlose Unterstützung in allen Belangen.

Private Daten

- Name: Michael Robert Rählmann
- Geburtsdatum: 01. November 1971
- Geburtsort: Ibbenbüren
- Eltern: Norbert Rählmann, geb. 01. Mai 1947
Marianne Rählmann, geb. Stürmeyer,
geb. 26. Mai 1950

Schulbesuch

- 1978 - 1982 Besuch der Grundschule in Mettingen
- 1982 - 1988 Besuch der Realschule in Mettingen
- 1988 - 1991 Besuch des Gymnasiums in Münster

Wehrersatzdienst

Tätig beim Deutschen Roten Kreuz „Kreisverband
Tecklenburger Land“ als Erste-Hilfe-Ausbilder

Studium

- 1992 -1998 Studium der Medizin in Münster (10 Fachsemester)
- Ärztliche Vorprüfung abgelegt am 14.09.1994
- 1. Staatsexamen abgelegt am 21.03.1996
- 2. Staatsexamen abgelegt am 25.03.1998
- 1998-1999 Studium der Medizin in Köln (2 Fachsemester)
- 3. Staatsexamen abgelegt am 18.05.1999

PJ - Tertiale

20.04.1998 – 09.08.1998 Allgemein,-/Unfallchirurgie/ Orthopädie
unter der Leitung von Dr. med. A. Glättli, Zieglerspital in Bern
(Schweiz)

17.08.1998 – 05.12.1998 Allgemeine Pädiatrie unter der Leitung von
Dr. med. A. Wiater, Krankenhaus Porz am Rhein in Köln

05.12.1998 – 31.03.1999 Innere Medizin (Rheumatologie/Kardiologie
sowie Diabetologie) unter der Leitung von Prof. Dr. med. V.
Hossmann, Krankenhaus Porz am Rhein in Köln

Arzt im Praktikum

01.08.1999 - 31.01.2001 Pädiatrie unter der Leitung von Dr. med. M.
Rey im Karolinen - Hospital , Arnsberg

Beschäftigung als Assistenzarzt

01.04.2001 - 31.03.2003 Anästhesie unter der Leitung von
Dr. med. M. Berghoff im St. Vincenz - Hospital , Menden
Seit dem 01.10.2003 Augenheilkunde unter der Leitung von
Prof. Dr. med. V. Seiberth im Marienhospital, Osnabrück

Mettingen, 23. Oktober 2006