

Aus dem  
CharitéCentrum 17 für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin mit Perinatalzentrum und Humangenetik  
Institut für Medizinische Genetik  
Direktor: Professor Dr. med. Stefan Mundlos

## **Habilitationsschrift**

# **Kopplungsanalysen zur Aufklärung monogener und komplexer Krankheiten**

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Humangenetik

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Dr. med. Katrin Hoffmann

<b>Eingereicht:</b>	<b>15. Dezember 2008</b>
<b>Dekan:</b>	<b>Prof. Dr. med. Annette Grüters-Kieslich</b>
<b>1. Gutachter:</b>	<b>Prof. Dr. med. Olaf Rieß</b>
<b>2. Gutachter:</b>	<b>Prof. Dr. rer. nat. Brigitte Royer-Pokora</b>

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGEN</b>	4
<b>1. EINLEITUNG</b>	5
1.1 Das Prinzip der Kopplung („Linkage“)	5
1.2 Modellbasierte (parametrische) Kopplungsanalysen	7
1.3 Homozygotie-Kartierung (Homozygosity Mapping) in konsanguinen Familien – Eine Sonderform parametrischer Kopplungsanalysen basierend auf Foundereffekten	8
1.4 Foundereffekt in geographisch oder kulturell abgegrenzten Bevölkerungen (Isolatpopulationen)	9
1.5 Modellfreie (nichtparametrische) Kopplungsanalysen	11
<b>2. EIGENE ARBEITEN</b>	14
2.1 <b>Bioinformatische Arbeiten <i>easyLINKAGE</i> und <i>easyLINKAGE-PLUS</i>: Ein Interface zur einfachen, effizienten und graphisch unterstützten Durchführung von Kopplungsanalysen</b>	14
 <i>easyLINKAGE</i> : Ein PERL-Script zur einfachen und automatisierten Durchführung von Two- und Multipoint Kopplungsanalysen Lindner TH, Hoffmann K. Bioinformatics 21: 405-407, 2005	
 <i>easyLINKAGE-Plus</i> – Automatisierte Kopplungsanalysen von Hochdurchsatz-SNP-Daten Hoffmann K, Lindner TH. Bioinformatics 21: 3565-3567, 2005	
2.2 <b>Genetische Aufklärung und Charakterisierung angeborener Kontraktursyndrome</b>	23
2.2.1 Das Escobar-Syndrom ist eine pränatale Myasthenie, die durch einen Defekt der fetal exprimierten $\gamma$ -Untereinheit des Acetylcholin-Rezeptors ausgelöst wird	23
Hoffmann K, Müller JS, Stricker S, Megarbane A, Rajab A, Lindner TH, Cohen M, Chouery E, Adaimy L, Ghanem I, Delague V, Boltshauser E, Talim B, Horvath R, Robinson PN, Lochmüller H, Hübner C, Mundlos S. Am J Hum Genet 79: 303-312, 2006	
2.2.2 Acetylcholin-Rezeptor-Pathway-Mutationen erklären verschiedene Ausprägungen fetaler Bewegungsstörungen (Fetal Akinesia Deformation Sequence Disorders)	35
Michalk A, Stricker S, Becker J, Rupps R, Pantzar T, Miertus J, Botta G, Naretto VG, Janetzki C, Yaqoob N, Ott C, Seelow D, Wieczorek D, Fiebig B, Wirth B, Hoopmann M, Walther M, Körber F, Blankenburg M, Mundlos S, Heller R, Hoffmann K. Am J Hum Genet 82: 464-476, 2008	
2.3 <b>Kopplungsanalyse mit Foundereffekt zur Aufklärung und Charakterisierung der Pelger-Huët'schen Kernanomalie</b>	50
2.3.1 Lamin B Rezeptor Mutationen führen zu einer gestörten Morphologie des Zellkerns in neutrophilen Granulozyten (Pelger-Huët Anomalie)	50
Hoffmann K, Dreger CK, Olins AL, Olins DE, Shultz LD, Lucke B, Karl H, Kaps R, Muller D, Vaya A, Aznar J, Ware RE, Sotelo Cruz N, Lindner TH, Herrmann H, Reis A, Sperling K. Nat Genet 31: 410-414, 2002	

2.3.2	Die Mutationen des Maus-Ichthyosis-Locus liegen im Lamin B Rezeptor-Gen und sind ein Modell für die Pelger-Anomalie des Menschen Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, Gott B, Samuels R, Schweitzer PA, Dreger C, Herrmann H, Kalscheuer V, Olins AL, Olins DE, Sperling K, Hoffmann K. Hum Mol Genet 12: 61-69, 2003	58
<b>2.4</b>	<b>Kopplungsanalysen bei komplexen Erkrankungen</b>	<b>68</b>
2.4.1	Ein neuer Locus für arterielle Hypertonie auf Chromosom 1p36 in den Sorben, einer slawischen Isolatpopulation in Deutschland, überlappt mit den Kopplungsbereichen anderer Unterformen des Metabolischen Syndroms Hoffmann K, Planitz C, Rüschemdorf F, Müller-Myhsok B, Stassen HH, Lucke B, Mattheisen M, Stumvoll M, Bochmann R, Zschornack M, Wienker TF, Nürnberg P, Reis A, Luft FC, Lindner TH. Im Druck.	70
2.4.2	Ein Genomscan in Deutschen Geschwisterpaaren mit Typ-2-Diabetes bestätigt eine für das Metabolische Syndrom prädisponierende Region auf Chromosom 1p36.13 sowie eine Typ-2-Diabetes-Region auf Chromosom 16p12.2 Hoffmann K, Mattheisen M, Dahm S, Nürnberg P, Roe C, Johnson J, Cox NJ, Wichmann HE, Wienker TF, Schulze J, Schwarz PE, Lindner TH. Diabetologia 50: 1418-1422, 2007	81
<b>3.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>88</b>
3.1	Erfolgreiche Auswertung verschiedener Kopplungsprojekte mit <i>easyLINKAGE</i>	88
3.2	Prognostisch und therapeutisch relevante Subklassifizierung von Acetylcholin-Rezeptor-assoziierten Kontraktursyndromen	89
3.3	Kopplungsanalysen zur Aufklärung der Pelger-Anomalie als Modell für Entwicklungsstörungen des Blutes, der Haut und des Skeletts	92
3.4	Kartierung von Hypertonie und Typ-2-Diabetes in eine für das Metabolische Syndrom relevante Region auf Chromosom 1p36	94
<b>4.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>96</b>
<b>5.</b>	<b>LITERATURANGABEN AUS DEM FREIEN TEXT</b>	<b>98</b>
	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>102</b>
	<b>ERKLÄRUNG</b>	<b>103</b>

## ABKÜRZUNGEN

AChR	Acetylcholin-Rezeptor
AFM	Affected Family Member
ASP	Affected Sib Pair
APM	Affected Pedigree Member
CMS	Congenitales Myasthenes Syndrom
FADS	Fetal Akinesia Deformation Sequence
HWE	Hardy Weinberg Equilibrium
IBD	Identical by descent
IBS	Identical by state
LBR	Lamin B Rezeptor
LD	Linkage Disequilibrium
LOD	Logarithm of the odds
PHA	Pelger-Huët-Anomalie
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
T2D	Typ-2-Diabetes

## 1. EINLEITUNG

### 1.1 Das Prinzip der Kopplung („Linkage“)

Genetisch (mit)bedingte Erkrankungen können durch Defekte in einem Gen (monogen) oder durch Veränderungen in mehreren Genen (polygen) ausgelöst werden. Krankheitsverursachende Mutationen oder Sequenzvarianten können im kodierenden Bereich eines Gens liegen (kodierend = kodieren Aminosäuren des Genproduktes), an Splice Sites (regulieren das Zusammenfügen der Exons) oder in regulativen Bereichen, die die Expression eines Gens beeinflussen (Promoter, Enhancer etc.). Zusätzlich zu den klassischen Genen, die Proteine kodieren, gibt es genomische Abschnitte, die exprimiert, aber nicht in Protein übersetzt werden. Diese erfüllen sehr oft wichtige biologische Funktionen oder beeinflussen die RNA-Stabilität anderer Gene (miRNA etc.).

Bei vielen Krankheiten sind weder die genetische Ursache noch der funktionelle Pathomechanismus bekannt. Zur Aufklärung können klinische, molekularbiologische und genetische Methoden eingesetzt werden, im Bereich der Genetik sind das u.a. Kopplungs- und Assoziationsstudien sowie die Generierung von Tiermodellen.

Was versteht man nun unter Kopplung bzw. Kopplungsanalysen? Als **Kopplung (Linkage)** bezeichnet man die gemeinsame Vererbung von eng benachbarten Regionen (Loci) auf einem Chromosom. Zwischen eng benachbarten Loci sind Rekombinationen durch *crossing over* seltener als zwischen entfernteren Loci. Somit ist die Rekombinationshäufigkeit ein Maß für den genetischen Abstand zwischen den beiden Loci. Die Einheit für den genetischen Abstand ist 1 Morgan (1 M = 1 Rekombination pro Meiose). Gebräuchlicher ist die Angabe in centiMorgan (cM), wobei dann 1 cM einer Rekombinationsrate von 1% / 1 Meiose entspricht.

---

**Die genetische Distanz zweier Loci bestimmt die Rekombinationshäufigkeit  $\Theta$  zwischen diesen Loci und damit die Wahrscheinlichkeit einer gekoppelten Vererbung**

*Abgesehen von Patienten mit numerischen Chromosomenstörungen hat jeder Mensch 46 Chromosomen: 22 autosomale Chromosomenpaare (1-22) sowie ein Geschlechtschromosomenpaar (XX bei einer Frau, XY bei einem Mann). Chromosomen eines Autosomenpaares werden als homolog bezeichnet. Von jedem Elternteil wird ein kompletter Chromosomensatz an ein Kind weitergegeben. In der elterlichen Meiose erfolgt dabei eine Reduktionsteilung von einem diploiden auf einen haploiden Chromosomensatz, wobei Rekombinationen zwischen homologen Chromosomen stattfinden. Liegen zwei Loci auf unterschiedlichen (nicht-homologen) Chromosomen, so werden sie unabhängig voneinander, d.h. nicht gekoppelt, vererbt.*

*Betrachten wir Locus 1.1 auf Chromosom 1 mit den Allelen 1.1A und 1.1B sowie einen Locus 5.1 auf Chromosom 5 mit den Allelen 5.1A und 5.1B. Somit hat Allel 1.1A auf Chromosom 1 eine 50%-ige Chance, gemeinsam mit dem Allel 5.1A von Chromosom 5 an ein Kind weitergegeben zu werden.*

*Allele an Loci desselben Chromosoms werden mit einer Wahrscheinlichkeit zusammen weitergegeben, die der Rekombinationshäufigkeit  $\Theta$  zwischen diesen Loci entspricht. Die Rekombinationshäufigkeit  $\Theta$  zweier Loci liegt zwischen 0 (wenn die Loci auf dem Chromosom ganz eng benachbart sind) und 50% (wenn die Loci sehr weit entfernt sind oder auf unterschiedlichen Chromosomen liegen).*

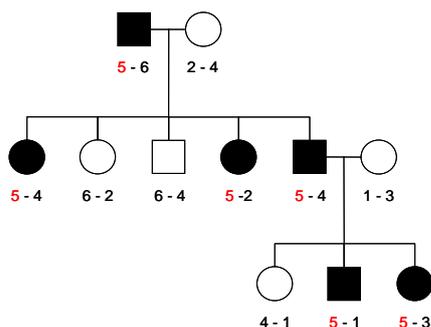
---

Zwei Loci gelten als genetisch gekoppelt, wenn die Rekombinationsrate zwischen ihnen kleiner als 50% ist. Dieses Prinzip der Kopplung, das wiederum auf dem natürlichen Ereignis des *crossing over* beruht, macht man sich bei der Aufklärung genetischer Erkrankungen zunutze. Der eine der beiden Loci ist der „Phänotyp“ mit unbekannter genetischer Lokalisation. Der andere Locus wird durch einen **polymorphen Marker** repräsentiert, dessen Position im Genom bekannt sein muss. Polymorph bedeutet nun, dass innerhalb einer Familie oder Population mehr als eine Variante des Markers vorliegt. Diese unterschiedlichen Varianten eines Markers nennt man Allele. Da die genetische Ursache irgendwo im Genom sitzen kann, typisiert man möglichst viele dieser polymorphen Marker. Gegenwärtig werden verschiedene Markertypen genutzt, die sich nach ihrer Anzahl im Genom, ihrer Informativität und dem Analyseaufwand unterscheiden: Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLPs), Mikrosatellitenmarker (STRs) und Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) (Tab. 1).

	RFLPs	STRs	SNPs
<b>Allelzahl</b>	2	5-20	2
<b>Informativität</b>	Niedrig	<b>Hoch</b>	Niedrig
<b>Verfügbarkeit</b>	ca. 100	ca. 10.000	<b>ca. 1,8 Mio</b>
<b>Genomscans</b>	ca. 1990	ca. 1994-2002	ca. 2003-heute

**Tab. 1:** Genetische Marker für Kopplungsanalysen. Für genomweite Kopplungsanalysen benötigt man eine hinreichende Anzahl gleichmäßig über das Genom verteilter polymorpher Marker. Die Anzahl der für einen Genomscan benötigten Marker ist dabei von der Informativität abhängig. Da Mikrosatelliten in der Regel mehrere Allele aufweisen, kann ein erfolgreicher Genomscan in der Regel mit ca. 400 Mikrosatellitenmarkern durchgeführt werden. Dagegen haben für Genomscans genutzte SNPs nur 2 Allele, so dass ca. 6.000-10.000 SNPs und eine spezielle Auswertung notwendig sind. Um die geringere Informativität auszugleichen, werden mehrere benachbarte SNPs kombiniert ausgewertet (Haplotyp- und Multipoint-Analyse).

Die polymorphen Marker müssen desweiteren in einem ausreichend großen Stammbaum typisiert werden, damit man anhand mehrerer Meiosen ermitteln kann, ob Kopplung vorliegt, d.h. ob innerhalb dieser Familie immer das gleiche Markerallel zusammen mit der Krankheit vererbt wird (Abb. 1).



**Abb. 1:** Beispiel für perfekte Co-Segregation des Markerallels 5 mit der Erkrankung.

Findet man bei einer genomweiten Analyse Kopplung, dann ist mit hoher Wahrscheinlichkeit anzunehmen, dass die „genetische Krankheitsursache“ in der Nähe der ja bekannten Markerposition liegt. Diesen Vorgang nennt man **Positionsklonierung** („positional cloning“, Abb. 2).

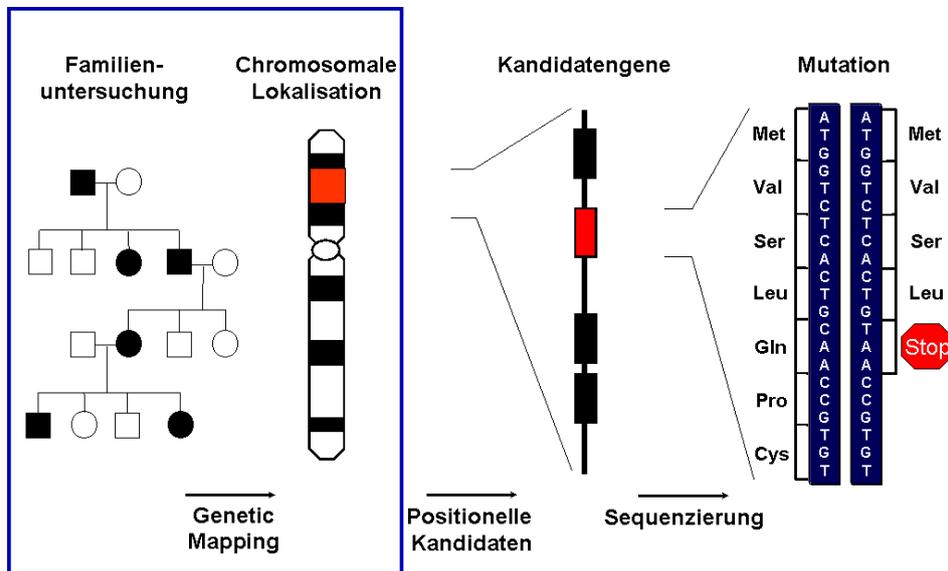


Abb. 2: Ablauf der positionellen Klonierung von Krankheitsgenen.

Hat man eine solche gekoppelt vererbte Region gefunden, werden zusätzliche Marker in diesem Bereich typisiert, um den infrage kommenden genetischen Abschnitt weiter einzuengen (Feinkartierung, finemapping). Im nächsten Schritt werden Gene, die innerhalb des mit der Erkrankung gekoppelten Bereiches liegen, auf potentiell krankheitsrelevante Veränderungen untersucht. Auf diese Weise gelang es seit 1990, die ursächlichen Gendefekte einer Vielzahl monogener Krankheiten zu identifizieren. Damit haben sich Kopplungsanalysen als eine wichtige und erfolgreiche Methode in der Aufklärung der Ursachen von Erbkrankheiten etabliert.

## 1.2 Modellbasierte (parametrische) Kopplungsanalysen

Kopplungsanalysen können mit Bezug auf das Vererbungsmodell modellbasiert (modellgebunden, modellabhängig, parametrisch) oder modellfrei (nicht modellgebunden, modellunabhängig, nichtparametrisch) durchgeführt werden. Modellbasierte Kopplungsanalysen benötigen Angaben, oder zumindest Hypothesen, zum vorliegenden Vererbungsmodell (z.B. autosomal oder X-gebunden, rezessiv oder dominant, volle oder verminderte Penetranz). Sie eignen sich insbesondere für Krankheiten mit klarem Mendelschen Erbgang und für größere Familien.

**Modellbasierte (parametrische) Kopplungsanalysen** vergleichen die beobachtete Rekombinationshäufigkeit mit der erwarteten für nicht gekoppelte Loci. Weiterhin wird ein Maß für die Abschätzung benötigt, ob diese Kopplung zufällig ist oder statistisch signifikant. Dieses Maß ist der LOD score, der dekadische Logarithmus des Quotienten aus der Wahrscheinlichkeit der Daten bei Kopplung mit Rekombinationshäufigkeit  $\theta$  und der Wahrscheinlichkeit der Daten für nicht gekoppelte Loci (Morton 1955). Loci gelten als gekoppelt, wenn die Rekombinationshäufigkeit  $\theta$  zwischen 0 (sehr eng benachbarte Loci) und 0,5 liegt ( $0 \leq \theta < 0,5$ )

$$LOD = \log_{10} \frac{\text{Wahrscheinlichkeit der Daten bei Kopplung mit Rekombinationshäufigkeit } \Theta}{\text{Wahrscheinlichkeit der Daten für nicht gekoppelte Loci } (\Theta = 0,5)}$$

$$Z(\Theta) = \log_{10} \frac{L(\Theta)}{L(\Theta = 0,5)}$$

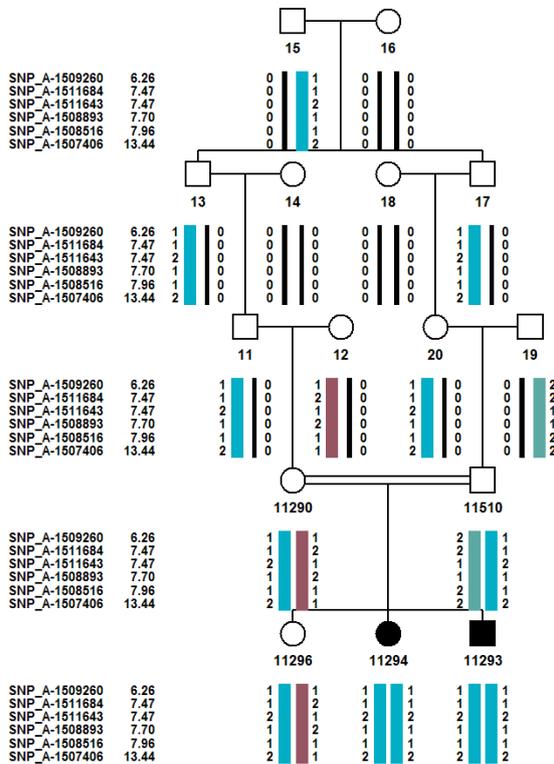
Im Allgemeinen ist ein  $LOD > 3$  beweisend für Kopplung; ein  $LOD < -2$  schließt Kopplung aus (Morton 1955; Morton 1998). Zu bemerken ist, dass diese Richtwerte für den vorhandenen Datensatz (Stammbaum-Konfiguration, Marker-Dichte und Markerinformativität) simuliert und angepasst werden müssen (Lander et al. 1995; Morton 1998; Ott et al. 1999; Wiltshire et al. 2002).

Modellbasierte Kopplungsanalysen haben uns die Kartierung der Krankheitsregionen und nachfolgende Identifizierung der ursächlichen Genveränderung bei verschiedenen Kontraktursyndromen (Kapitel 2.2), bei einer Differenzierungsstörung neutrophiler Granulozyten (Pelger-Anomalie, Kapitel 2.3) sowie einer Reihe weiterer monogener Krankheiten ermöglicht.

### **1.3 Homozygotie-Kartierung (Homozygosity Mapping) in konsanguinen Familien – Eine Sonderform parametrischer Kopplungsanalysen basierend auf Foundereffekten**

Treten Mutationen neu auf und werden an Nachkommen weitergegeben, so ist das ein Gründer-Ereignis (Foundereffekt). Eine Art Foundereffekt besteht auch, wenn eine Mutation in der Population vorlag, und ein Mutationsträger diese Mutation in eine Familie eingebracht hat. Der derart vererbte Abschnitt wird als „identical by descent“ (IBD) bezeichnet. Ein klassisches Beispiel für „identical by descent“ vererbte genomische Abschnitte sind konsanguine Familien, bei denen aufgrund dieses Effektes ein erhöhtes Risiko für rezessive Erkrankungen besteht. Beide Eltern betroffener Kinder sind hier obligate heterozygote Überträger, wobei sie den krankheitstragenden genomischen Abschnitt

von einem gemeinsamen Vorfahren ererbt haben. Der mutationstragende Abschnitt ist aufgrund der gleichen Abstammung identisch und liegt in den Betroffenen daher homozygot vor (Abb. 3). In konsanguinen Familien sucht man solche Abschnitte mit einer spezialisierten Kopplungsanalyse, dem Homozygoty Mapping (Lander et al. 1987a).



**Abb. 3:** Homozygotie in Betroffenen konsanguiner Familien. Die beiden betroffenen Kinder 11294 und 11293 der konsanguinen Eltern sind homozygot für die Marker im Bereich von 6,26 bis 13,44 cM.

Homozygotie-Kartierungen in konsanguinen Familien haben wir bei der Aufklärung des Escobar-Syndroms (Kapitel 2.2) sowie bei einer Reihe anderer rezessiver monogener Krankheiten erfolgreich eingesetzt.

### 1.4 Foundereffekt in geographisch oder kulturell abgegrenzten Bevölkerungen (Isolatpopulationen)

Ein Foundereffekt entsteht ebenfalls, wenn aus einer Population einige Mitglieder auswandern oder z.B. nach einer Epidemie nur wenige Personen überleben, was in der Menschheitsgeschichte recht häufig vorkam. Jedes derartige Ereignis dezimiert mit der Zahl der Personen auch die Zahl der in der Population vorhandenen genetischen Varianten („bottle neck“). Auch das entspricht einem Founder-Ereignis, weil dann relativ zum vorhergehenden Gesamtpool nur einige Varianten weitervererbt werden können (Abb. 4).

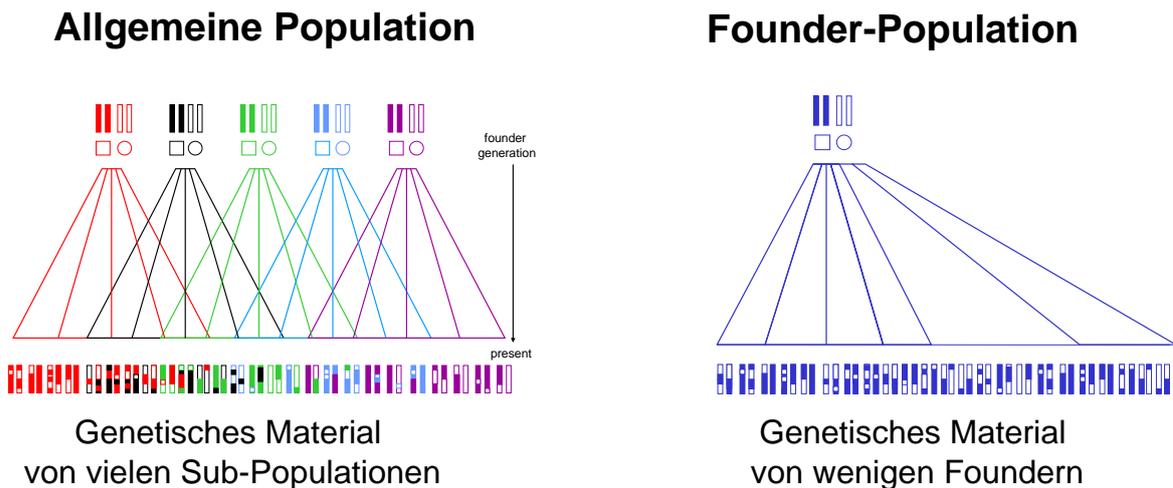


Abb. 4: Entstehung reduzierter genetischer Diversität in Founderpopulationen.

Vergrößert sich die Population, ohne dass sie sich mit anderen Bevölkerungsgruppen mischt (Isolatpopulation), so können sich Allelhäufigkeiten innerhalb dieser abgegrenzten Bevölkerungsgruppe schnell und stark ändern. Weiterhin werden durch ein Gründungsereignis insgesamt weniger Krankheitsvarianten in die Founderpopulation eingebracht. Beide Effekte führen dazu, dass in Isolatpopulationen die Häufigkeiten mancher Krankheiten höher, aber anderer Krankheiten auch niedriger sind als in gemischten Populationen. Ein Beispiel dafür ist die hohe Inzidenz von z.B. Aldolase B-Mangel und Cornea plana in Finnland, während in Deutschland relativ häufige Erkrankungen wie PKU und Cystische Fibrose in Finnland sehr selten sind (de la Chapelle 1993).

Somit führen Foundereffekte wie z.B. in blutsverwandten (konsanguinen) Familien, in Bergregionen oder größeren klassischen Isolatpopulationen zu Unterschieden im Vergleich zu allgemeinen Populationen, die man sich bei der Identifizierung von Krankheitsgenen nutzbar macht:

- Reduzierte genetische Heterogenität bei Krankheiten (eine Erkrankung wird durch eine oder wenige Varianten ausgelöst)
- Einführung von Krankheitsvarianten durch einen oder wenige Gründer – gemeinsamer Haplotyp bei betroffenen Nachfahren

In Deutschland gibt es eine slawische Isolatpopulation, die etwa 60.000 Mitglieder hat. Die Sorben sind zur Zeit der Völkerwanderung in das Gebiet der heutigen Lausitz eingewandert und haben bis heute ihre slawische Sprache und eigenständige Kultur bewahrt (Kunze 1997). Wir haben in der sorbischen Oberlausitz Hypertoniefamilien rekrutiert und mithilfe genomweiter nicht-parametrischer

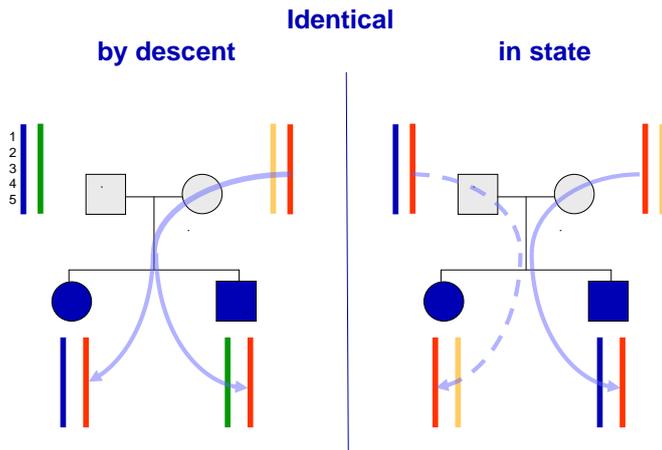
Kopplungsanalysen zwei mit Hypertonie gekoppelt vererbte Regionen auf Chromosom 1 und Chromosom 9 lokalisiert (Kapitel 2.4.1). Interessanterweise fanden wir in der mit Hypertonie gekoppelten Region auf Chromosom 1 auch ein Kopplungsergebnis in diabetischen Geschwisterpaaren aus Sachsen (Kapitel 2.4.2). Da sowohl Hypertonie und als auch Typ-2-Diabetes Manifestationen des Metabolischen Syndroms sind, könnte hier ein gemeinsamer Effekt in eng benachbarten Populationen vorliegen.

## 1.5 Modellfreie (nichtparametrische) Kopplungsanalysen

Modellfreie (modellunabhängige, nicht modellgebundene, nichtparametrische) Kopplungsanalysen beruhen auf dem Nachweis, dass betroffene Familienmitglieder überzufällig häufig den gleichen Abschnitt im Genom „identical by descent“ ererbt haben. Nichtparametrische Untersuchungen sind insbesondere bei oligo- oder polygen bedingten Erkrankungen sinnvoll, bei Kollektiven kleinerer Familien, bei verminderter Penetranz oder Heterogenität. Modellfreie Analysen sind etwas weniger anfällig für Fehlklassifikationen des Betroffenenstatus.

Bei Krankheiten mit verminderter Penetranz oder komplexer Ätiologie sind parametrische Untersuchungen oft schwierig anzuwenden. Bei komplexen Erkrankungen wie Hypertonie oder Typ-2-Diabetes liegt in der Regel kein klarer Mendelscher Erbgang vor. Kompliziert werden Analysen durch den Einfluss mehrerer oder vieler schützender und krankheitsprädisponierender Gene sowie einer Vielzahl von Umweltfaktoren. Andererseits zeigen epidemiologische Studien, dass bei vielen komplexen Erkrankungen eine familiäre Häufung besteht.

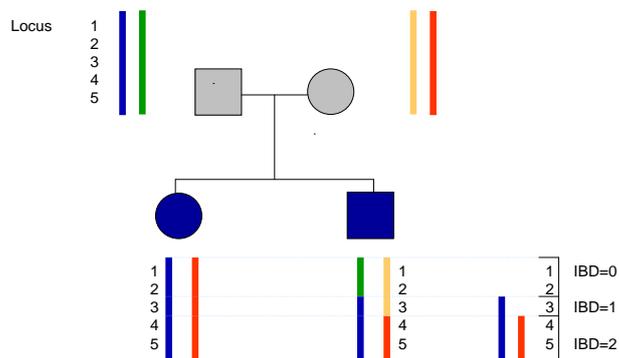
Familiäre Häufungen können durch geteilte Umweltfaktoren (Ernährung, Lebensstil) oder durch gemeinsam ererbte genetische Varianten erklärt werden. Bei der genetischen Analyse ist zu unterscheiden, ob eine Variante bei untersuchten Individuen identisch ist, weil sie von einem gemeinsamen Vorfahren abstammt („identical by descent“, IBD) oder weil sie recht häufig in der Population vorkommt („identical by state“ bzw. „identical in state“; Abb. 5).



**Abb. 5:** Unterscheidung von "Identical by descent" und "identical by state". Im linken Beispiel lässt sich eindeutig nachvollziehen, dass beide Kinder den roten Abschnitt von der Mutter geerbt haben (identical by descent, IBD). Im Gegensatz dazu tragen im rechten Beispiel beide Eltern den roten Abschnitt, und bei den Kindern wurde er einmal vom Vater (Tochter) und einmal von der Mutter ererbt (Sohn); somit ist der rote Abschnitt in beiden Kindern zwar identisch, aber nicht „by descent“ sondern „by state“. Zu bemerken ist hier, dass dieser Effekt selbstverständlich nicht nur für krankheitsverursachende sondern auch für neutrale Varianten (Polymorphismen) gilt.

Etablierte Methoden zum IBD-Vergleich sind **Affected Sib Pair Analysen (ASP)** (Haseman et al. 1972; Elston et al. 2000; Palmer et al. 2000) sowie **Affected Pedigree Member Analysen (APM)** (Weeks et al. 1988; Whittemore et al. 1994).

Nimmt man einen gemeinsamen Gründer an, so kann man zwischen den Nachkommen den Anteil von genomischen Abschnitten vergleichen, die „identical by descent“ sind. Vergleicht man dann Patienten mit Nicht-Betroffenen in dieser Linie, so sollte um den Krankheitsgenort bei Patienten ein signifikant höherer Anteil von gemeinsamen Allelen vorliegen als bei Nichtbetroffenen (Abb. 6). Der Vergleich kann Allele eines Locus einschließen oder einen Block von Allelen eng benachbarter Marker (Haplotypen).

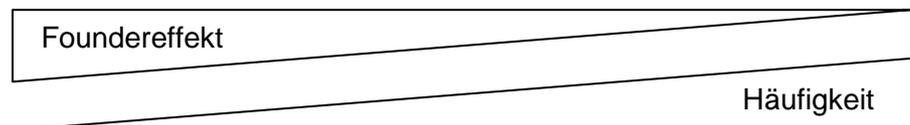


**Abb. 6:** Allel- und Haplotyp-Sharing „Identical by descent“. Ein klassisches Beispiel für Allel- und Haplotyp-Sharing ist die "identical by descent" (IBD) Verteilung zwischen betroffenen Geschwisterpaaren, Geschwister haben im Durchschnitt 50% ihres genomischen Materials gemeinsam. Dabei entfallen 25% auf genomische Abschnitte mit 0% Sharing (kein elterliches Allel gemeinsam), 50% auf Abschnitte mit 50% Sharing (1 elterliches Allel gemeinsam) und 25% auf Bereiche mit 100% Sharing (beide elterlichen Allele stimmen zwischen den Geschwistern überein). Weicht die identical by descent Verteilung bei Betroffenen von der erwarteten Verteilung ab, so enthält diese Region möglicherweise ein Gen, dass die Krankheitssuszeptibilität beeinflusst.

Nicht-parametrische Analysen haben wir bei der Suche nach krankheitsprädisponierenden genomischen Regionen in sorbischen Hypertoniefamilien (Kapitel 2.4.1) sowie in diabetischen Geschwisterpaaren aus Sachsen (Kapitel 2.4.2) genutzt.

**Die Habilitationsschrift beinhaltet monogene und komplexe Erkrankungen, die durch Kopplungsanalysen lokalisiert bzw. aufgeklärt wurden. Dabei bestanden unterschiedlich stark ausgeprägte Foundereffekte. Die Ergebnisse haben über die initial analysierten Phänotypen hinaus auch Relevanz für weitere Erkrankungsgruppen.**

Erkrankung	Escobar Syndrom	Pelger-Anomalie	Hypertonie	T2D
Population	Konsanguine Familien	Lange isoliertes Bergdorf	Isolat-Population	Gemischte Population



## 2. EIGENE ARBEITEN

### 2.1 Bioinformatische Arbeiten *easyLINKAGE* und *easyLINKAGE-PLUS*: Ein Interface zur einfachen, effizienten und graphisch unterstützten Durchführung von Kopplungsanalysen

Lindner TH, Hoffmann K: *easyLINKAGE*: Ein PERL-Script zur einfachen und automatisierten Durchführung von Two- und Multipoint Kopplungsanalysen.

*Bioinformatics 21: 405-407, 2005*

Hoffmann K, Lindner TH: *easyLINKAGE-Plus* - Automatisierte Kopplungsanalysen von Hochdurchsatz-SNP-Daten.

*Bioinformatics 21: 3565-3567, 2005*

Vor dem Beginn eines Kopplungsprojektes sollte zuerst eine Simulation durchgeführt werden, um die Power der Studie und den Maximal Expected LOD score zu bestimmen. Nach der experimentellen Genotypisierung müssen die gewonnenen Daten verschiedene Qualitätskontrollen durchlaufen (Typisierungsrate, Fehler in der Mendelschen Vererbung, unwahrscheinliche Genotypen, Hardy Weinberg Equilibrium). Mit diesem Datensatz werden dann die eigentlichen Kopplungsanalysen durchgeführt.

Die für die Qualitätskontrolle und für die Kopplungsanalysen verwendeten unterschiedlichen Programme haben verschiedene Input- und Outputformate. Um den Analyseprozess zu vereinfachen, entwickelten wir das graphische Microsoft Windows-Interface *easyLINKAGE*, das automatisch die Daten für das gewählte Programm aufbereitet und, neben den üblichen Outputfiles im Textformat auch sofort eine visualisierte Ergebnisübersicht generiert. Ursprünglich konzipierten wir *easyLINKAGE* für Mikrosatelliten. In der Folgeversion *easyLINKAGE Plus* erweiterten wir das Programm auf die Nutzung von SNPs, wobei auch Datensätze von 500k korrekt analysiert werden können.

Über *easyLINKAGE* können Two- als auch Multi-Point-Simulationsstudien durchgeführt werden. Damit können auch Nicht-Informatiker eigenständig Kopplungsanalysen durchführen und interpretieren. *easyLINKAGE* beseitigt auch das LD-Problem über interne Algorithmen und erweitert die Analyseprogramme um eine Reihe von Optionen und Vereinfachungen. *easyLINKAGE* kann definierte Regionen, ganze Chromosomen bis hin zu kompletten Genomscans in unterschiedlichen Species mit verschiedenen großen Genomen analysieren. *easyLINKAGE* unterstützt FastLink, FastSLink, SPLink, SuperLink, GeneHunter, GeneHunter Plus, GeneHunter Imprinting, GeneHunter MOD, GeneHunter TwoLocus, Merlin, Allegro, SimWalk, sowie PedCheck und ist für alle Nutzer frei verfügbar (<http://genetik.charite.de/hoffmann/easyLINKAGE/index.html>).

Für einen konventionellen Genomscan mit Mikrosatellitenmarkern (STRs) sind etwa 400 Marker notwendig, was auf die höhere Informativität von Mikrosatellitenmarkern zurückzuführen ist, die in der Regel mehr als 2 Allele pro Marker in einer Population aufweisen. SNPs können genomweit mit verschiedenen Chips untersucht werden, die zwischen 6.000 und 1,8 Millionen SNPs enthalten. Aufgrund der besseren Automatisier- und Auswertbarkeit haben sich SNPs für die Hochdurchsatzgenotypisierung von Kopplungs- und Assoziationsstudien durchgesetzt. Für die initiale Kartierung von Erkrankungen sind SNP-Sets mit 6.000-10.000 Markern ausreichend (Tab. 2,3).

	Marker [n]	PCRs [n]	Auflösung [cM]	Laboraufwand [Zeit]	Analyseaufwand [n LOD-Scores]
<b>STRs</b>	ca. 400	ca. 8.000	10	Wochen bis Monate	400
<b>SNPs</b>	10.000-100.000	80	3,0-0,3	Tage bis Wochen	10.000-100.000

Tab. 2: Kopplungs-Genomscan mit Mikrosatelliten (STRs) versus SNPs (Aufwand für 20 zu typisierende Personen).

Firma	SNP-Set	n SNPs	Eignung für Kopplungsanalyse
<b>Affymetrix</b>	10k v2.0	10.204	Ja
	100k (2x 50k)	115.560	Ja
	500k (2x 250k)	500.447	Bedingt
	SNP Array v5.0 (1x 500k)	500.568	Bedingt
	SNP Array v6.0	906.600	Bedingt
<b>Illumina</b>	HumanLinkage V Panel Set	6.056	Ja
	HumanCNV 370-Duo v1.0	370.404	Bedingt
	HumanExon 510S-Duo v1.0	511.354	Bedingt
	HumanHap 550-Duo v3.0	531.466	Bedingt
	HumanHap 650Y v3.0	660.918	Bedingt
	Human 1M v1.0	1.072.820	Bedingt

Tab. 3: Verfügbare und in *easyLINKAGE* implentierte SNP-Sets sowie ihre Eignung für Kopplungsanalysen. Bedingte Eignung bezieht sich darauf, dass die Gesamt-Markeranzahl zu hoch ist und damit Marker im LD liegen.

SNPs haben in der Regel nur 2 Allele, daher sind per se viele Genotypen von Foundern homozygot und für die Kopplung in Familien nicht informativ. Weiterhin ist ein Teil der SNPs populationspezifisch, d.h. viele SNPs sind in der untersuchten Population nicht informativ. Aufgrund der durch maximal 2 Allele bedingten niedrigen Informativität eignen sich SNPs nicht für Two-Point-Kopplungsanalysen (Ausnahme: Riesenstammbäume), so dass Multi-Point-Kopplungsanalysen erforderlich sind. Um die geringere Informativität auszugleichen, müssen tausende Marker analysiert werden, was ein

sehr komplexes Datenmanagement und eine starke Hardware erfordert. Zu beachten ist, dass ein zu dichter Markersatz zu falschen Kopplungsergebnissen führen kann, da sich die Wahrscheinlichkeit von Kopplungsungleichgewicht (Linkage Disequilibrium, LD) zwischen den Markern drastisch erhöht. Prinzipiell ist diese Situation Software-technisch lösbar; jedoch kein einziges derzeit verfügbares Programm erlaubt LD. Erste Lösungsansätze sind in Sicht: So berechnet die Software Merlin das LD vor der eigentlichen Kopplungsanalyse und nimmt dann nur die informativsten Marker, die nicht im LD zueinander stehen. *easyLINKAGE* beinhaltet eine eigene Option.

Auf der anderen Seite ist nicht nur die Anzahl der Marker limitierend, sondern auch die Stammbaumgröße. Zwei Algorithmen, Lander-Green und Markow-Chain Monte Carlo (MCMC), werden für dieses Problem benutzt und sind in verschiedene Programme integriert (Tab. 4).

Programm	Algorithmus	Geschwindigkeit	LD-fähig	Markerlimit [n]	Max. Meiosen [n]
<b>GeneHunter</b>	Lander-Green	Langsam	-	110	20-30
<b>GeneHunter Plus</b>	Lander-Green	Langsam	-	110	20-30
<b>GeneHunter TwoLocus</b>	Lander-Green	Langsam	-	110	20-30
<b>GeneHunter MOD</b>	Lander-Green	Langsam	-	110	20-30
<b>GeneHunter Imprinting</b>	Lander-Green	Langsam	-	110	20-30
<b>Allegro v1.2c</b>	Lander-Green	<b>Schnell</b>	-	<b>Kein Limit</b>	20-30
<b>Merlin v1.1</b>	Lander-Green	Mittel	<b>Ja</b>	<b>Kein Limit</b>	20-30
<b>SimWalk v2.91/v3.0</b>	MCMC	Sehr langsam	-	65-720	<b>&gt;200</b>

Tab. 4: Vergleich verschiedener Kopplungsprogramme.

Zur Berechnung der LOD scores stehen verschiedene Algorithmen zur Verfügung, u.a. der Elston-Stewart-Algorithmus (Elston et al. 1971), der Lander-Green-Algorithmus (Lander et al. 1987b) und die Markow-Chain-Monte-Carlo-Methode (MCMC) (Metropolis et al. 1949; Metropolis et al. 1953; Hastings 1970). Diese Algorithmen werden in Programmen wie LIPID (Ott 1974), GeneHunter (Kruglyak et al. 1996; Kong et al. 1997), Allegro (Gudbjartsson et al. 2000; Gudbjartsson et al. 2005), Merlin (Abecasis et al. 2002) und SimWalk (Sobel et al. 1996; Sobel et al. 2001; Sobel et al. 2002) genutzt und wurden von uns für eine effiziente und einfache Durchführung im Programm *easyLINKAGE* implementiert.

## 2.2 Genetische Aufklärung und Charakterisierung angeborener Kontraktursyndrome

Angeborene Kontrakturen sind relativ häufige Fehlbildungen. Sie können isoliert z.B. als Klumpfuß, als multiple Kontrakturen (Arthrogryposis multiplex congenita, AMC, MIM 108110) oder kombiniert mit weiteren Störungen auftreten (Hall 1981; Hall 1984; Hammond et al. 1995; Hall 1997). Mit isolierten Kontrakturen wie z.B. Klumpfuß wird eines von 300 Babies geboren. Schwerere Ausprägungen im Kontext der Fetal Akinesia Deformation Sequence (FADS, MIM 208150) treten etwa bei einem von 3.000 Neugeborenen auf. Pathogenetisch spielen den Fetus betreffende genetische, maternale und umweltbedingte Faktoren eine Rolle, wobei jedoch bei den meisten Patienten die Ursache bisher nicht geklärt ist (Hall 1997).

### 2.2.1 Das Escobar-Syndrom ist eine pränatale Myasthenie, die durch einen Defekt der fetal exprimierten $\gamma$ -Untereinheit des Acetylcholin-Rezeptors ausgelöst wird

Hoffmann K, Müller JS, Stricker S, Megarbane A, Rajab A, Lindner TH, Cohen M, Chouery E, Adaimy L, Ghanem I, Delague V, Boltshauser E, Talim B, Horvath R, Robinson PN, Lochmüller H, Hübner C, Mundlos S

*Am J Hum Genet 79: 303-312, 2006*

#### Homozygotie-Kartierung in konsanguinen Familien

Das Escobar-Syndrom oder Multiple Pterygien-Syndrom (MIM 265000) ist eine autosomal-rezessiv vererbte Krankheit, die durch angeborene Kontrakturen und Flügelfelle (Pterygien) charakterisiert ist (Escobar et al. 1978a; Escobar et al. 1978b). In variabler Ausprägung zeigen die Patienten außerdem Atemstörungen, die unter Umständen letal verlaufen können, Skoliose und eine verminderte Muskelmasse. Einige betroffene Feten sterben bereits während der Schwangerschaft (Letales Multiples Pterygien-Syndrom, MIM 253290). Wir haben eine größere konsanguine Familie mit mehreren Betroffenen im Oman rekrutiert und den Phänotyp charakterisiert (Rajab et al. 2005).

In der anschließenden genomweiten Kopplungsanalyse lokalisierten wir die Krankheitsregion mittels Homozygotie-Kartierung auf Chromosom 2. Durch Einbeziehung zusätzlicher Familien engten wir die Region weiter ein. Die nachfolgende Sequenzierung funktioneller Kandidatengene der Region identifizierte in mehreren Familien mit Escobar-Syndrom Mutationen in der  $\gamma$ -Untereinheit des Acetylcholin-Rezeptors.

Die  $\gamma$ -Untereinheit zeigt ein außergewöhnliches Expressionsverhalten, das sich von den anderen Untereinheiten des nicotinergen Acetylcholin-Rezeptors an der neuromuskulären Synapse unterscheidet. Sie wird vorwiegend pränatal exprimiert und etwa in der 33. Schwangerschaftswoche durch die  $\epsilon$ -Untereinheit ersetzt (Hesselmans et al. 1993). Im Mausmodell haben wir die Expression der  $\gamma$ - und  $\epsilon$ -Untereinheiten in der fetalen und postnatalen Entwicklung untersucht und ein ähnliches Muster wie beim Menschen gefunden. Jedoch erfolgt die Umschaltung von  $\gamma$  auf  $\epsilon$  bei der Maus postnatal (Missias et al. 1997), was möglicherweise die absolute Letalität aufgrund von respiratorischer Insuffizienz von homozygoten Null-Mutationen der  $\gamma$ -Untereinheit bei der Maus erklärt (Takahashi et al. 2002).

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass es sich beim Escobar-Syndrom um eine pränatale Myasthenie handelt, die aufgrund des  $\gamma$ - $\epsilon$ -Switches postnatal nicht massiv progredient ist. Es bestehen wichtige klinische und funktionelle Parallelen zur immunologischen Beeinträchtigung des fetalen Acetylcholin-Rezeptors bei Babies von Müttern mit Autoantikörpern gegen den Acetylcholin-Rezeptor (Polizzi et al. 2000).

## 2.2.2 Acetylcholin-Rezeptor-Pathway-Mutationen erklären verschiedene Ausprägungen fetaler Bewegungsstörungen (Fetal Akinesia Deformation Sequence Disorders)

Michalk A, Stricker S, Becker J, Rupps R, Pantzar T, Miertus J, Botta G, Naretto VG, Janetzki C, Yaqoob N, Ott C, Seelow D, Wieczorek D, Fiebig B, Wirth B, Hoopmann M, Walther M, Körber F, Blankenburg M, Mundlos S, Heller R, Hoffmann K

*Am J Hum Genet 82: 464-476, 2008*

Mit Hilfe von Kopplungsanalysen identifizierte neue pathogenetische Mechanismen erlauben nachfolgend die Untersuchung weiterer Pathway-Komponenten

Da wir nicht in allen Familien mit Escobar-Syndrom bzw. dem allelischen letalem multiplen Pterygien-Syndrom *CHRNA1*-Mutationen identifizieren konnten, untersuchten wir in diesen Patienten weitere Komponenten des Acetylcholin-Rezeptor-Pathways.

Wir untersuchten insgesamt über 70 Patienten mit ungeklärtem Escobar- bzw. Multiplen Pterygien-Syndrom oder schweren fetalen Bewegungsstörungen. Wir sequenzierten die Gene der AChR-Untereinheiten  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$ ,  $\delta$  sowie Rapsyn und identifizierten rezessive (funktionelle) Nullmutationen in der  $\alpha 1$ - und  $\delta$ -Untereinheit (*CHRNA1* und *CHRND*) in zwei Familien mit multiplen Spontanaborten und schwersten Fehlbildungen mit Kontrakturen (Abb. 7). Eine weitere Familie war rezessiv für zwei Missense-Mutationen in Rapsyn, wobei hier die genetische Diagnosestellung eine Therapie des zweiten betroffenen Kindes der Familie ermöglichte und zur deutlichen Besserung der Symptomatik führte, während vorher das erste betroffene Kind an respiratorischer Insuffizienz verstarb (Abb. 7).

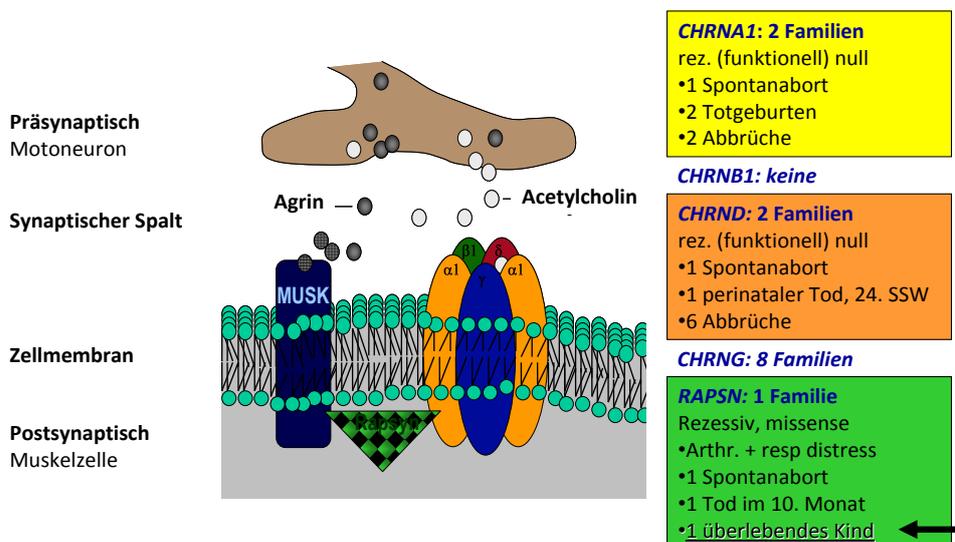


Abb. 7: Mutationsspektrum der AChR-Untereinheiten und im Rapsyn-Gen sowie assoziierte Phänotypen der untersuchten Familien.

Im Mausmodell wiesen wir die Expression dieser AChR-Pathway-Komponenten im Skelettmuskel aber auch in sehr frühen Entwicklungsstadien in Somiten nach, was gehäufte Frühaborte sowie häufig assoziierte frühe Fehlbildungen wie Ödem, Hydrops, Herzfehler und Nierenfehlbildungen bei Patienten mit fetalem Akinesie-Syndrom erklären könnte.

Eine wesentliche Schlussfolgerung aus unserer Arbeit ist, dass AChR-Pathway-Mutationen für ein weites Spektrum an Erkrankungen der FADS-Gruppe (Fetal Akinesia Deformation Sequence) verantwortlich sind. AChR-Pathway-Mutationen können sehr schwere Entwicklungsstörungen verursachen, die von frühen Spontanaborten und letalem Pterygien-Syndrom bis hin zu angeborenen Kontrakturen und Atemstörungen reichen; oder sie können sich auch erst postnatal als Myasthenes Syndrom (CMS) manifestieren. Unsere Ergebnisse tragen zur Subklassifizierung dieser komplexen Krankheitsgruppe bei und können potentiell helfen, genauere Aussagen über Wiederholungsrisiko, Prognose und eventuelle Therapieoptionen in Familien mit identifizierter Mutation zu treffen.

## 2.3 Kopplungsanalysen bei der Aufklärung und Charakterisierung der Pelger-Huët'schen Kernanomalie

### 2.3.1 Lamin B Rezeptor Mutationen führen zu einer gestörten Morphologie des Zellkerns in neutrophilen Granulozyten (Pelger-Huët Anomalie)

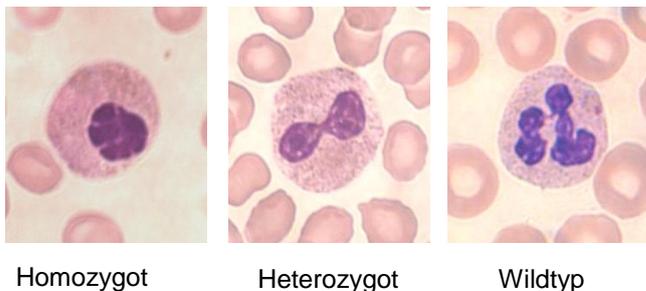
Hoffmann K, Dreger CK, Olins AL, Olins DE, Shultz LD, Lucke B, Karl H, Kaps R, Muller D, Vaya A, Aznar J, Ware RE, Sotelo Cruz N, Lindner TH, Herrmann H, Reis A, Sperling K

*Nat Genet 31: 410-414, 2002*

#### Kopplungs- und Haplotyp-Analysen identifizieren Founder-Mutationen im Lamin B Rezeptor in Pelger-Individuen

Die meisten Säugerzellen haben runde oder ovale Zellkerne. Eine Ausnahme bilden neutrophile Granulozyten, die im Laufe ihrer Entwicklung einen komplizierten und wenig verstandenen Prozess der Differenzierung durchlaufen. Beginnend mit runder Kernform folgt ein Stadium mit bi-segmentiertem Kern. Sind neutrophile Granulozyten voll ausdifferenziert, so haben sie Kerne mit mehrfacher Segmentierung. Erst in diesem Stadium werden sie beim gesunden Menschen vom Knochenmark ins periphere Blut ausgeschüttet. Dieser Prozess widerspiegelt auch die Kernform in der phylogenetischen Entwicklung, bei dem Spezies der früheren Entwicklungsstufen runde oder ovale Zellkerne in Neutrophilen aufweisen, niedere Vertebraten bi-segmentierte Nuclei und höhere Vertebraten mehrfach segmentierte Kerne (Undritz 1939).

Bei der **heterozygoten Pelger-Anomalie** (Pelger–Huët anomaly, PHA, MIM 169400) stoppt diese Entwicklung im bi-segmentierten Kern-Stadium, bei den sehr seltenen **homozygoten Pelger-Patienten** bereits im runden (Abb. 8) (Pelger 1928; Huët 1931; Nachtsheim 1943; Undritz 1943; Hoffmann et al. 2007b). Homozygote Pelger-Individuen können in variabler Ausprägung zusätzliche Störungen aufweisen, wie z.B. Epilepsie, Skelettveränderungen und mentale Retardierung (Undritz 1943; Haverkamp Begemann et al. 1952; Aznar et al. 1981; Siegert et al. 1983).

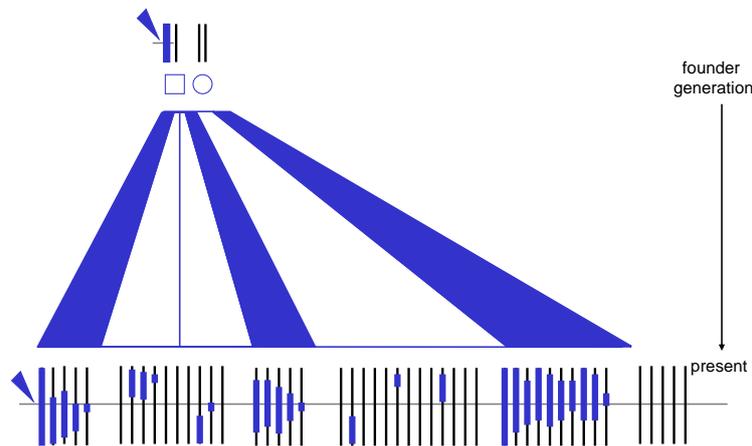


**Abb. 8:** Kernform neutrophiler Granulozyten bei Pelger-Merkmalsträgern im Vergleich zum Wildtypen.

Die **heterozygote** Pelger-Anomalie hat eine **weltweite Prävalenz** von 0,01 to 0,1%. Es gibt zwei bekannte Ausnahmen: Västerbotten County in Nordschweden mit einer Häufigkeit von 0,6% (Johansson 1963) und Gelenau, ein Bergdorf in Südost-Deutschland mit einer Prävalenz von 1% (Karl 1967).

Wir rekrutierten in Gelenau 11 Familien mit Pelger-Anomalie, führten einen Genomscan mit Mikrosatellitenmarkern durch und kartierten den Genort auf Chromosom 1q42.

Aufgrund der im Vergleich zu anderen Populationen sehr hohen Prävalenz der Pelger-Anomalie in Gelenau erwarteten wir einen Foundereffekt (Abb. 9), der über die Identifizierung eines gemeinsamen Haplotypen in betroffenen Familien die weitere Einengung der mit Pelger-Anomalie gekoppelten Region erlauben sollte.



**Abb. 9:** Foundereffekt und Haplotype-Sharing: Einer der Founder bringt eine Mutation in den Genpool ein. Alle betroffenen Nachfahren tragen einen blauen Chromosomenabschnitt. Wenn eine Erkrankung vererbt wurde, sollten die von einem gemeinsamen Founder abstammenden Patienten den gleichen genomischen Abschnitt um die krankheitsverursachende oder krankheitsbegünstigende Veränderung tragen. Das gilt auf Familien- und bedingt auch auf Populationsebene. Je mehr Generationen zwischen dem Einbringen der Mutation und der Untersuchung liegen (d.h. je größer die Familie oder je älter die Population ist), desto mehr Rekombinationen haben stattgefunden, d.h. es kam zu Unterbrechungen des die Mutation umgebenden genomischen Abschnittes. Je älter die Population ist, desto kürzer ist der genetische Abschnitt, den die vom Founder abstammenden Patienten gemeinsam haben. Daraus ableitend muss die Markerdichte dann auch viel höher sein, um diesen gemeinsamen Abschnitt zu finden.

Über eine Feinkartierung konnten wir unter Einbeziehung zusätzlicher Mikrosatellitenmarker einen gemeinsamen Haplotypen in 10 der Familien identifizieren, was unserer Hypothese eines Foundereffektes bestätigte.

Innerhalb dieser Region sequenzierten wir positionelle und funktionelle Kandidatengene und identifizierten Mutationen im Lamin B Rezeptor-Gen. Alle 10 Familien mit gemeinsamem Haplotyp tragen entsprechend die identische Mutation IVS12-5-10del. Die elfte Familie aus Gelenau trägt eine andere Mutation (IVS2-2A>G). Nachfragen bestätigten, dass die Vorfahren dieser Familie erst vor

einigen Jahrzehnten nach Gelenau gezogen sind. In Pelger-Familien aus anderen europäischen Ländern und aus Südamerika identifizierten wir weitere Mutationen im Lamin B Rezeptor-Gen.

Der Lamin B Rezeptor ist ein Protein der inneren Kernhülle mit dualer Funktion. Der nucleoplasmatische Teil interagiert mit anderen Kernkomponenten, u.a. mit Lamin B, Chromatin, Histonproteinen und HP1 (Ye et al. 1997). Der Transmembranteil hat eine Sterolreduktasefunktion (Holmer et al. 1998).

Auf zellulärer Ebene konnten wir weiterhin zeigen, dass zwischen der Expression des Lamin B Rezeptors und der Kernform neutrophiler Granulozyten eine dosisabhängige Beziehung besteht.

Die Ergebnisse sind relevant für das Verständnis der Interaktion von Kernhülle und Heterochromatin sowie für die Pathogenese Pelger-ähnlicher Zustände bei bestimmten Leukämieformen, schweren Infektionen und toxischen Arzneimittel-Nebenwirkungen.

### 2.3.2 Die Mutationen des Maus-Ichthyosis-Locus liegen im Lamin B Rezeptor-Gen und sind ein Modell für die Pelger-Anomalie des Menschen

Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, Gott B, Samuels R, Schweitzer PA, Dreger C, Herrmann H, Kalscheuer V, Olins AL, Olins DE, Sperling K, Hoffmann K

*Hum Mol Genet 12: 61-69, 2003*

#### Ein natürliches Maus-Modell für die menschliche Pelger-Anomalie: die Ichthyosis-Maus (ic)

Um die komplexe Pathogenese der Pelger-Anomalie und der zusätzlich assoziierten Fehlbildungen bei homozygoter Ausprägung weiter aufzuklären, suchten wir nach einem Mausmodell. Dabei stießen wir auf die rezessive Ichthyosis-Maus, bei der 1975 ein Pelger-ähnlicher Blutphänotyp beschrieben wurde (Green et al. 1975). Zusätzlich zeigen homozygot betroffene Mäuse schwere Hautveränderungen mit Ichthyosis und Alopezie sowie eine variable Ausprägung von Syndaktylien und Hydrozephalus.

Wir sequenzierten daraufhin *Lbr* in am Jackson Laboratorium konservierter DNA von drei verschiedenen spontan entstandenen ic/ic Mutanten und konnten homozygote Null-Mutationen in allen dreien identifizieren (Strain ic: C523T; ic<sup>1</sup>: 1088incCC; ic<sup>41</sup>: 1815insGGAA).

Eine dieser Mutanten (ic<sup>1</sup>) wurde am Jackson Laboratorium kryopräserviert und stand nach Identifizierung der Mutation für weitere Untersuchungen zur Verfügung. Wir konnten auf Immunfluoreszenz- und Western Blot-Ebene zeigen, dass die Mutation 1088incCC zum kompletten Verlust von Lamin B Rezeptor-Protein in den untersuchten Geweben führt. Sehr auffällig waren weiterhin die grobscholligen Chromatinverklumpungen, die ebenfalls in allen untersuchten Präparaten wie Blut, Leber, Milz, Hirn und Muskel zu beobachten waren.

Die ic/ic Maus ist somit ein wertvolles Modell zur funktionellen Charakterisierung der Pelger-Anomalie, zur Untersuchung der unterschiedlichen phänotypischen Ausprägungen von Lamin B Rezeptor-Defekten sowie zum Verständnis Pelger-ähnlicher Blutbilder bei Leukämien, Infektionen und Arzneimittel-Nebenwirkungen.

## 2.4 Kopplungsanalysen bei komplexen Erkrankungen

Komplexe Erkrankungen wie Bluthochdruck, Diabetes, Herzinfarkt, Krebs und depressive Störungen sind häufig und haben eine große Bedeutung für die Gesundheit der Bevölkerung und für die medizinische Versorgung. Im Gegensatz zu vielen erfolgreich aufgeklärten monogen bedingten Krankheiten ist das Identifizieren genetischer Faktoren bei komplexen Phänotypen viel schwieriger. Kopplungsanalysen waren dabei bisher nur bedingt erfolgreich. Hochdichte genomweite Assoziationsstudien bieten jetzt einen Ansatz, genetische Varianten zu identifizieren, die einen kleineren Effekt zur Krankheitsentstehung beitragen (minor genes).

Eine weitere Möglichkeit zur **Erhöhung der Power** solcher Studien ist die Reduzierung der genetischen Diversität im untersuchten Patientenkollektiv. Das kann über eine phänotypische Subklassifizierung erfolgen oder über Populationen mit Foundereffekt.

### Reduzierte genetische Diversität in Founder- und Isolatpopulationen

Am Beispiel der Pelger-Anomalie haben wir gesehen, dass in geographisch abgegrenzten Bevölkerungsgruppen Foundereffekte auftreten können, die bei der Identifizierung des ursächlichen Gens helfen. Der Grund dafür ist, dass in Isolatpopulationen wenige Founder zum genetischen Pool der Population beigetragen haben.

Diese Besonderheit führt zu veränderten Allelhäufigkeiten im Vergleich von Founder- und sonstigen Populationen (Terwilliger et al. 1998). Das betrifft zum einen eine geringere Heterogenität bei Normalvarianten ("Marker") als auch veränderte Krankheitshäufigkeiten. Eine klassische Founderpopulation ist Finnland und zeigt diese Charakteristika sehr deutlich (Tab. 5).

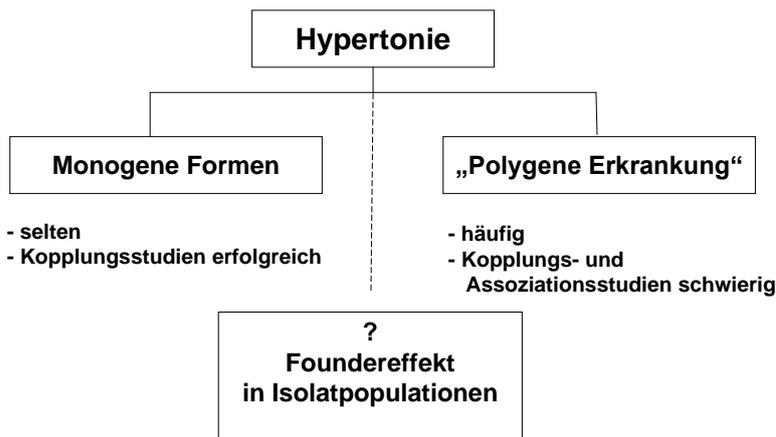
Krankheitshäufigkeit in Finnland im Vergleich zu anderen Populationen	
Höher:	Niedriger:
Aldolase B-Mangel	Phenylketonurie (PKU)
Cornea plana	Cystische Fibrose
Finnische Nephrose	Tay-Sachs
Familiäre Amyloidose	Gaucher

**Tab. 5:** Beispiele für unterschiedliche Krankheitshäufigkeiten aufgrund von Foundereffekten in der Finnischen Population (aus (de la Chapelle 1993)).

In Isolatpopulationen geht man davon aus, dass weniger genetische Varianten an der Pathogenese einer Krankheit beteiligt sind. Das betrifft sowohl monogene als auch komplexe Erkrankungen. Es ist daher oft einfacher, diese krankheitsauslösenden Veränderungen zu finden (Peltonen et al. 1995; Peltonen et al. 1999; Arcos-Burgos et al. 2002).

Die Arbeit „Genetik in Isolatpopulationen“ gibt einen Überblick über verschiedene Founderpopulationen, Mechanismen bei deren Entstehung, epidemiologische Charakteristika und wie diese bei der Aufklärung monogener und komplexer Erkrankungen in Isolatpopulationen genutzt werden können (Hoffmann et al. 2000).

**Isolatpopulationen liegen zwischen den beiden Extremen monogener und polygener/multifaktorieller Erkrankungen (Abb. 10).** Dadurch wird zum einen deren Aufklärung erleichtert, zum anderen erstreckt sich die Relevanz nicht nur einige Familien sondern kann wirklich repräsentativ für polygen bedingte Erkrankungen auch in anderen Populationen sein.



**Abb. 10:** Sonderstellung von Founder- und Isolatpopulationen am Beispiel der Hypertonie.

### 2.4.1 Ein neuer Locus für arterielle Hypertonie auf Chromosom 1p36 in den Sorben, einer slawischen Isolatpopulation in Deutschland, überlappt mit den Kopplungsbereichen anderer Unterformen des Metabolischen Syndroms

Hoffmann K, Planitz C, Rüschemdorf F, Müller-Myhsok B, Stassen HH, Lucke B, Mattheisen M, Stumvoll M, Bochmann R, Zschornack M, Wienker TF, Nürnberg P, Reis A, Luft FC, Lindner TH

*Journal of Hypertension 27: 983-990, 2009*

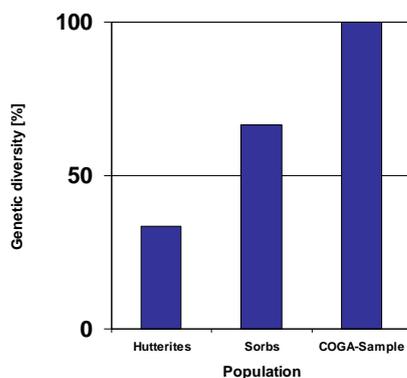
#### Kopplungsanalysen in einer Population mit Foundereffekt identifizieren zwei neue Loci für arterielle Hypertonie

In Deutschland gibt es eine slawische Founderpopulation, die Sorben, die zur Zeit der Völkerwanderung in das Gebiet des heutigen Sachsens und Brandenburgs einwanderte und bis heute seine kulturelle und sprachliche Identität bewahrt hat (Kunze 1997).

In Zusammenarbeit mit den lokalen Krankenhäusern und Hausärzten haben wir 124 sorbische Hypertoniepatienten und deren Familienangehörige kontaktiert, klinisch untersucht und Blut zur Lipidanalyse und DNA-Extraktion entnommen.

#### Nachweis von reduzierter genetischer Heterogenität und Foundereffekt in unserem Studienkollektiv

Isolat-oder Founderpopulationen sind genetisch homogener, was neutrale Marker als auch das Spektrum krankheitsverursachender genetischer Varianten betrifft. Unsere sorbischen Probanden erfüllen diese Kriterien, wie eine **reduzierte genetische Diversität** bei Mikrosatellitenmarkern (Abb. 11A) und eine signifikant erhöhte Heterozygotenrate der slawischen Foundermutation 657del5 im Nibrin-Gen (MIM 251260) zeigen (1:40 versus 1:200-1:800, Abb. 11B).



**Abb. 11A:** Reduzierte genetische Diversität von Mikrosatellitenmarkern in der Sorbischen Population (jedoch höher als in einem sehr ausgeprägten Isolat, den Hutteriten).

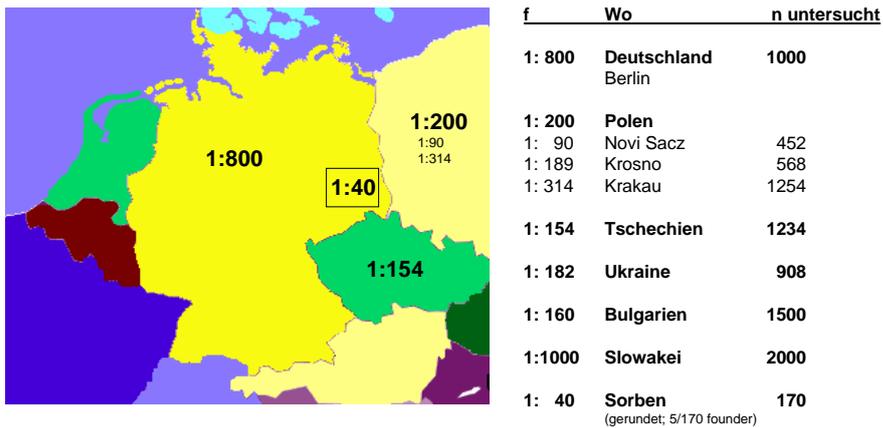


Abb. 11B: Allelhäufigkeit einer slawischen Founder-Mutation für heterozygote Träger 657del5 NBS (R. Varon).

In den **Genomscan** mit 1.040 Mikrosatellitenmarkern bezogen wir 87 Hypertoniefamilien ein und simulierten für diesen Datensatz die genomweiten Signifikanzschwellen („suggestive for linkage“:  $\text{LOD} > 1,83$ ; „significant linkage“:  $\text{LOD} > 2,87$ ).

Unter Anwendung nicht-modellgebundener Kopplungsanalysen identifizierten wir **zwei neue Regionen**, die in unserer Population **mit arterieller Hypertonie gekoppelt** sind. Die Region auf 1p36.13 zeigt zwischen den Markern D1S3669 und D1S2826 einen LOD von 3,45 ( $p_{\text{nominal}} = 0,00003$ ), der genomweit signifikant ist ( $p = 0,004$ ). Eine weitere Region auf Chromosom 9 (D9S1121, 44,28 cM) erreicht einen LOD von 2,11 ( $p_{\text{nominal}} = 0,0009$ ) und ist damit „suggestive for linkage“. Die Resultate bestätigten sich in einer Subgruppenanalyse.

Das Kopplungsergebnis auf Chromosom 1p36 liegt in einem Bereich, in den auch andere Subtypen des Metabolischen Syndroms kartieren, u.a. Typ-2-Diabetes (Hoffmann et al. 2007a), Hyperlipidämie (Geurts et al. 2000) und Adipositas (Gorlova et al. 2003).

Zusammenfassend zeigt die Arbeit, dass in der sorbischen Population eine reduzierte genetische Diversität vorliegt, die die Power genetischer Untersuchungen erhöht, und dass der in unserem Studienkollektiv mit Hypertonie gekoppelte Locus auf Chromosom 1p36 zu einem Cluster von Untertypen des Metabolischen Syndroms beiträgt.

## **2.4.2 Ein Genomscan in deutschen Geschwisterpaaren mit Typ-2-Diabetes bestätigt eine für das Metabolisches Syndrom prädisponierende Region auf Chromosom 1p36.13 sowie eine Typ-2-Diabetes-Region auf Chromosom 16p12.2**

Hoffmann K, Mattheisen M, Dahm S, Nürnberg P, Roe C, Johnson J, Cox NJ, Wichmann HE, Wienker TF, Schulze J, Schwarz PE, Lindner TH

*Diabetologia* 50: 1418-1422, 2007

### **Nicht-modellgebundene Kopplungsanalysen in diabetischen Geschwisterpaaren**

Wir rekrutierten in Sachsen 250 Familien mit Typ-2-Diabetes (T2D) und führten eine genomweite Mikrosatellitenanalyse durch. Qualitätskontrollen schlossen Typisierungsraten (>95%), Tests auf Mendelfehler und unwahrscheinliche Genotypen, HWE und Verwandtschaftstests mittels GRR ein. Insgesamt wurden 439 Mikrosatellitenmarker und 531 Personen in die weitere Analyse einbezogen. Wir simulierten für diesen Datensatz die Schwellwerte für genomweit hinweisende bzw. signifikante Kopplungsergebnisse. Signifikante Kopplung liegt demnach bei einem LOD von 2,74 vor, suggestive Linkage bei einem LOD von 1,51. Wir führten nichtparametrische Kopplungsanalysen durch (affected-sib-pair Design) und identifizierten zwei Regionen mit Kopplungspeaks. Die Region auf Chromosom 16p12.2 ist mit einem LOD von 1,85 (D16S403, 43,89 cM,  $p=0,002$ ) suggestiv für Kopplung auf genomweisem Niveau.

Es wird angenommen, dass bei der Pathogenese multifaktoriell bedingter Erkrankungen Veränderungen in mehreren Genen notwendig sind, um eine Krankheitsprädisposition auszulösen. Solche Interaktionen kann man mit konditionellen Analysen aufspüren (Cox et al. 1999). Daher testeten wir für die gefundenen Kopplungsregionen, ob mögliche Interaktionen mit anderen Bereichen des Genoms bestehen. Die konditionelle Analyse zeigte, dass eine Interaktion unserer Region D16S403 mit einer Region um den Marker D17S2180 besteht. Diese Region um D17S2180 liegt nahe des stärksten Kopplungsbefundes einer Metaanalyse von Europäischen T2D-Kollektiven des GIFT-Konsortiums (Demenais et al. 2003).

Die Region auf Chromosom 1p36.13 (D1S3669, 37,05 cM) liegt mit einem  $LOD=1,49$  ( $p=0,004$ ) knapp unter der genomweit suggestiven Schwelle. Interessanterweise überlappt diese Region u.a. mit dem Kopplungsspeak in den sorbischen Hypertonikern, aber auch mit anderen Studien wie symptomatischen Gallensteinen mit T2D in Mexiko-Amerikanern und Lipidstörungen (Iwasaki et al. 2003; Cai et

al. 2004; Puppala et al. 2006), so dass es sich wahrscheinlich um eine für das Metabolische Syndrom relevante Region handelt.

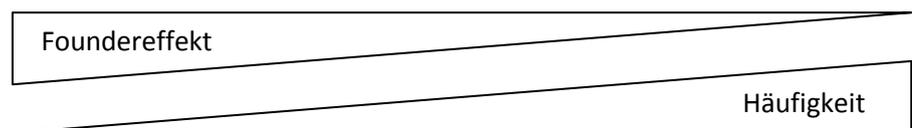
Die Region auf Chromosom 16 überlappt mit dem Kopplungsbefund einer Metaanalyse von 4 Europäischen T2D-Kollektiven (LOD von 1,09 bei D16S412, 42,18 cM) (Demenais et al. 2003).

Zusammenfassend haben wir in dem Kollektiv von diabetischen Geschwisterpaaren aus Sachsen drei Regionen identifiziert, die auch in anderen Studien Signale für T2D oder anderen Manifestationen des Metabolischen Syndroms zeigten. Wir gehen daher davon aus, dass diese Regionen tatsächlich für die Entwicklung von T2D relevant sind.

### 3. DISKUSSION

#### 3.1 Erfolgreiche Auswertung verschiedener Kopplungsprojekte mit *easyLINKAGE*

Kopplungsanalysen sind ein wichtiges Hilfsmittel zur Aufklärung genetisch bedingter Erkrankungen. Die Ergebnisse sind wissenschaftlich für das Verständnis der Pathogenese relevant, fließen aber auch direkt in die Diagnostik erblicher Krankheiten ein. Im Rahmen der Habilitationsarbeit wurden monogene Krankheiten (Escobar-Syndrom, Letales Multiples Pterygien-Syndrom) und ein monogen vererbtes Merkmal (Pelger-Anomalie) durch genomweite Kopplungsanalysen und den Nachweis unterschiedlich stark ausgeprägter Foundereffekte kartiert und aufgeklärt. Als Beispiele für komplexe Erkrankungen untersuchten wir Hypertonie in der sorbischen Isolatpopulation und Typ-2-Diabetes in betroffenen Geschwisterpaaren. Die Aufklärung des ursächlichen Gendefektes eröffnet oftmals die Möglichkeit für erfolgreiche Pathway-Analysen in klinisch ähnlichen bzw. funktionell verwandten Krankheiten (Tab. 6).



Krankheit	Escobar-Syndrom	Pelger-Anomalie	Hypertonie	T2D
<b>Population</b>	Konsanguine Familien	Bergregion	Isolat-Population	Gemischte Population
<b>Genutzte Marker</b>	SNP, STRs	STRs	STRs	STRs
<b>Analysemethoden</b>	modellbasiert	modellbasiert	modellfrei	modellfrei
<b>Besonderheit</b>	Autosomal-rezessiv Homozygotie-Kartier.	Autosomal-dominant Foundereffekt	IBD (AFM) Isolat	IBD (ASP) Admixture?
<b>Identifizierter Genort</b>	2q33-q34	1q42	1p36, 9p21	1p36, 16p12
<b>Krankheitsgen</b>	<i>CHRNA1</i>	<i>LBR</i>	?	?
<b>Klinisch oder funktionell verwandte Störungen</b>	FADS	Greenberg-Dysplasie Ichthyosis-Maus (ic)	Metabolisches Syndrom	
<b>Mit Mutationsnachweis in</b>	<i>CHRNA1, CHRND, RAPSN</i>	<i>Lbr</i> (ic/ic Maus)		

Tab. 6: Phänotypen, Methoden und Ergebnisse der durchgeführten Kopplungsprojekte

Zur schnelleren Durchführung und einfacheren Auswertung des statistischen Teils der Kopplungsanalysen entwickelten wir das user interface *easyLINKAGE*.

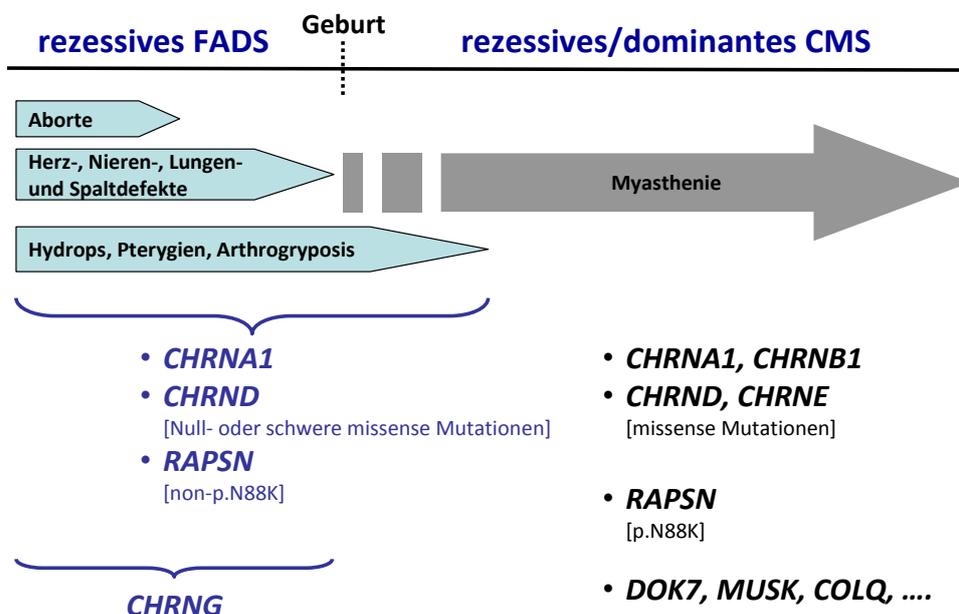
### 3.2 Prognostisch und therapeutisch relevante Subklassifizierung von Acetylcholin-Rezeptor-assoziierten Kontraktursyndromen

Die Identifizierung von Mutationen in der fetal exprimierten  $\gamma$ -Untereinheit beim Escobar-Syndrom und Letalem Multiplen Pterygien-Syndrom wies auf den Acetylcholin-Rezeptor-Pathway bei schwersten angeborenen Kontraktursyndromen hin (Hoffmann et al. 2006; Morgan et al. 2006). Nachfolgend konnten wir Mutationen in AChR-Pathway-Komponenten bei intrauterin letalen aber auch bei mildereren, lebensfähigen Formen des fetalen Akinesie-Spektrums identifizieren (Michalk et al. 2008). Diese reichen von frühen Aborten über schwere Organfehlbildungen hin zu angeborenen Kontrakturen und Atemstörungen (Abb. 12) (Hall 1986; Hammond et al. 1995).



**Abb. 12:** Fetale Akinesie führt zu verschiedenen Malformationen zusammengefasst als Fetal Akinesia Deformation Sequence, FADS (Hall 1986).

Ein Genotyp-Phenotyp-Vergleich kann dabei Hinweise auf Prognose, Wiederholungsrisiko und gelegentlich auch auf Therapieoptionen liefern (Abb. 13).



**Abb. 13:** Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei mit AChR-Mutationen assoziierten Erkrankungen.

Bei Neugeborenen scheint eine rechtzeitige klinische oder molekulargenetische Diagnose besonders wichtig, weil sich daraus therapeutische Implikationen ergeben können. Zum einen stehen für AChR-bedingte Subtypen Medikamente zur Verfügung, zum anderen muss auch hier elektrophysiologisch oder molekulargenetisch differenziert werden, um welchen funktionellen Defekt-Typ es sich handelt. So helfen Acetylcholinesterasehemmer bei Fast-Channel- oder AChR-Defizienz-Formen des Congenitalen Myasthenen Syndroms, sind aber bei Slow-Channel-Varianten kontraindiziert (Abb. 14A,B) (Engel 2007).

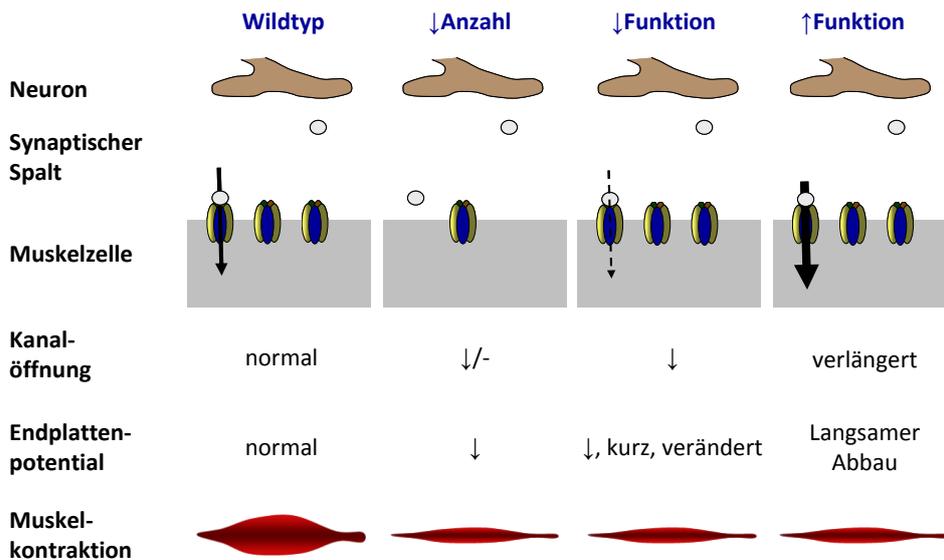


Abb. 14A: Acetylcholin-Rezeptor-assoziierte Mutationstypen und deren Effekt auf die Rezeptorfunktion und Muskelkontraktion (für CMS beschrieben in (Engel 2007)).

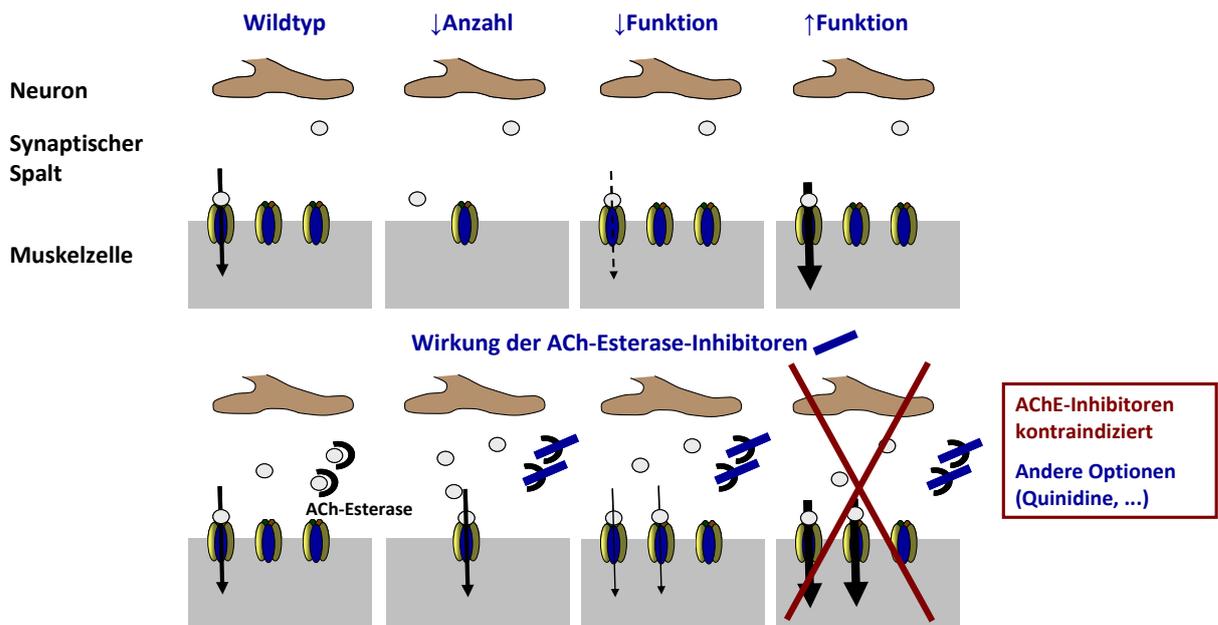


Abb. 14B: Therapieoptionen, die sich an der Art der Mutation orientieren. Acetylcholinesterase-Inhibitoren vermehren das effektiv wirkende Acetylcholin, sind aber bei Slow-Channel-CMS kontraindiziert (Engel 2007).

In einer Familie, in der bereits ein Sohn im Alter von 6 Monaten an respiratorischer Insuffizienz verstorben war, konnten bei der ebenfalls betroffenen neugeborenen Tochter Rapsyn-Mutationen als Ursache für ihre Kontrakturen und Atemstörungen identifiziert werden. Die daraufhin veranlasste Therapie mit dem Acetylcholinesterasehemmer Mestinon führte zu einer deutlichen Stabilisierung ihrer Atemfunktion und Verbesserung der Muskelkraft (Michalk et al. 2008).

### 3.3 Kopplungsanalysen zur Aufklärung der Pelger-Anomalie als Modell für Entwicklungsstörungen des Blutes, der Haut und des Skeletts

Die heterozygote Pelger-Anomalie ist ein autosomal-dominant vererbtes Merkmal, das durch eine verminderte Segmentierung der Zellkerne in neutrophilen Granulozyten charakterisiert ist (Pelger 1928; Huët 1931). Zusätzlich ändert sich die Verteilung und Struktur des Chromatins. Die Chromatinveränderungen beschränken sich nicht nur auf die Zellkerne neutrophiler Granulozyten, sondern betreffen auch Zellen anderer Gewebe (Undritz 1939; Shultz et al. 2003; Hoffmann et al. 2007b).

Ausgehend von einer 10fach erhöhten Prävalenz der Pelger-Anomalie im Erzgebirgsdorf Gelenau (Karl 1967) erwarteten wir dort einen Foundereffekt. Nach der initialen Kartierung der Pelger-Anomalie auf Chromosom 1q42 konnten wir dann über die Einbeziehung zusätzlicher Marker im Kopplungsbereich tatsächlich auch einen gemeinsamen Haplotypen in Betroffenen verschiedener Gelenauer Familien nachweisen. Über diesen gemeinsamen Haplotyp konnte der infrage kommende Bereich weiter eingeeengt werden. Über die Sequenzierung positioneller und funktioneller Kandidatengene fanden wir Mutationen im Lamin B-Rezeptor-Gen. Auf zellulärer Ebene zeigten wir, dass lymphoblastoide Zellen eines homozygoten Pelger-Patienten mit der Mutation IVS12-5-10del nur minimale Mengen an normal gespleißter *LBR*-RNA und auch nur winzige Mengen an LBR-Protein aufweisen. Heterozygote Pelger-Individuen haben etwas mehr LBR als homozygot betroffene Zellen, aber deutlich weniger LBR-Protein als Kontrollen. Das spricht für einen dosisabhängigen Effekt der LBR-Menge auf die Kernform in neutrophilen Granulozyten.

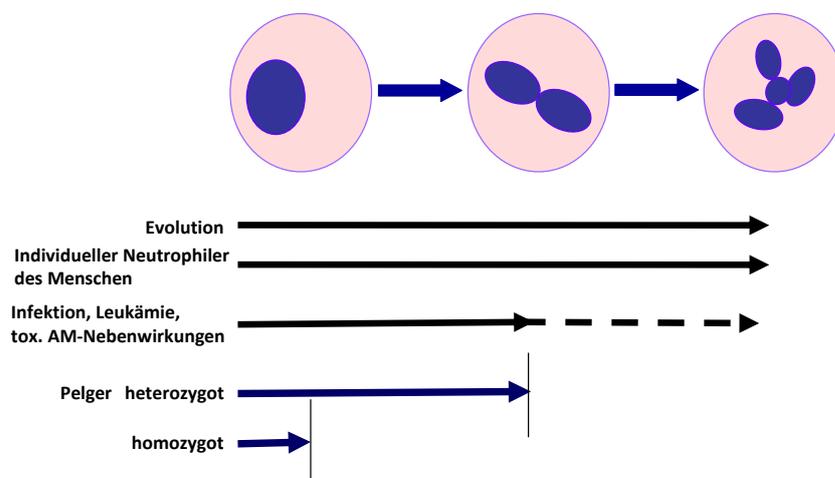
Der Lamin B-Rezeptor ist ein Bestandteil der inneren Kernhülle, der u.a. mit Chromatin, Histonproteinen und Laminen interagiert (Ye et al. 1997). Neben dieser struktur- und regulationsrelevanten Funktion wurde für den Transmembranteil des Lamin B-Rezeptors eine Sterolreduktaseaktivität nachgewiesen (Holmer et al. 1998). Waterham et al. konnten zeigen, dass homozygote *LBR*-Null-Mutationen das Sterolprofil verändern und die Ursache für die Greenberg-Dysplasie sind (Waterham et al. 2003).

Während heterozygote *LBR*-Mutationen außer der Veränderungen im Blutbild keine auffälligen klinischen Phänotypen zeigen, führen homozygote *LBR*-Mutationen zu verschiedenen assoziierten Störungen. Diese reichen von Herzdefekten, Brachydaktylie und mentaler Retardierung wie in unserem homozygoten Gelenauer Patienten (Hoffmann et al. 2002) über schwere Hautmanifestationen und Wachstumsstörungen bei der Ichthyosis-Maus (Shultz et al. 2003) bis hin zur intrauterin letalen Greenberg-Dysplasie (Greenberg et al. 1988; Waterham et al. 2003). Wir

nehmen an, dass beim Menschen der komplette (Funktions-)Verlust des Lamin B-Rezeptors nicht überlebensfähig ist (Greenberg-Dysplasie) (Greenberg et al. 1988; Horn et al. 2000; Waterham et al. 2003), während eine minimale Restmenge oder Restfunktion ein Überleben ermöglicht und zu den Manifestationen der homozygoten Pelger-Anomalie führt (Undritz 1943; Haverkamp Begemann et al. 1952; Aznar et al. 1981; Siegert et al. 1983; Hoffmann et al. 2002). Warum bei der Ichthyosis-Maus (ic) Tiere mit homozygoten Null-Mutationen gelegentlich überleben, ist noch unklar, hängt aber offenbar auch vom genetischen Hintergrund ab (Green et al. 1975; Shultz et al. 2003; Wassif et al. 2007; Cohen et al. 2008).

### Bedeutung der Pelger-Anomalie als Modell für Differenzierungsstörungen der neutrophilen Granulozyten

Erbliche Formen der Pelger-Huët-Kernanomalie sind eine wichtige Differentialdiagnose zu erworbenen Formen (Pseudo-Pelger, Abb. 15), wie sie zum Beispiel bei schweren Infektionen, myelodysplastischem Syndrom, einigen Leukämieformen sowie bei toxischen Arzneimittel-Nebenwirkungen vorkommen können (Cordas et al. 1967; Shenkenberg et al. 1982; May et al. 1993; Ballen et al. 1994; Juneja et al. 1996; Sainty et al. 2000). Insofern ist die Pelger-Anomalie ein exzellentes Modell für andere und ebenfalls klinisch relevante Differenzierungsstörungen neutrophiler Granulozyten (diskutiert in (Hoffmann et al. 2007b)). Für Untersuchungen stehen Lbr-defiziente EPRO-Zellen der Ichthyosis-Maus zur Verfügung, in denen der von uns beschriebene dosisabhängige Effekt der LBR-Menge auf die Kernform neutrophiler Granulozyten bestätigt werden konnte (Zwerger et al. 2008). Diese Zellen zeigen neben morphologischen Veränderungen des Zellkernes auch funktionelle Defekte wie eine reduzierte Chemotaxis (Gaines et al. 2008).



**Abb. 15:** Kernform bei der Differenzierung neutrophiler Granulozyten: Phylogenetische Entwicklung der Kernform neutrophiler Granulozyten (Undritz 1939), normale Granulopoese des Menschen, Pelger-Anomalie (Pelger 1928; Huët 1931; Undritz 1939; Hoffmann et al. 2002; Hoffmann et al. 2007b) sowie Pseudo-Pelger-Manifestationen, wie sie bei schweren Infektionen, Myelodysplastischem Syndrom, Leukämien oder bei toxischen Arzneimittel-Nebenwirkungen (u.a. Langzeit-Valproat-Therapie) auftreten können (Cordas et al. 1967; Shenkenberg et al. 1982; May et al. 1993; Ballen et al. 1994; Juneja et al. 1996; Sainty et al. 2000).

### **3.4 Kartierung von Hypertonie und Typ-2-Diabetes in eine für das Metabolische Syndrom relevante Region auf Chromosom 1p36**

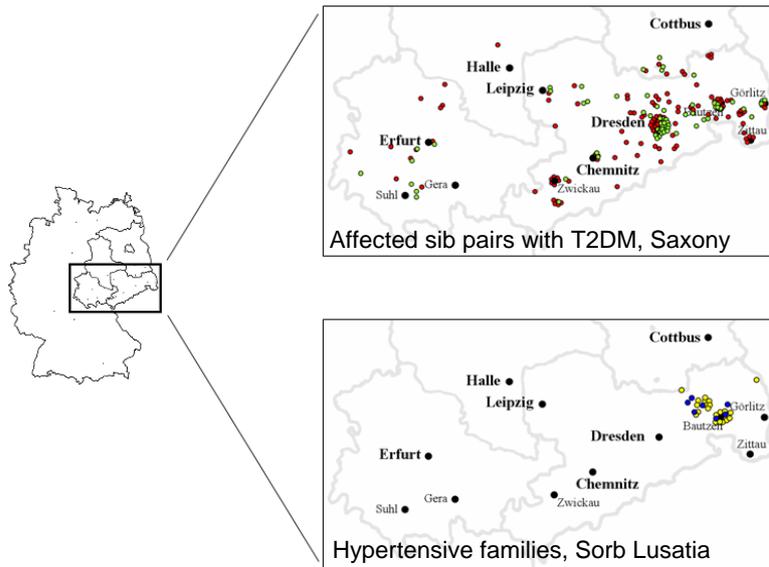
Hypertonie und Typ-2-Diabetes sind wesentliche kardiovaskuläre Risikofaktoren und treten in Bevölkerungen mit westlichem Lebensstil mit einer Prävalenz von bis zu 20% auf. Die Suche nach genetischen Risikofaktoren für komplexe Erkrankungen wie Hypertonie und Diabetes ist daher wichtig, aufgrund der genetischen Heterogenität und zusätzlich beteiligter Umweltfaktoren aber nicht einfach. Genomweite Assoziationsstudien bieten jetzt einen Ansatz, auch komplexe Erkrankungen mit kleinerem Beitrag von krankheitsrelevanten Genveränderungen zu untersuchen. Genomweite Assoziationsstudien waren schon sehr erfolgreich, z.B. für Typ-2-Diabetes, aber weniger für Hypertonie (Hakonarson et al. 2007; Saxena et al. 2007; Scott et al. 2007; Wellcome Trust Case Control Consortium 2007; Zeggini et al. 2007; Ehret et al. 2008).

Die Power einer Kopplungs- aber auch Assoziationsstudie kann man erhöhen, indem man

- mehr Marker untersucht und damit näher an das Gen herankommt
- mehr Patienten und Kontrollen einschließt (erhöht im Idealfall die Signifikanz, birgt aber die Gefahr, dass sich Beiträge unterschiedlicher Populationen mischen)
- man spezielle Populationen untersucht, in denen eine geringere genetische Variabilität vorliegt. Solche Populationen sind u.a. Founder- oder Isolatpopulationen.

Wir rekrutierten Bluthochdruck-Patienten und deren Familienangehörige in einer slawischen Isolatpopulation in Deutschland, den Sorben. In einer genomweiten Kopplungsstudie für arterielle Hypertonie konnten wir zwei neue Regionen auf Chromosom 1p36 bzw. 9p21 lokalisieren.

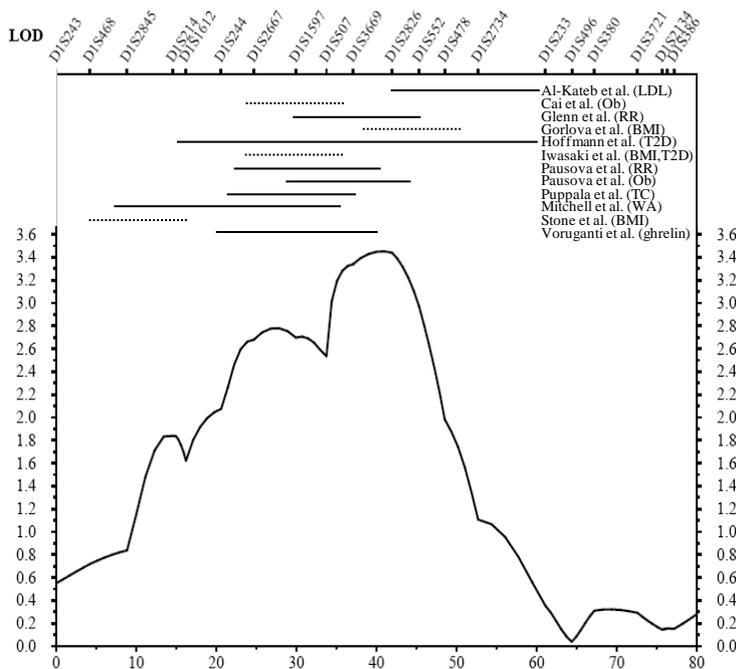
Bemerkenswert ist insbesondere, dass die Region auf Chromosom 1p36 sowohl in den sorbischen Hypertonikern als auch in den sächsischen Diabetikern ein Kopplungs-Signal zeigt. Beide Kollektive stammen aus einem überlappenden geographischen Raum in Ostsachsen (Abb. 16). Dabei wurden die Hypertoniepatienten im Kerngebiet der sorbischen Oberlausitz rekrutiert, die diabetischen Geschwisterpaare in den angrenzenden deutschsprachigen Regionen, so dass in letzteren von einer Durchmischung (admixture) beider Bevölkerungsgruppen auszugehen ist.



**Abb. 16:** Herkunft der Familien mit Bluthochdruck (sorbische Lausitz) und der diabetischen Geschwisterpaare (Sachsen). Das rechte obere Panel zeigt die Geburtsorte der in Sachsen rekrutierten Familien mit T2D und rechts unten die Geburtsorte der in der sorbischen Lausitz rekrutierten Hypertoniefamilien

Grün: T2D-Familien, die zum Kopplungsergebnis auf 1p36 beigetragen haben (NPL $\geq$ 0.6)  
 Rot: T2D-Familien ohne Kopplungsbeitrag (NPL<0.6)  
 Blau: Sorbische Hypertoniefamilien mit Kopplungsbeitrag auf 1p36 (NPL $\geq$ 0.6)  
 Gelb: Sorbische Hypertoniefamilien ohne Kopplungsbeitrag (NPL<0.6)

Die mit Hypertonie bzw. Typ-2-Diabetes gekoppelte Region auf Chromosom 1p36 überlappt zusätzlich mit mehreren anderen Studien, die Kopplungsergebnisse für andere Subphänotypen des Metabolischen Syndroms ergaben (Abb. 17), u.a. Hyperlipidämie (Geurts et al. 2000) und Adipositas (Gorlova et al. 2003). Insofern sind hier weitere Studien zur Aufklärung der ursächlichen Genvarianten in den beteiligten Phänotypen sinnvoll.



**Abb. 17:** Überlappung der Kopplungsregion auf Chromosom 1 mit anderen Studien. Angegeben sind, soweit verfügbar, die 1-LOD-Konfidenzintervalle (—) (Glenn et al. 2000; Al-Kateb et al. 2002; Gorlova et al. 2003; Iwasaki et al. 2003; Cai et al. 2004; Mitchell et al. 2005; Pausova et al. 2005; Puppala et al. 2006; Hoffmann et al. 2007a; Voruganti et al. 2007).

## 4. ZUSAMMENFASSUNG

Kopplungsanalysen sind eine wertvolle Methode bei der Aufklärung genetisch bedingter Krankheiten. Zur Analyse stehen verschiedene polymorphe Marker und Auswertungsmethoden zur Verfügung. Zur Vereinfachung der Durchführung von Kopplungsanalysen und zur automatisierten Visualisierung der Ergebnisse entwickelten wir das Interface *easyLINKAGE*, das von mehr als 1.200 Anwendern weltweit genutzt wird. Der klinisch-wissenschaftliche Schwerpunkt dieser Arbeit war die kopplungsgestützte Aufklärung mehrerer monogener Kontraktursyndrome und der Pelger-Huët-Kernanomalie sowie die Lokalisation von krankheitsrelevanten genomischen Regionen für Hypertonie und Typ-2-Diabetes als Beispiel für komplexe Erkrankungen. Kopplungsanalysen haben sich bei der Aufklärung monogener Krankheiten sehr bewährt (Identifizierung der ursächlichen Gene), währenddessen bei komplexen Erkrankungen die aktuellen Entwicklungen hochdichter genomweiter Assoziationsstudien aufgrund ihrer höheren Auflösung im Allgemeinen deutlich erfolgreicher sind (Wellcome Trust Case Control Consortium 2007).

Wichtig bei allen vorgestellten Projekten ist, dass sich Implikationen nicht nur für die von der aufgeklärten Krankheit betroffenen Familien ergeben, sondern auch für Patienten und Familien mit ähnlichen Phänotypen. Durch die Identifizierung des krankheitsverursachenden Gens werden oftmals neue, bisher nicht in Zusammenhang mit der Krankheit vermutete Pathways identifiziert, die in diesen Individuen untersucht werden können. Im vorgestellten Manuskript betraf das

- die Aufklärung der Pelger-Anomalie (Hoffmann et al. 2002), die zur Identifizierung von Mutationen bei der Ichthyosis-Maus (Shultz et al. 2003) und nachfolgend auch bei der Greenberg-Dysplasie des Menschen führte (Waterham et al. 2003) und potentiell Relevanz für Pelger-ähnliche Blutbildveränderungen bei bestimmten Leukämien, Infektionen und Arzneimittel-Nebenwirkungen hat,
- die Aufklärung des Escobar-Syndroms (Hoffmann et al. 2006), die auf den AChR-Pathway als Ursache für ähnliche Manifestationen hinwies (die potentiell medikamentös therapierbar sind) (Engel 2007; Michalk et al. 2008),
- sowie die Kopplung sowohl von Bluthochdruck als auch von Typ-2-Diabetes auf Chromosom 1p36, was auf einen Foundereffekt für das Metabolische Syndrom in diesen benachbarten Populationen oder auf einen Cluster von für das Metabolische Syndrom verantwortliche Sequenzvarianten in dieser Region hindeuten könnte (Hoffmann et al. 2007a).

Für komplexe Erkrankungen stehen mit *high density* SNP-Chips jetzt mehr und mehr die technologischen Voraussetzungen zur Verfügung, den genetischen Beitrag zu multifaktoriellen Störungen erfolgreich zu untersuchen. Bei monogen bedingten Krankheiten werden Kopplungsstudien weiterhin eine wichtige Rolle spielen, um die Krankheitsursache zu finden oder eine indirekte Pränataldiagnostik anbieten zu können. Anreicherungsverfahren wie *Genomic Enrichment* oder direkte Mikrodisektion gekoppelt mit *Next Generation Sequencing* werden es in naher Zukunft ermöglichen, die komplette genetische Information einer Kopplungs- oder Assoziationsregion routinemäßig zu untersuchen und damit kodierende Mutationen aber auch Veränderungen in regulativen Bereichen schnell und systematisch zu detektieren.

Genomweite Re-Sequenzierungsprojekte sind jetzt schon möglich und werden die Aufklärung genetischer Krankheitsursachen zum einen enorm beschleunigen, zum anderen eine Vielzahl noch nicht beschriebener, sozusagen „privater“ Veränderungen identifizieren (Wheeler et al. 2008). Bei der Beurteilung der klinischen Relevanz dieser Sequenzveränderungen können neben bioinformatischen und molekularbiologischen Untersuchungen auch Kopplungsanalysen einen Beitrag leisten. Ist die Familie groß genug, so ist ein Nachweis möglich, ob die zu beurteilende Sequenzveränderung mit der Krankheit co-segregiert (bei kleineren Familien ist oft wenigstens ein Ausschluss möglich). Für komplexe Erkrankungen wird das vermutlich keine so große Rolle spielen, aber z.B. für eine sichere Pränataldiagnostik bei schweren mono- oder oligogen bedingten Krankheiten.

## 5. LITERATURANGABEN AUS DEM FREIEN TEXT

- Abecasis GR, Cherny SS, Cookson WO and Cardon LR. Merlin--rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. *Nat Genet* 30: 97-101, 2002
- Al-Kateb H, Bahring S, Hoffmann K, Strauch K, Busjahn A, Nurnberg G, Jouma M, Bautz EK, Dresel HA and Luft FC. Mutation in the ARH gene and a chromosome 13q locus influence cholesterol levels in a new form of digenic-recessive familial hypercholesterolemia. *Circ Res* 90: 951-8, 2002
- Arcos-Burgos M and Muenke M. Genetics of population isolates. *Clin Genet* 61: 233-47, 2002
- Aznar J and Vaya A. Homozygous form of the Pelger-Huet leukocyte anomaly in man. *Acta Haematol* 66: 59-62, 1981
- Ballen KK, Gilliland DG, Kalish LA and Shulman LN. Bone marrow dysplasia in patients with newly diagnosed acute myelogenous leukemia does not correlate with history of myelodysplasia or with remission rate and survival. *Cancer* 73: 314-21, 1994
- Cai G, Cole SA, Freeland-Graves JH, MacCluer JW, Blangero J and Comuzzie AG. Principal component for metabolic syndrome risk maps to chromosome 4p in Mexican Americans: the San Antonio Family Heart Study. *Hum Biol* 76: 651-65, 2004
- Cohen TV, Klarman KD, Sakchaisri K, Cooper JP, Kuhns D, Anver M, Johnson PF, Williams SC, Keller JR and Stewart CL. The lamin B receptor under transcriptional control of C/EBPepsilon is required for morphological but not functional maturation of neutrophils. *Hum Mol Gen* 17: 2921-33, 2008
- Cordas S and Briner DH. Acquired Pelger-Huet anomaly associated with infectious mononucleosis. *J Am Osteopath Assoc* 66: 1347-55, 1967
- Cox NJ, Frigge M, Nicolae DL, Concannon P, Hanis CL, Bell GI and Kong A. Loci on chromosomes 2 (NIDDM1) and 15 interact to increase susceptibility to diabetes in Mexican Americans. *Nat Genet* 21: 213-5, 1999
- de la Chapelle A. Disease gene mapping in isolated human populations: the example of Finland. *J Med Genet* 30: 857-65, 1993
- Demenais F, Kanninen T, Lindgren CM, Wiltshire S, Galet S, Dandrieux C, Almgren P, Sjogren M, Hattersley A, Dina C, Tuomi T, McCarthy MI, Froguel P and Groop LC. A meta-analysis of four European genome screens (GIFT Consortium) shows evidence for a novel region on chromosome 17p11.2-q22 linked to type 2 diabetes. *Hum Mol Genet* 12: 1865-73, 2003
- Ehret GB, Morrison AC, O'Connor AA, Grove ML, Baird L, Schwander K, Weder A, Cooper RS, Rao DC, Hunt SC, Boerwinkle E and Chakravarti A. Replication of the Wellcome Trust genome-wide association study of essential hypertension: the Family Blood Pressure Program. *Eur J Hum Genet* 16: 1507-11, 2008
- Elston RC, Buxbaum S, Jacobs KB and Olson JM. Haseman and Elston revisited. *Genet Epidemiol* 19: 1-17, 2000
- Elston RC and Stewart J. A general model for the genetic analysis of pedigree data. *Hum Hered* 21: 523-42, 1971
- Engel AG. The therapy of congenital myasthenic syndromes. *Neurotherapeutics* 4: 252-7, 2007
- Escobar V, Bixler D, Gleiser S, Weaver DD and Gibbs T. Multiple pterygium syndrome. *Am J Dis Child* 132: 609-11, 1978a
- Escobar V and Weaver D. Popliteal pterygium syndrome: a phenotypic and genetic analysis. *J Med Genet* 15: 35-42, 1978b
- Gaines P, Tien CW, Olins AL, Olins DE, Shultz LD, Carney L and Berliner N. Mouse neutrophils lacking lamin B-receptor expression exhibit aberrant development and lack critical functional responses. *Exp Hematol* 36: 965-976, 2008
- Geurts JM, Janssen RG, van Greevenbroek MM, van der Kallen CJ, Cantor RM, Bu X, Aouizerat BE, Allayee H, Rotter JI and de Bruin TW. Identification of TNFRSF1B as a novel modifier gene in familial combined hyperlipidemia. *Hum Mol Genet* 9: 2067-74, 2000
- Glenn CL, Wang WY, Benjafeld AV and Morris BJ. Linkage and association of tumor necrosis factor receptor 2 locus with hypertension, hypercholesterolemia and plasma shed receptor. *Hum Mol Genet* 9: 1943-9, 2000
- Gorlova OY, Amos CI, Wang NW, Shete S, Turner ST and Boerwinkle E. Genetic linkage and imprinting effects on body mass index in children and young adults. *Eur J Hum Genet* 11: 425-32, 2003
- Green MC, Shultz LD and Nedzi LA. Abnormal nuclear morphology of leukocytes in the mouse mutant ichthyosis. *Transplantation* 20: 172-5, 1975
- Greenberg CR, Rimoin DL, Gruber HE, DeSa DJ, Reed M and Lachman RS. A new autosomal recessive lethal chondrodystrophy with congenital hydrops. *Am J Med Genet* 29: 623-32, 1988
- Gudbjartsson DF, Jonasson K, Frigge ML and Kong A. Allegro, a new computer program for multipoint linkage analysis. *Nat Genet* 25: 12-3, 2000
- Gudbjartsson DF, Thorvaldsson T, Kong A, Gunnarsson G and Ingolfsdottir A. Allegro version 2. *Nat Genet* 37: 1015-6, 2005
- Hakonarson H, Grant SF, Bradfield JP, Marchand L, Kim CE, Glessner JT, Grabs R, Casalunovo T, Taback SP, Frackelton EC, Lawson ML, Robinson LJ, Skraban R, Lu Y, Chiavacci RM, Stanley CA, Kirsch SE, Rappaport EF, Orange JS, Monos DS, Devoto M, Qu HQ and Polychronakos C. A genome-wide association study identifies KIAA0350 as a type 1 diabetes gene. *Nature* 448: 591-4, 2007
- Hall JG. An approach to congenital contractures (arthrogryposis). *Pediatr Ann* 10: 15-26, 1981
- Hall JG. An approach to research on congenital contractures. *Birth Defects Orig Artic Ser* 20: 8-30, 1984
- Hall JG. Analysis of Pena Shokeir phenotype. *Am J Med Genet* 25: 99-117, 1986

## 5. Literaturangaben aus dem freien Text

- Hall JG. Arthrogryposis multiplex congenita: etiology, genetics, classification, diagnostic approach, and general aspects. *J Pediatr Orthop B* 6: 159-66, 1997
- Hammond E and Donnenfeld AE. Fetal akinesia. *Obstet Gynecol Surv* 50: 240-9, 1995
- Haseman JK and Elston RC. The investigation of linkage between a quantitative trait and a marker locus. *Behav Genet* 2: 3-19, 1972
- Hastings WK. Monte Carlo sampling methods using Markov chains and their applications. *Biometrika* 57: 97-109, 1970
- Haverkamp Begemann N and Van Lookeren Campagne A. Homozygous form of Pelger-Huet's nuclear anomaly in man. *Acta Haematol* 7: 295-303, 1952
- Hesselmans LF, Jennekens FG, Van den Oord CJ, Veldman H and Vincent A. Development of innervation of skeletal muscle fibers in man: relation to acetylcholine receptors. *Anat Rec* 236: 553-62, 1993
- Hoffmann K, Dreger CK, Olins AL, Olins DE, Shultz LD, Lucke B, Karl H, Kaps R, Muller D, Vaya A, Aznar J, Ware RE, Sotelo Cruz N, Lindner TH, Herrmann H, Reis A and Sperling K. Mutations in the gene encoding the lamin B receptor produce an altered nuclear morphology in granulocytes (Pelger-Huet anomaly). *Nat Genet* 31: 410-4, 2002
- Hoffmann K, Mattheisen M, Dahm S, Nurnberg P, Roe C, Johnson J, Cox NJ, Wichmann HE, Wienker TF, Schulze J, Schwarz PE and Lindner TH. A German genome-wide linkage scan for type 2 diabetes supports the existence of a metabolic syndrome locus on chromosome 1p36.13 and a type 2 diabetes locus on chromosome 16p12.2. *Diabetologia* 50: 1418-22, 2007a
- Hoffmann K, Muller JS, Stricker S, Megarbane A, Rajab A, Lindner TH, Cohen M, Chouery E, Adaimy L, Ghanem I, Delague V, Boltshauser E, Talim B, Horvath R, Robinson PN, Lochmuller H, Hubner C and Mundlos S. Escobar syndrome is a prenatal myasthenia caused by disruption of the acetylcholine receptor fetal gamma subunit. *Am J Hum Genet* 79: 303-12, 2006
- Hoffmann K, Sperling K, Olins AL and Olins DE. The granulocyte nucleus and lamin B receptor: avoiding the ovoid. *Chromosoma* 116: 227-35, 2007b
- Hoffmann K, Stassen HH and Reis A. Genkartierung in Isolatpopulationen. *Medizinische Genetik* 428-437, 2000
- Holmer L, Pezhman A and Worman HJ. The human lamin B receptor/sterol reductase multigene family. *Genomics* 54: 469-76, 1998
- Horn LC, Faber R, Meiner A, Piskazec U and Spranger J. Greenberg dysplasia: first reported case with additional non-skeletal malformations and without consanguinity. *Prenat Diagn* 20: 1008-11, 2000
- Huët G. Familiale anomalie der leucocyten. *Ned Tijdschr Geneesk* 75: 4959, 1931
- Iwasaki N, Cox NJ, Wang YQ, Schwarz PE, Bell GI, Honda M, Imura M, Ogata M, Saito M, Kamatani N and Iwamoto Y. Mapping genes influencing type 2 diabetes risk and BMI in Japanese subjects. *Diabetes* 52: 209-13, 2003
- Johansson EO. The Pelger Anomaly: Genetic, Cytologic and Epidemiologic Aspects of Some Data from Sweden. Thesis, Uppsala University 1963
- Juneja SK, Matthews JP, Luzinat R, Fan Y, Michael M, Rischin D, Millward MJ and Toner GC. Association of acquired Pelger-Huet anomaly with taxoid therapy. *Br J Haematol* 93: 139-41, 1996
- Karl H. Die besondere Häufung von Merkmalsträgern der Pelger-Huet-Kernanomalie der Leukozyten in Gelenau im Erzgebirge. Thesis, Humboldt University Berlin 1967
- Kong A and Cox NJ. Allele-sharing models: LOD scores and accurate linkage tests. *Am J Hum Genet* 61: 1179-88, 1997
- Kruglyak L, Daly MJ, Reeve-Daly MP and Lander ES. Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach. *Am J Hum Genet* 58: 1347-63, 1996
- Kunze P. Kurze Geschichte der Sorben: Ein kulturhistorischer Überblick. Domowina Verlag 1997
- Lander E and Kruglyak L. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet* 11: 241-7, 1995
- Lander ES and Botstein D. Homozygosity mapping: a way to map human recessive traits with the DNA of inbred children. *Science* 236: 1567-70, 1987a
- Lander ES and Green P. Construction of multilocus genetic linkage maps in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 2363-7, 1987b
- May RB and Sunder TR. Hematologic manifestations of long-term valproate therapy. *Epilepsia* 34: 1098-101, 1993
- Metropolis N, Rosenbluth AW, Marshall N, Rosenbluth MN, Teller AH and Teller E. Equation of State Calculations by Fast Computing Machines. *Journal of Chemical Physics* 21: 1087-1092, 1953
- Metropolis N and Ulam S. The Monte Carlo method. *J Am Stat Assoc* 44: 335-41, 1949
- Michalk A, Stricker S, Becker J, Rupps R, Pantzar T, Miertus J, Botta G, Naretto VG, Janetzki C, Yaqoob N, Ott CE, Seelow D, Wieczorek D, Fiebig B, Wirth B, Hoopmann M, Walther M, Korber F, Blankenburg M, Mundlos S, Heller R and Hoffmann K. Acetylcholine receptor pathway mutations explain various fetal akinesia deformation sequence disorders. *Am J Hum Genet* 82: 464-76, 2008
- Missias AC, Mudd J, Cunningham JM, Steinbach JH, Merlie JP and Sanes JR. Deficient development and maintenance of postsynaptic specializations in mutant mice lacking an 'adult' acetylcholine receptor subunit. *Development* 124: 5075-86, 1997
- Mitchell GF, DeStefano AL, Larson MG, Benjamin EJ, Chen MH, Vasan RS, Vita JA and Levy D. Heritability and a genome-wide linkage scan for arterial stiffness, wave reflection, and mean arterial pressure: the Framingham Heart Study. *Circulation* 112: 194-9, 2005

## 5. Literaturangaben aus dem freien Text

- Morgan NV, Brueton LA, Cox P, Greally MT, Tolmie J, Pasha S, Aligianis IA, van Bokhoven H, Marton T, Al-Gazali L, Morton JE, Oley C, Johnson CA, Trembath RC, Brunner HG and Maher ER. Mutations in the embryonal subunit of the acetylcholine receptor (CHRNA3) cause lethal and Escobar variants of multiple pterygium syndrome. *Am J Hum Genet* 79: 390-5, 2006
- Morton NE. Sequential tests for the detection of linkage. *Am J Hum Genet* 7: 277-318, 1955
- Morton NE. Significance levels in complex inheritance. *Am J Hum Genet* 62: 690-7, 1998
- Nachtsheim H. Die Pelger-Anomalie und ihre Vererbung bei Mensch und Tier. *Der Erbarzt* 11: 129-142, 1943
- Ott J. Estimation of the recombination fraction in human pedigrees: efficient computation of the likelihood for human linkage studies. *Am J Hum Genet* 26: 588-97, 1974
- Ott J and Bhat A. Linkage analysis in heterogeneous and complex traits. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 8 Suppl 3: 43-6, 1999
- Palmer LJ, Jacobs KB and Elston RC. Haseman and Elston revisited: the effects of ascertainment and residual familial correlations on power to detect linkage. *Genet Epidemiol* 19: 456-60, 2000
- Pausova Z, Gaudet D, Gossard F, Bernard M, Kaldunski ML, Jomphe M, Tremblay J, Hudson TJ, Bouchard G, Kotchen TA, Cowley AW and Hamet P. Genome-wide scan for linkage to obesity-associated hypertension in French Canadians. *Hypertension* 46: 1280-5, 2005
- Pelger K. Demonstratie van een paar zeldzaam voorkomende typen van bloedlichaampjes en bespreking der patienten. *Ned Tijdschr Geneesk* 72: 1928
- Peltonen L, Jalanko A and Varilo T. Molecular genetics of the Finnish disease heritage. *Hum Mol Genet* 8: 1913-23, 1999
- Peltonen L, Pekkarinen P and Aaltonen J. Messages from an isolate: lessons from the Finnish gene pool. *Biol Chem Hoppe Seyler* 376: 697-704, 1995
- Polizzi A, Huson SM and Vincent A. Teratogen update: maternal myasthenia gravis as a cause of congenital arthrogryposis. *Teratology* 62: 332-41, 2000
- Puppala S, Dodd GD, Fowler S, Arya R, Schneider J, Farook VS, Granato R, Dyer TD, Almasy L, Jenkinson CP, Diehl AK, Stern MP, Blangero J and Duggirala R. A genomewide search finds major susceptibility loci for gallbladder disease on chromosome 1 in Mexican Americans. *Am J Hum Genet* 78: 377-92, 2006
- Rajab A, Hoffmann K, Ganesh A, Sethu AU and Mundlos S. Escobar variant with pursed mouth, creased tongue, ophthalmologic features, and scoliosis in 6 children from Oman. *Am J Med Genet A* 134A: 151-7, 2005
- Sainty D, Liso V, Cantu-Rajoldi A, Head D, Mozziconacci MJ, Arnoulet C, Benattar L, Fenu S, Mancini M, Duchayne E, Mahon FX, Gutierrez N, Birg F, Biondi A, Grimwade D, Lafage-Pochitaloff M, Hagemeijer A and Flandrin G. A new morphologic classification system for acute promyelocytic leukemia distinguishes cases with underlying PLZF/RARA gene rearrangements. *Blood* 96: 2000
- Saxena R, Voight BF, Lyssenko V, Burt NP, de Bakker PI, Chen H, Roix JJ, Kathiresan S, Hirschhorn JN, Daly MJ, Hughes TE, Groop L, Altshuler D, Almgren P, Florez JC, Meyer J, Erdos MR, Bengtsson Bostrom K, Isomaa B, Lettre G, Lindblad U, Lyon HN, Melander O, Newton-Cheh C, Nilsson P, Orho-Melander M, Rastam L, Speliotes EK, Taskiran MR, Tuomi T, Guiducci C, Berglund A, Carlson J, Gianniny L, Hackett R, Hall L, Holmkvist J, Laurila E, Sjogren M, Sterner M, Surti A, Svensson M, Tewhey R, Blumenstiel B, Parkin M, Defelice M, Barry R, Brodeur W, Camarata J, Chia N, Fava M, Gibbons J, Handsaker B, Healy C, Nguyen K, Gates C, Sougnez C, Gage D, Nizzari M, Gabriel SB, Chirn GW, Ma Q, Parikh H, Richardson D, Rieck D and Purcell S. Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science* 316: 1331-6, 2007
- Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, Willer CJ, Li Y, Duren WL, Erdos MR, Stringham HM, Chines PS, Jackson AU, Prokunina-Olsson L, Ding CJ, Swift AJ, Narisu N, Hu T, Pruim R, Xiao R, Li XY, Conneely KN, Riebow NL, Sprau AG, Tong M, White PP, Hetrick KN, Barnhart MW, Bark CW, Goldstein JL, Watkins L, Xiang F, Saramies J, Buchanan TA, Watanabe RM, Valle TT, Kinnunen L, Abecasis GR, Pugh EW, Doheny KF, Bergman RN, Tuomilehto J, Collins FS and Boehnke M. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science* 316: 1341-5, 2007
- Shenkenberg TD, Rice L and Waddell CC. Acquired Pelger-Huet nuclear anomaly with tuberculosis. *Arch Intern Med* 142: 153-4, 1982
- Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, Gott B, Samuels R, Schweitzer PA, Dreger C, Herrmann H, Kalscheuer V, Olins AL, Olins DE, Sperling K and Hoffmann K. Mutations at the mouse ichthyosis locus are within the lamin B receptor gene: a single gene model for human Pelger-Huet anomaly. *Hum Mol Genet* 12: 61-9, 2003
- Siegert E, Beier L and Grabner H. [Homozygotic Pelger-Huet anomaly]. *Kinderarztl Prax* 51: 164-9, 1983
- Sobel E and Lange K. Descent graphs in pedigree analysis: applications to haplotyping, location scores, and marker-sharing statistics. *Am J Hum Genet* 58: 1323-37, 1996
- Sobel E, Papp JC and Lange K. Detection and integration of genotyping errors in statistical genetics. *Am J Hum Genet* 70: 496-508, 2002
- Sobel E, Sengul H and Weeks DE. Multipoint estimation of identity-by-descent probabilities at arbitrary positions among marker loci on general pedigrees. *Hum Hered* 52: 121-31, 2001
- Takahashi M, Kubo T, Mizoguchi A, Carlson CG, Endo K and Ohnishi K. Spontaneous muscle action potentials fail to develop without fetal-type acetylcholine receptors. *EMBO Rep* 3: 674-81, 2002
- Terwilliger JD, Zollner S, Laan M and Paabo S. Mapping genes through the use of linkage disequilibrium generated by genetic drift: 'drift mapping' in small populations with no demographic expansion. *Hum Hered* 48: 138-54, 1998
- Undritz E. Das Pelger-Huetsche Blutbild beim Tier und seine Bedeutung für die Entwicklungsgeschichte des Blutes. *Schweiz Med Wochenschr* 1177-1186, 1939

### 5. Literaturangaben aus dem freien Text

- Undritz E. Das ausschliessliche Vorkommen reifer rundkerniger Leukozyten bei der reingezüchteten Pelger-Huetschen des Kaninchens und die Bedeutung der Pelger-Leukozyten in der vergleichenden Hämatologie. *Folia Haemat* 67: 249-291, 1943
- Voruganti VS, Goring HH, Diego VP, Cai G, Mehta NR, Haack K, Cole SA, Butte NF and Comuzzie AG. Genome-wide Scan for Serum Ghrelin Detects Linkage on Chromosome 1p36 in Hispanic Children: Results From the Viva La Familia Study. *Pediatr Res Publish Ahead of Print*: 2007
- Wassif CA, Brownson KE, Sterner AL, Forlino A, Zervas PM, Wilson WK, Starost MF and Porter FD. HEM dysplasia and ichthyosis are likely laminopathies and not due to 3beta-hydroxysterol Delta14-reductase deficiency. *Hum Mol Genet* 16: 1176-87, 2007
- Waterham HR, Koster J, Mooyer P, Noort Gv G, Kelley RI, Wilcox WR, Wanders RJ, Hennekam RC and Oosterwijk JC. Autosomal recessive HEM/Greenberg skeletal dysplasia is caused by 3 beta-hydroxysterol delta 14-reductase deficiency due to mutations in the lamin B receptor gene. *Am J Hum Genet* 72: 1013-7, 2003
- Weeks DE and Lange K. The affected-pedigree-member method of linkage analysis. *Am J Hum Genet* 42: 315-26, 1988
- Wellcome Trust Case Control Consortium WT. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 447: 661-78, 2007
- Wheeler DA, Srinivasan M, Egholm M, Shen Y, Chen L, McGuire A, He W, Chen YJ, Makhijani V, Roth GT, Gomes X, Tartaro K, Niazi F, Turcotte CL, Irzyk GP, Lupski JR, Chinault C, Song XZ, Liu Y, Yuan Y, Nazareth L, Qin X, Muzny DM, Margulies M, Weinstock GM, Gibbs RA and Rothberg JM. The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. *Nature* 452: 872-6, 2008
- Whittemore AS and Halpern J. A class of tests for linkage using affected pedigree members. *Biometrics* 50: 118-27, 1994
- Wiltshire S, Cardon LR and McCarthy MI. Evaluating the results of genomewide linkage scans of complex traits by locus counting. *Am J Hum Genet* 71: 1175-82, 2002
- Ye Q, Callebaut I, Pezhman A, Courvalin JC and Worman HJ. Domain-specific interactions of human HP1-type chromodomain proteins and inner nuclear membrane protein LBR. *J Biol Chem* 272: 14983-9, 1997
- Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, Frayling TM, Elliott KS, Lango H, Timpson NJ, Perry JR, Rayner NW, Freathy RM, Barrett JC, Shields B, Morris AP, Ellard S, Groves CJ, Harries LW, Marchini JL, Owen KR, Knight B, Cardon LR, Walker M, Hitman GA, Morris AD, Doney AS, McCarthy MI and Hattersley AT. Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science* 316: 1336-41, 2007
- Zwergler M, Herrmann H, Gaines P, Olins AL and Olins DE. Granulocytic nuclear differentiation of lamin B receptor-deficient mouse EPRO cells. *Exp Hematol* 36: 977-987, 2008

## **DANKSAGUNG**

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Professor Stefan Mundlos, der mich großzügig unterstützt hat, meinen eigenen Forschungsschwerpunkt zu entwickeln. Ebenso fördernd hat Professor Karl Sperling meinen wissenschaftlichen Weg begleitet.

Professor Friedrich Luft, Professor André Reis und Professor Thomas Wienker haben mich ursprünglich für die Genetik begeistert. Eine Entscheidung, die ich nie bereut habe. Wilfried Gunia, Tom Lindner, Gudrun Nürnberg, Peter Nürnberg, Jens Reich und Franz Rüschenhof halfen mir, mich im Genom zurechtzufinden.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei den Patienten und deren Angehörigen für ihre Mitarbeit, ihr Vertrauen und die daraus resultierende Motivation, auch schwierige Forschungsphasen zu überwinden.

Die Zusammenarbeit mit den die Patienten betreuenden Ärzten ist für mich außerordentlich wichtig. Sehr geholfen haben mir Eugen Boltshauser, Luitgard Graul-Neumann, Judith Hall, Raoul Heller, Denise Horn, Christoph Hübner, Jürgen Kunze, Barbara Nonnast-Daniel, André Megarbane, Anna Rajab, Stavit Shalev und Martin Zschornack.

Mit Yossi Grünbaum, Harald Hermann, Heidemarie Neitzel, Ada und Don Olins, Michaela Reichenzeller, Markus Schülke, Len Shultz, Hans Stassen, Sigmar Stricker und Monika Zwerger habe ich lange Abende über mögliche pathogenetische Mechanismen diskutiert – und Jahre daran gearbeitet.

Danken möchte ich den Mitarbeitern des Genkartierungszentrums am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, des Institutes für Medizinische Genetik, des Institutes für Humangenetik sowie des Max-Planck-Institutes für Molekulare Genetik in Berlin, insbesondere Carola Dietrich, Heike Fischer, Catrin Janetzki, Mohsen Karbasiyan, Barbara Lucke, Dominik Seelow, Madeleine Skorna und Raymonda Varon sowie meinen Doktorandinnen Maria Arelin, Sevji Baasanjav, Sophia Gravemann, Anne Michalk und Nele Schnipper.

Diese Habilitation entstand im Rahmen des Rahel-Hirsch-Stipendiums. Der Charité und Professor Wauer gebührt mein Dank für diese wichtige Förderung. Das Charité Mentoring-Programm half mir, Prioritäten zu setzen und zu verwirklichen. Professor Bernd Dörken stand immer kritisch und ermutigend hinter mir. Professor Erika Gromnica-Ihle, Professor Eddy Rubin und Professor Gert Utermann halfen mit ihrem ehrlichen und konstruktiven Rat.

Ganz besonders danken möchte ich meinen Eltern, Tom und meinen Freunden.

## **ERKLÄRUNG**

Gemäß § 4 Abs. 3 (k)  
der Habilitationsordnung der Medizinischen Fakultät der Charité Universitätsmedizin Berlin

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde.
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, 15. Dezember 2008

Dr. med. Katrin Hoffmann