

Aus dem Institut für Humangenetik
des Universitätsklinikums Eppendorf
Direktor Prof. Dr. med. Andreas Gal

**Mutationsscreening des Gens RLBP1 für das
humane zelluläre Retinaldehyd-bindende Protein
(CRALBP) bei Patienten mit autosomal-rezessiv
vererbter Retinitis pigmentosa**

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich der Universität Hamburg vorgelegt von
Jens Carsten Ritter
aus Hilden
Hamburg, im Jahre 2001

Angenommen von dem Fachbeich Medizin
der Universität Hamburg am: 11.07.2002

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Dekan: Prof. Dr. C. Wagener

Referent: Prof. Dr. A. Gal

mündliche Prüfung: 25.07.2002

Meiner Mutter
Meinem Vater
Meinem Bruder

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VI
Figurenverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
1.1 Biologische Grundlagen	1
1.1.1 Aufbau und Funktion der Retina	1
1.1.2 Der Sehvorgang	3
1.1.3 Das retinale Pigmentepithel (RPE)	6
1.2 Retinitis pigmentosa	6
1.2.1 Pathophysiologie	6
1.2.2 Klinik	7
1.2.3 Allgemeine Genetik	8
1.2.4 Therapie und Prognose	10
1.3 Spezielle genetische Grundlagen	11
1.3.1 RLBP1	11

1.3.2 CRALBP	11
A) Molekülstruktur	12
B) Funktionshypothesen	12
1.4 Konzept der Dissertation	13
2. Material und Methoden	15
2.1 Material	15
2.1.1 Patientenkollektiv	15
2.1.2 Chemikalien	15
2.1.3 Puffer und Lösungen	16
2.1.4 Enzyme	17
2.1.5 Oligonukleotid Primer	17
2.1.6 Andere Materialien	19
2.1.7 Apparat	19
2.2 Methoden	20
2.2.1 Amplifikation der kodierenden Abschnitte des RLBP1-Gens aus menschlicher genomischer DNA mittels Polymeraseket- tenreaktion (PCR)	20
2.2.2 Agarosegelelektrophorese zur qualitativen und quantitativen Kontrolle der PCR-Produkte	22
2.2.3 SSCP	23
2.2.4 Heteroduplices	25

2.2.5 Haplotypenanalyse mittels polymorpher Mikrosatellitenmarker	25
2.2.6 Sequenzierung	27
2.2.7 Mutationsanalyse mittels Restriktionsenzymverdau	28
2.2.8 Splice Score Berechnung	29
2.2.9 Nucleotidsequenzen	30
3. Ergebnisse	31
3.1. Untersuchungen im Exon 2	31
3.1.1 Substitution 853G/A	31
3.1.2. Restliche Patienten	32
3.2. Untersuchungen im Exon 3	32
3.3. Untersuchungen im Exon 4	32
3.3.1. Deletion 2778del6	32
3.3.2 Substitution 2733C/T	35
3.3.3. Substitution 2736A/C	36
3.3.4 Substitution 2657C>T	36
3.3.5 Substitution 2684C>T	37
3.3.6 Restliche Patienten	38
3.4. Untersuchungen im Exon 5	39
3.4.1. Substitution 4763G>A	39

3.4.2 Restliche Patienten	39
3.5. Untersuchungen im Exon 6	39
3.5.1 Deletion 8518delG	39
3.5.2 Restliche Patienten	42
3.6. Untersuchungen im Exon 7	43
3.6.1 Substitution 9057C/T	43
3.6.2. Restliche Patienten	43
3.7 Untersuchungen im Exon 8	43
3.7.1. Untersuchungen im Exonteilstück 8a	43
3.7.2. Untersuchungen im Exonteilstück 8b	44
3.7.2.1 Substitution 9772G/T	44
3.7.2.2. Substitution 9901G/A	44
3.7.2.3. Restliche Patienten	44
4. Diskussion	46
4.1 Diskussion der Ergebnisse	46
4.2 Ausblick	53
5. Zusammenfassung	56
6. Literaturverzeichnis	58

7. Anhang	65
7.1 Danksagung	65
7.2 Lebenslauf	66
7.3 Erklärung	67

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schema der Retina	2
Abbildung 2 Histologie der Retina	3
Abbildung 3 PAAG-Gel 2778del6	33
Abbildung 4 Sequenz und Kontrolle 2778del6	33
Abbildung 5 Familienanalyse 2778del6	34
Abbildung 6 Haplotypenanalyse mit D15S652 und D15S653	35
Abbildung 7 Sequenz und Kontrolle 2657C>T	37
Abbildung 8 Sequenz und Kontrolle 2684C>T	38
Abbildung 9 PAAG-Gel 8518delG	40
Abbildung 10 Sequenz und Kontrolle 8518delG	40
Abbildung 11 Familienanalyse 8518delG	41

Figurenverzeichnis

Figur 1 Phototransduktionsprozess	4
Figur 2 Rolle der Retinoide	5
Figur 3 Stammbaum Patient #535	42

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1 Sequenzen der RLBP1 Primer	18
Tabelle 2-2 PCR Protokolle der Exons 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8a, 8b	22
Tabelle 2-3 Amplifizierungsschema der PCR zur Haplotypenanalyse	27
Tabelle 2-4 Wertekala zur Splice Score Berechnung	30
Tabelle 3-1 Übersicht der gefundenen Sequenzvarianten	45

Abkürzungsverzeichnis

A	= Adenin
ad	= autosomal dominant
Ala	= Alanin
ar	= autosomal rezessiv
Arg	= Arginin
bp	= Basenpaare
C	= Cytosin
cDNA	= codierende DNA
cGMP	= zyklisches GMP
cM	= Centimorgan
CRALBP	= zelluläres Retinaldehyd-bindendes Protein
DNA	= Desoxyribonucleinsäure
ERG	= Elektroretinogramm
G	= Guanin
gDNA	= genomische DNA
GDP	= Guanin Diphosphat
Glu	= Glutamin
GMP	= Guanin Monophosphat
GTP	= Guanin Triphosphat
Leu	= Leucin
mM	= Millimol
NTP	= Nucleotidmix
PAA	= Polyacrylamid
PAAG	= Polyacrylamid plus Glycerin
PDE	= Phosphodiesterase
RP	= Retinitis Pigmentosa
PCR	= Polymerasekettenreaktion
RHO	= Rhodopsin Gen
ROM1	= Zapfen-Außensegment-Protein 1
RPE	= retinales Pigmentepithel
Ser	= Serin

SSCP	= Single-Strand confirmation polymorphism
T	= Thymin
TBE	= Tris/Borsäure/EDTA-Puffer
TEMED	= N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Val	= Valin
VNTR	= variable number of tandem repeats

1. Einleitung

Zum besseren Verständnis und Behandlung der Netzhautdystrophien stellen sich drei wichtige Aufgaben an die Forschung: Zum einen müssen die Gene identifiziert und charakterisiert werden, deren Mutationen für dieses Krankheitsbild ursächlich sind. Zum zweiten gilt es zu verstehen, wie Mutationen in diesen Genen letztendlich zum Untergang der Photorezeptorzellen im Verlauf der Krankheit führen. Die dritte Aufgabe ist es wirksame Therapien gegen die Krankheit zu finden, die zur Prävention, Milderung des Verlaufes oder gar Heilung taugen.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der grundlegenden ersten der erwähnten Aufgaben. Es wird das Gen RLBP1, welches für das Retinaldehyd bindende Protein codiert, auf Sequenzveränderungen untersucht, die mit der autosomal rezessiv vererbten Krankheit Retinitis pigmentosa in Zusammenhang stehen könnten.

1.1 Biologische Grundlagen

1.1.1 Aufbau und Funktion der Retina

In der Embryonalphase wächst aus den Zellen des vorderen Medullarrohres die primäre Augenblase als paariges Organ hervor. Die distale Wand stülpt sich ein und bildet dadurch die sekundäre Augenblase. Ihr Stiel wird zum Sehnerv, die innere, eingestülpte Zelllage zur sensorischen Netzhaut und die äußere Zelllage zum retinalen Pigmentepithel [43]. Die Netzhaut besteht aus drei hintereinander geschalteten Neuronen und kann histologisch in sieben Schichten eingeteilt werden (vgl. Abb.1). Dem Pigmentepithel anliegend finden sich die Photorezeptorzellen (Rezeptorschicht), die zentral in der Macula densa gelegenen Zapfen und die in der Peripherie angeordneten Stäbchen, die das erste Neuron darstellen und deren Zellkerne der zweiten histologischen Schicht (äußere Körnerschicht) entsprechen. Die zweite Reihe der Neuronen beinhaltet die bipolaren Zellen, deren Fortsätze die Signale

aus der Rezeptorschicht empfangen und an die Ganglienzellen (drittes Neuron) weiterleiten. Histologisch stellen sie die äußere plexiforme (distale Dendriten), die innere Körner- (Perikarya) und die innere plexiforme Schicht (proximale Dendriten) dar. Das dritte Neuron sind die Ganglienzellen (Ganglienzellschicht), deren Axone die Netzhaut zum Glaskörper hin begrenzen (Nervenfaserschicht). Die Axone aller Ganglienzellen treffen sich an der Papille und vereinigen sich zum Sehnerv.

Darüber hinaus kommen in der Retina noch drei weitere Zellarten vor, die eher diffus verteilt sind und deren Funktion noch nicht genau geklärt ist (vgl. Abb.2): Die Horizontalzellen stellen den Kontakt zwischen den Photorezeptoren her. Die amakrinen Zellen sind Interneurone, die sowohl mit den Ganglienzellen, als auch mit den bipolaren Zellen in Verbindung stehen. Schließlich gibt es noch die Müllerschen Stützzellen, welche Gliazellen sind, die sich von der äußeren bis zur inneren Grenzmembran der Retina erstrecken [36].

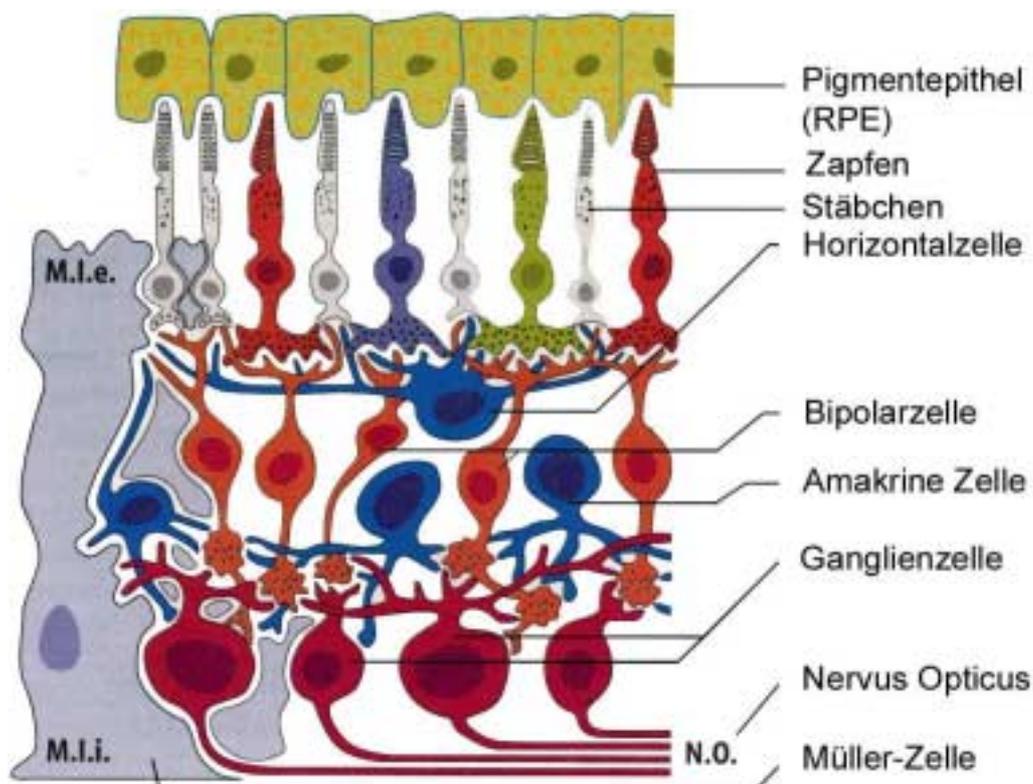


Abbildung 1 Schema der Retina

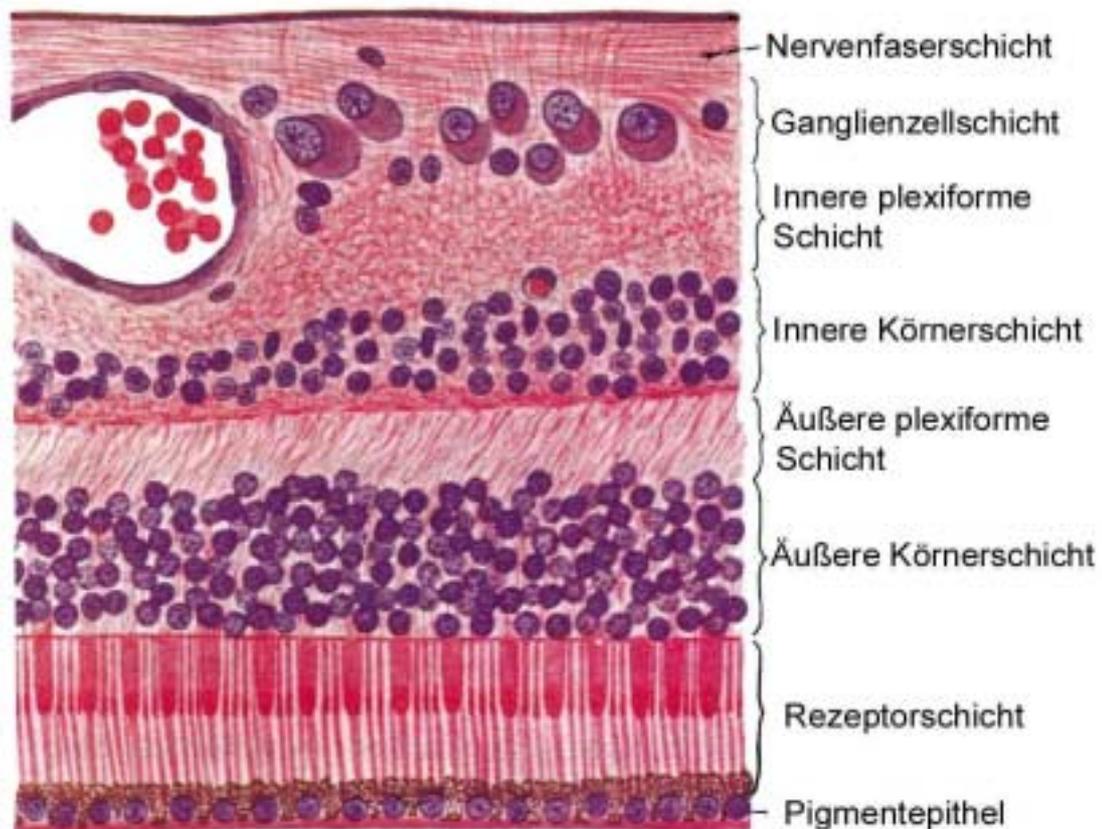


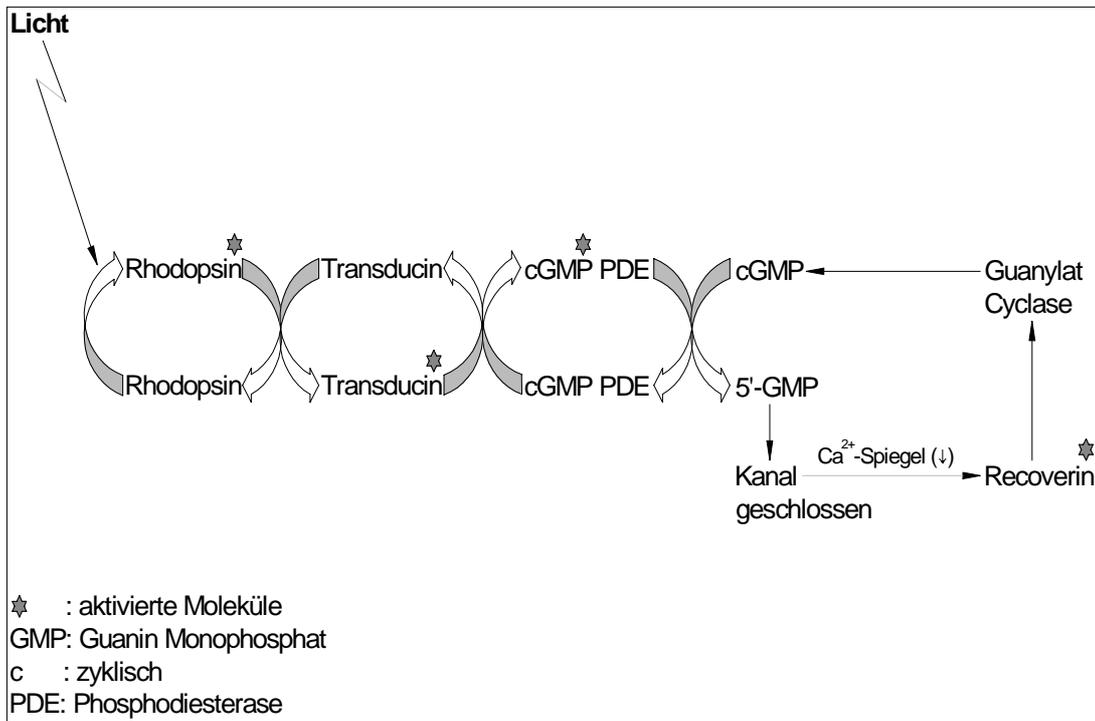
Abbildung 2 Histologie der Retina

In Abbildung 1 ist die schematische (entnommen aus Schmidt, Thews, Die Physiologie des Menschen [29]), in Abbildung 2 die histologische (entnommen aus Lippert, Anatomie [44]) Darstellung der Retina gezeigt.

1.1.2 Der Sehvorgang

Der Phototransduktionsprozess besteht aus acht Hauptschritten. Zuerst wird Rhodopsin (11-cis-Retinal gebunden an Opsin) in den Photorezeptoren durch Licht aktiviert. Durch eine GTP-GDP Austauschreaktion mit Transducin wird aktiviertes alpha-Transducin freigesetzt, welches wiederum das Enzym cGMP-Phosphodiesterase (PDE) aktiviert. PDE hydrolysiert dann das cGMP; zytoplasmatisches cGMP wird verbraucht und der cGMP-gesteuerte Ionenkanal der Photorezeptoren schließt sich. Das induziert die Hyperpolarisation der Plasmamembran des Rezeptors und initiiert das Signal

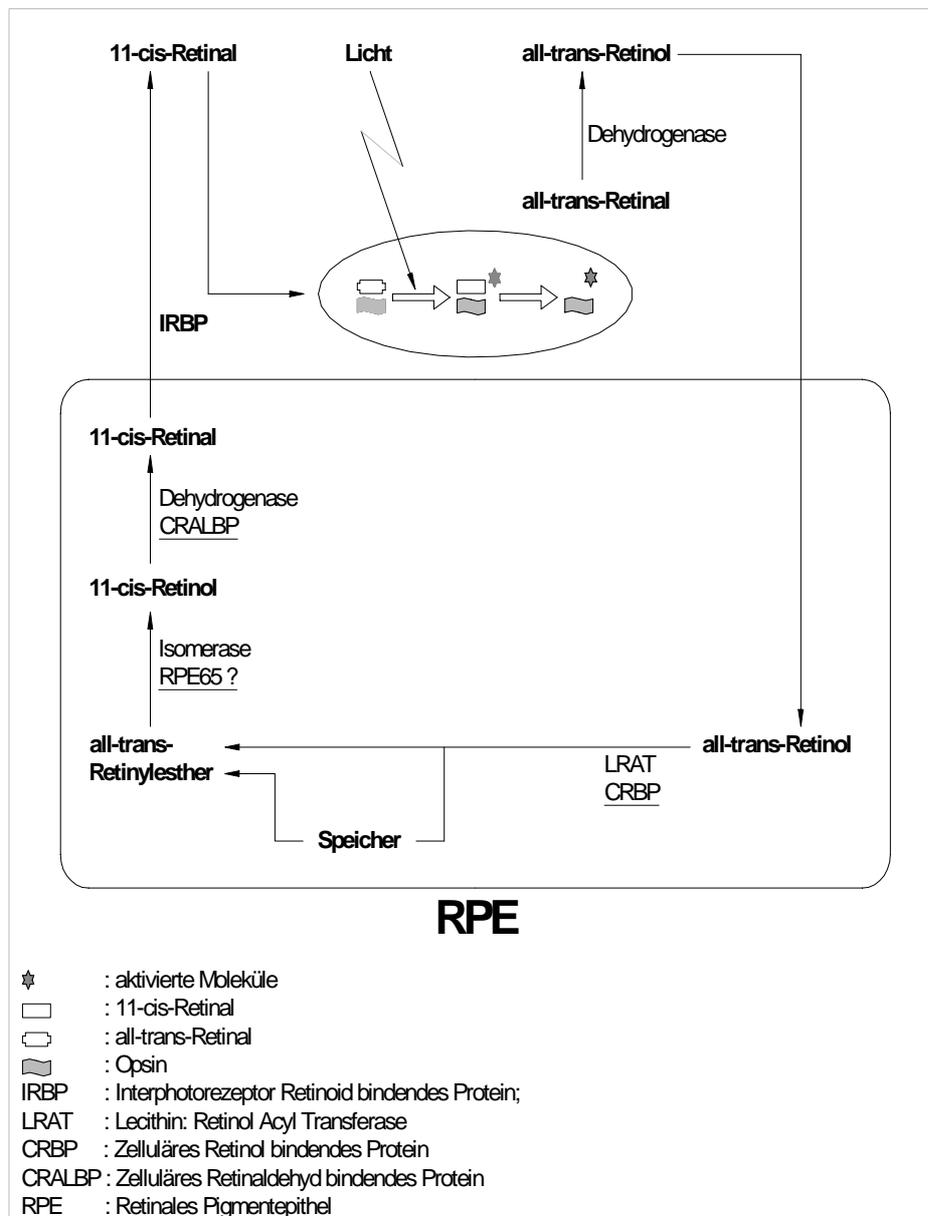
zur neuralen Transduktion des Sehreizes. Die abfallenden Ca^{2+} Spiegel stimulieren Recoverin, welches seinerseits die Guanylat Cyclase aktiviert. cGMP steigt im Zytoplasma wieder an und der cGMP gekoppelte Ionenkanal öffnet sich wieder [62]. Bildlich veranschaulicht ist dieser Prozess in Figur 1.



Figur 1 Phototransduktionsprozess

In dem oben beschriebenen Prozess existiert noch ein wichtiger Nebenschritt: Bei der Aktivierung von Rhodopsin wird das 11-cis-Retinal zu all-trans Retinol umgewandelt. Dieses wird vom Opsin durch eine Dehydrogenase abgespalten und als all-trans-Retinol in dem retinalen Pigmentepithel (RPE) zur Regeneration aufgenommen. Zum Überwinden der RPE Membran ist in jedwede Richtung das Interphotorezeptor Retinoid-bindende Protein (IRBP) nötig. In den Zellen des RPE wird in Anwesenheit des zellulären Retinol-bindenden Proteins (CRBP) durch die Lecithin-Retinol-Acyl-Transferase (LRAT) das all-trans-Retinol in all-trans-Retinylolester esterifiziert. Diese Form kann im RPE gespeichert werden. Der nicht gespeicherte all-trans-Retinylolester wird dann durch eine Isomerase,

wahrscheinlich in Anwesenheit des Proteins RPE65, in 11-cis-Retinal umgewandelt. In einem letzten Schritt wird 11-cis-Retinal unterstützt vom zellulären Retinaldehyd bindenden Protein (CRALBP) zu 11-cis-Retinal oxidiert, welches von den Photorezeptoren wieder aufgenommen werden kann und somit bei der Sehkaskade wieder zur Verfügung steht [69]. Vgl. Figur 2.



Figur 2 Rolle der Retinoide

1.1.3 Das retinale Pigmentepithel (RPE)

Das RPE ist eine Zellschicht, die zwischen dem kapillären Bett der Chorioidea und den Photorezeptoren der Retina liegt. Entsprechend vielseitig sind seine Aufgaben. Zum einen phagozytiert es beschädigte distale Anteile der Photorezeptoren und trägt somit zur Erneuerung dieser Organellen bei. Ohne diese Funktion käme es unweigerlich zum Untergang der Photorezeptoren [5]. Zum anderen hat es einen entscheidenden Anteil an der Aufnahme, dem Processing und dem Transport von Retinoiden. Dabei wird Retinol, bzw. werden seine Derivate zwischen den Photorezeptoren und dem RPE verschoben. Die ganzen Vorgänge dienen der Regeneration des 11-cis-Retinaldehydes [5]. Dafür sind im RPE stationierte Proteine notwendig, die in diesem Prozess verschiedene Aufgaben erfüllen. Die einzelnen Schritte wurden bereits in 1.1.2 dargelegt und in Fig. 2 bildlich veranschaulicht. Es liegt also nahe einen Zusammenhang zwischen Schädigungen im und am RPE mit Krankheiten, die mit Visusverlust einhergehen, herzustellen [9].

1.2 Retinitis pigmentosa

Retinitis pigmentosa (RP) steht für eine Gruppe von hereditären degenerativen Augenerkrankungen. Sie hat eine Prävalenz von etwa 1: 4000 weltweit.

1.2.1 Pathophysiologie

Alle Formen der RP führen zum deutlichen Visusverlust des Patienten. Bei dieser Erkrankung kommt es zu einer Degeneration der Stäbchen in der Rezeptorschicht der Retina. Die primären pathophysiologischen Veränderungen sind klinisch zunächst schwer nachzuweisen, da sie sich auf molekularer Ebene abspielen. Wie es genau zu dem Untergang der Photorezeptoren kommt, ist noch nicht geklärt [37]. Allerdings gibt es einige interessante Theorien über den Mechanismus. Chang oder Lolley et al.

diskutieren den selbstinduzierten Zelltod, Apoptose, als pathophysiologische Ursache des Rezeptorzellunterganges. Sie haben beobachtet, daß im Zusammenhang mit einer durch verschiedene Genmutationen ausgelösten retinalen Degeneration der Zelluntergang Apoptose vermittelt ist [13,45]. Jones et al. konnten sogar eine vermehrte Expression eines im Apoptosegenkomplex vorhandenen Genes bei einigen Formen der RP nachweisen [35].

Desweiteren gibt es Hinweise, daß Licht selber, im Sinne eines phototoxischen Cofaktors, am Untergang der Photorezeptoren bei zumindest einigen Formen der RP eine Rolle spielt [31].

1.2.2 Klinik

Entsprechend der Pathophysiologie präsentiert sich auch die Klinik. Die Patienten erleben den graduellen Funktionsverlust der Stäbchen, die -für das Nachtsehen verantwortlich- in der Retinaperipherie angeordnet sind, mit einer langsamen Einschränkung des Gesichtsfeldes (dem sogenannten Tunnelblick) und Nachtblindheit. In den meisten Fällen bildet sich ebenfalls ein Katarakt aus. Das skotopische Elektroretinogramm (ERG), das elektrische Aktivität der Retina ausgelöst durch Lichtblitze mißt, ist in frühen Stadien abnormal und wird mit der Zeit unregistrierbar [6]. Je nach genetischer Ätiologie der Krankheit kommt es zu einem frühen Eintritt mit raschem Verlauf, gelegentlich kombiniert mit anderen Organerkrankungen in Form von Syndromen (z.B. Refsum-Syndrom [54] oder Usher-Syndrom [39]), oder zu einer späteren Manifestation mit milderer Verlaufsform.

Bei der klinischen Untersuchung erkennt man zusätzlich in der Ophthalmoskopie dunkle, fleckförmige Degenerationsherde auf der Retina. Dieses Phänomen führte zu der Namensgebung.

1.2.3 Allgemeine Genetik

Bei RP gibt es drei Vererbungsformen, die zu unterschiedlichen Anteilen vorkommen:

Die autosomal dominante Form (adRP), die häufig eine geringe phänotypische Manifestation mit sich bringt und somit einen relativ milden Krankheitsverlauf mit spätem onset präsentiert. Sie hat einen Anteil von ca. 19% aller Fälle [6].

Die X-chromosomal rezessive Form wird mit einem Anteil von ca. 8% angegeben [6].

Die autosomal rezessive Form (arRP), zu der auch die meisten mit RP assoziierten Syndrome gehören, zeigt einen frühen onset und raschen Verlauf des Symptomkomplexes [10] und stellt einen Anteil von mindestens 20% [6].

Der restliche Anteil kann keinem der Vererbungsmodi zugeordnet werden (Simplex-Fälle). Man vermutet, daß diese Fälle autosomal rezessive oder X-chromosomale Vererbung darstellen [34].

In dieser Dissertation wurden Patienten mit autosomal rezessiver Retinitis pigmentosa untersucht.

Bisher wurden bereits auf 13 Genen Mutationen nachgewiesen (Stand 4/01), die zu Retinitis pigmentosa führen. Da die Mutationssuche in der Humangenetik einen dynamischen Prozeß darstellt, ist der aktuelle Forschungsstand im Retnet erfasst [70] und kann dort eingesehen werden.

Das erste identifizierte Gen war das Rhodopsin Gen (RHO). Dryja et al. gelang es 1990 eine Basensubstitution (C→ A) in Codon 23 des Proteins festzustellen, die in einem Aminosäure-Austausch von Prolin nach Histidin resultierte. Diese Mutation wurde bei 12% der Fälle von adRP in den USA als ursächlich nachgewiesen. Zusammen mit der Erkenntnis, daß alle Mutationsträger in den USA den selben Haplotyp aufweisen, liegt die Vermutung nahe, daß es sich um einen gemeinsamen genetischen Urvater, also einen Founder-Effekt, handelt [27]. Mittlerweile sind mindestens 90 verschiedene Mutationen im RHO bekannt, die insgesamt einen Anteil von ca. 25% der Fälle von adRP haben [23]. Allerdings zeigten sich Mutationen im Rhodopsin Gen ebenfalls für einige Fälle der arRP verantwortlich [55].

Mutationen wurden ferner in den Genen entdeckt, die für die Phosphodiesterase (PDE) codieren. Die PDE ist ein wichtiges Enzym in der Sehkaskade (vgl. Fig. 1). PDE ist ein heterotetrameres Enzym, das aus einer alpha-, einer beta- und zwei gamma Untereinheiten besteht. Sowohl in dem die alpha- [32], als auch in dem die beta-Untereinheit [48] codierenden Gen wurden Mutationen nachgewiesen. Der cGMP gekoppelte Ionenkanal, der den Ionenstrom in der Membran der Rezeptorzellen regelt, besteht ebenfalls aus einer alpha-, beta- und gamma Untereinheit. Hier konnte eine Mutation in dem Gen nachgewiesen werden, welches für die alpha-Untereinheit kodiert [21].

Von Peripherin/RDS wird vermutet, daß es eine Verbindungsfunktion mit dem Zytoskelett hat und/oder für den Knick in dem peripheren Anteil der Rezeptorzelle verantwortlich ist. Die genaue Funktion des ROM1 (Zapfen-Außensegment-Membranprotein 1) ist noch unklar, jedoch weisen sowohl Peripherin/RDS, als auch das ROM1 eine ähnliche Struktur auf; beide sind integrale Bestandteile der äußeren Rezeptorenmembran. Sowohl bei den codierenden Genen für RDS, als auch bei ROM1 wurden für RP verantwortliche Mutationen gefunden [38].

Es gibt verschiedene Klassen von Myosin. Einmal das mit Aktin interagierende Myosin II, das im Skelettmuskel vorkommt, zum anderen unkonventionelles Myosin (I, III-VIII), das in verschiedenen anderen Geweben existent ist. Die genaue Funktion der meisten dieser unkonventionellen Myosine bietet noch Stoff für weitere Forschungsarbeiten. Myosin VIIa wird vor allem in Zellen der Cochlea des Innenohres, Herz, Gehirn und Leber exprimiert. 1995 wiesen Weil et al. nach, daß Mutationen im codierenden Gen zum Usher-Syndrom Typ 1 führen. Bei diesem Syndrom ist die Retinitis pigmentosa vergesellschaftet mit Taubheit und vestibulärer Ataxie. Eine retinale Expression oder Funktion von Myosin VIIa konnte bisher allerdings noch nicht nachgewiesen werden [67].

Das erste Gen, das mit X-chromosomal vererbter RP in Verbindung gebracht werden konnte, war das Retinitis pigmentosa GPTase Regulator Gen (RPGR). So konnten Meindl et al. zwei pathogonische Nonsense- und drei Missense-Mutationen im RPGR Gen nachweisen [49].

Im Jahr 1997 konnte erstmals bewiesen werden, daß auch Gene, die für Proteine außerhalb der Rezeptorzelle (mit Ausnahme des Myosin VIIa) codieren, ursächlich für RP sein konnten. So zeigten Gu et al. fünf Mutationen im RPE65 Gen auf [30]. RPE65 wird ausschließlich im retinalen Pigmentepithel expremiert und es wird vermutet, daß es eine wichtige Rolle im Regenerationsprozess von 11-cis-Retinal spielt (vgl. Fig.2). Biochemische, sowie molekulargenetische Ergebnisse lassen sogar an die Möglichkeit denken, daß RPE65 die Retinol Isomerase selbst darstellt [19,52].

Ebenfalls 1997 fanden Maw et al. [47] in einem weiteren Gen, das für ein u.a. im retinalen Pigmentepithel expremiertes Protein codiert, dem zellulären Retinaldehyd bindenden Protein (CRALBP), Mutationen. Auf diese Arbeit wird im späteren Verlauf dieser Dissertation noch näher eingegangen.

1.2.4 Therapie und Prognose

Bisher befinden sich die meisten therapeutischen Ansätze noch im experimentellen Stadium. So existieren Experimente, mit denen versucht wird die Überlebenszeit der Photorezeptoren zu verlängern, z.B. auf Basis gentherapeutischer Methoden, wie das Einschleusen von genetischen Informationen via viralen Vektoren [66], oder durch molekularbiologische Ansätze, wie die intravitreale Applikation von körpereigenen Wachstumsfaktoren- z.B. des basic fibroblast growth factor (bFGF) [25]. Diese Verfahren sind jedoch alles andere als ausgereift und müssen zunächst noch in weiteren Tierversuchsreihen ausgewertet werden [8].

Vielversprechender ist der Versuch RPE zu transplantieren [42]. Genauer wird dieser Ansatz in Kapitel 4.2 diskutiert.

Klinisch einsetzbar ist zur Zeit eigentlich nur die hochdosierte Gabe von Vitamin A. Berson et al. publizierten 1993 eine große klinische Studie, die aufzeigt, daß unter dieser Therapie die Progradienz der Krankheit bis zu 20% verlangsamt werden kann [27].

Aus den unzureichenden Therapiemöglichkeiten leitet sich zwangsläufig ab, daß Erkrankungen mit RP fast immer zur Erblindung führen. Wie schnell

diese erreicht wird, hängt von dem einzelnen Subtypen ab. Grundsätzlich gilt aber: je früher der onset, desto rapider der Verlauf.

1.3 Spezielle genetische Grundlagen

Diese Arbeit befaßt sich ausschließlich mit Mutationen, die in dem Gen RLBP1 liegen, welches für das humane zelluläre Retinaldehyd-bindende Protein codiert.

1.3.1 RLBP1

RLBP1 ist auf Chromosom 15q26 lokalisiert [64] und kommt als einmalige Kopie im menschlichen Genom vor. Es besteht aus 8 Exons bzw. 7 Introns mit einer durchschnittlichen Länge von 198 bp (111 bp- 555 bp, vgl. 3.) bzw. 1,2 kb bezogen auf die Introns (255 bp- 3152bp). Exon 1 ist nicht translatiert, ebenso wie Teile von Exon 2 und Exon 8. Die Transcriptions Startstelle befindet sich 922 bp aufwärts des Initiations Codons. Die proximale 5'-flankierende Region weist keine GC und Konsens TATA und CCAAT Boxen auf. Statt dessen zeigt sie eine TGTG Sequenz bei -30 und eine reverse CCAAT Sequenz, TAACC bei -50 [33].

1.3.2 CRALBP

CRALB wurde erstmals 1977 durch seine Eigenschaft exogenes, radioaktives 11-cis-Retinal zu binden, in der bovinen Retina entdeckt [26]. Crabb et al. konnten die codierende bovine und humane DNA erstmals im Jahr 1988 klonen [17]. In weiteren Versuchsreihen gelang es, die Funktion des Proteins zu beschreiben (vgl. 1.3.2. B).

A) Molekülstruktur

Die strukturellen und funktionalen Eigenschaften des CRALBPs wurden eingehend von Crabb et al. 1998 untersucht [16] und veröffentlicht. Das Protein hat ein Molekulargewicht von 36,347 kDa. Es besteht aus 316 Aminosäuren. Die Primärstruktur wurde bei bovinem CRALBP direkt bestimmt [18], bei humanen durch klonen der cDNA [17]. Die Sekundärstruktur setzt sich zusammen aus ca: 34% α Helix, 12% β gerade, 24% β gebogene, 31% ungeordneter und 55% zufällige, wobei die Summe der β gebogenen und der ungeordneten Struktur gleich der zufälligen ist. Die globale CRALB Konfiguration bleibt durch Bindung des Liganden relativ unbeeinträchtigt. Das Apo-Protein ist bis 39°C, das Holo-Protein bis ca 50°C thermostabil. Die Retinoid bindende Domäne liegt am C-terminalen Ende [14].

B) Funktionshypothesen

Das celluläre Retinaldehyd bindende Protein (CRALBP) wird auf dem retinalen Pigmentepithel (RPE) und den Müller Zellen der Retina expremiert. Es hat im RPE vorwiegend eine Substratcarrierfunktion. Im Sehzyklus bindet es vorzugsweise 11-cis-Retinol und fördert die Regeneration von Rhodopsin, indem es die Oxidation von 11-cis-Retinol in 11-cis-Retinaldehyd forciert. Dementsprechend wird weniger estherisierte Form gelagert. Saari et al. [56] zeigten, daß in Anwesenheit von CRALBP etwa die dreifache Menge an 11-cis-Retinol mehr oxidiert wird als ohne CRALBP.

CRALBP kann ebenfalls im Ziliarkörper, der Kornea, dem Sehnerv, Teilen der Iris, der Zirbeldrüse und im Gehirn nachgewiesen werden. Die Bedeutung des Proteins an diesen Stellen ist allerdings noch unklar [57,64]. Es wird vermutet, daß CRALB somit ebenfalls Funktionen erfüllt, die nicht mit dem Sehzyklus zusammenhängen.

1.4 Konzept der Dissertation

Es gibt mehrere Verfahrenswege, die genetischen Grundlagen hereditärer Krankheiten zu untersuchen.

Ein Ansatz ist die Positions-Klonierung: Bei einer Familie, deren Stammbaum eine hereditäre Erkrankung nahe legt, wird mittels Kopplungsanalyse der Krankheitslocus einem Chromosom zugeordnet. In der Folge untersucht man sämtliche in der entsprechenden chromosomalen Region liegenden Gene auf Mutationen. Findet man ein schadhaftes Gen, wird versucht, das Genprodukt zu identifizieren und somit eine Verknüpfung mit der Krankheit zu erstellen.

Eine weitere Methode ist der Kandidatengen-Ansatz. Hier ist bereits bekannt für welche Proteine welche Gene codieren. Mittels der DNA erkrankter Personen werden gezielt Gene auf Mutationen gescreent, von denen vorstellbar ist, daß ein eventuell schadhaftes Produkt pathogen sein könnten [20].

Diese Arbeit beruht auf dem Kandidatengen-Ansatz.

Das Ziel dieser Dissertation ist es, Mutationen in dem Gen RLBP 1 zu finden, die zu einer Veränderung der molekularen Struktur des codierten Proteins, dem CRALBP, führen und folglich mit dem Auftreten der Krankheit Retinitis pigmentosa in Verbindung gebracht werden können.

Es wurde ein Patientenkollektiv von 100 fast ausschließlich nicht miteinander verwandten Personen untersucht. Die für das Protein codierenden Abschnitte, Exons, wurden mittels PCR amplifiziert. Nach zufriedenstellender Qualitätskontrolle des PCR-Produktes durch Gelelektrophorese wurden die Proben unter zwei Bedingungen auf SSCP-Gele aufgetragen und auf Auffälligkeiten gescreent. Fiel eine Probe durch ein verändertes Bandenmuster auf, so wurde diese Probe einer genauen maschinellen Analyse der Basensequenz, der Sequenzierung, unterzogen. Konnte dort tatsächlich eine Mutation festgestellt werden, so wurde eine abschließende

Kontrolle durch ein an der Lokalisation der Veränderung schneidendes Restriktionsenzym durchgeführt.

Mit Patienten, die nur eine heterozygote Veränderung in einem Exon aufwiesen, wurde konsequent eine Sequenzierung aller Exons durchgeführt, um eine eventuell vorhandene zweite und somit krankheitsauslösende Mutation finden zu können.

Bei häufig vorkommenden Sequenzveränderungen wurde zudem eine Haplotypen Analyse mit bestimmten Markern angeschlossen, um damit gegebenenfalls einen gemeinsamen Ursprung aufzudecken.

Bei Patienten, die zwei heterozygote Mutationen aufwiesen, wurde die Familie auf Segregation untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patientenkollektiv

Im Rahmen meiner Arbeit untersuchte ich die DNA von 100 Patienten auf den Exons 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 8. Zusätzlich untersuchte ich weitere 300 Patienten auf Exon 4. Alle Patienten waren an der autosomal rezessiv vererbten Form der Retinitis pigmentosa (arRP) erkrankt. Der Großteil der Patienten stammte aus Deutschland und war nicht miteinander verwandt.

Der Kontakt entstand über Kliniken für Augenheilkunde, welche diese Patienten schon länger augenärztlich betreuten und mit dem Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Hamburg zusammenarbeiten. Alle Patienten nahmen freiwillig an den Untersuchungen teil und waren über deren Art und Ziel aufgeklärt.

Die DNA wurde aus EDTA-Blut gewonnen und mir zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Chemikalien

Acrylamid 30% (mit 0,8% Bisacrylamid)	Roth, Karlsruhe
Agarose (Ultra Pure Agarose)	Gibco BRL
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck
EDTA	Merck
Essigsäure 100%	Merck
Ethidiumbromid 10mg/ml	Merck
Ethylalkohol 96%	Apotheke, UKE
Ficoll 400	Pharmacia, Freiburg
Formamid	Sigma, St.Louis
Formaldehyd 37%	Merck

Glycerin 87% und wasserfrei	Merck
Magnesiumchlorid 50mM	Gibco BRL
Natriumacetat	Merck
Natriumcarbonat	Merck
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (Temed)	Sigma
Paraffin flüssig	Merck
Silbernitrat	Merck
Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck
Xylencyanol FF	Serva

2.1.3 Puffer und Lösungen

APS	1g ad 10ml aqua dest., Lagerung bei 4°C
Ethidiumbromid	10mg/ml aqua dest., dunkle Lagerung bei 4°C
Formamid Ladepuffer	98% deionisiertes Formamid 10mM EDTA, pH 8.0 0.025% Bromphenolblau 0.025% Xylencyanol FF Lagerung bei -20°C
Nucleotidmix (dNTPs)	100 µl dATP 100mM 100 µl dCTP 100mM 100 µl dGTP 100mM 100 µl dTTP 100mM in 600 µl aqua dest., Lagerung bei 4°C
10x PCR Puffer (Gibco)	200mM Tris-HCl (pH 8.4) 500mM KCl , Lagerung bei 4°C
Silbernitrat Färbelösung	0.012 M Silbernitrat in aqua dest.
10xTBE	1M Tris 1M Borsäure 20mM EDTA, pH 8.0

Tabelle 2-1 Sequenzen der RLBP1 Primer

Name	Sequenz (5'→3')	Produkt-größe (bp)	Temp. (°C)*
E-2 F	TGAGATCCACAGTTCTGAGAC		
E-2 R	AGGAGAGCCCTGGAGGACA	366	61
E-3 F	GAACTGAAGGTCTGAGAC		
E-3 R	CAGGAGAGAGAATGCAGTCA	259	61
E-4 F	GTCATCACCTGTGTGTCCTGCC		
E-4 R	GAGAGCGGATAGCATCCTCATG	244	63
E-5 F	CTTCTGAGTCCCCTAGGAGG		
E-5 R	CCAGTAGAGGCCAGGGTTGA	199	63
E-6 F	CCTCAGGACCTCAAGCCTTA		
E-6 R	CTGCAAGCACCATGAAAGGA	282	63
E-7 F	AATGAGTGGGAGCCTCTGAG		
E-7 R	CCCTCTTGTCTCATTGTCTGG	501	61
E-8 F	CTCCTGCTCAGTTCTGTCTC		
E-8 R	ACTTGAGAACAGGGTGACACC	269	63
E-8 G	AAGGGCTGCTTGAGATGACTG		
E-8 S	CACCAGGACTGCTGCGTTTG	550	63

*Temp.=annealing Temperatur.

2.1.6 Andere Materialien

Pipette Varipette 4810 0.5-10µl, 10-100µl, 200-1000µl	Eppendorf Hamburg
Pipettenspitzen 10µl, 100µl, 1000µl	Eppendorf Hamburg
0.5 ml PCR Tube	Biozym Diagnostik Oldendorf
0.5 ml PCRTube	Eppendorf Hamburg
1.5 ml Tube	Eppendorf Hamburg
Microconcentrator Microcon-100	Amicon, Witten
Filterpapier 3MM CHR	Whatman, Maidstone
Kodak BioMax MR Film	Kodak
Polaroid type 667 Schwarz Weiß Film	Polaroid MA

2.1.7 Apparat

DNA Sequencer 310	Applied Biosystems Inc., CA
Thermocycler	
DNA Thermal Cycler 480, 9600	Perkin-Elmer
Omnigene Temperature Cycler	Hybaid
Thermomixer 5436	Eppendorf Hamburg
Zentrifuge 5415	Eppendorf Hamburg
Elektrophorese Spannungsquelle:	
ST305 (300V, 250mA),	Gibco BRL, Life Technologies
PS 9009TC (3000V, 250mA, 250W)	Gibco BRL, Life Technologies
Elektrophorese Kammer:	
Modell S2 (incl. Glas Platten und 0.8 mm dicke Spacer, Kamm 0.8mm mit 32 Taschen)	Gibco BRL, Life Technologies
Submarine gel electrophoresis unit (incl. Basiseinheit, Sicherheitsabdeckung, UV-transparentes Gel Tablett, 1 mm x 20 well	

Kämme, 2 mm x 20 well Kämme, 2 mm x 16 well Kämme)

	Sigma St. Louis
Fluorescent tables	Renner GMBH Dannstadt
Polaroid MP 4 land camera	Massachusetts

2.2 Methoden

2.2.1 Amplifikation der kodierenden Abschnitte des RLBP1-Gens aus menschlicher genomischer DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

A) Prinzip

Mit Hilfe der PCR-Methode ist es möglich, aus einem Gemisch genomischer DNA eine bestimmte Sequenz (z.B. ein Exon) in sehr großer Zahl zu amplifizieren. Dafür werden zwei kurze Oligonucleotide, sog. Primer, benötigt, welche sich an ein einzelsträngiges DNA-Molekül anlagern und somit einen Startpunkt für die Synthese des gewünschten Abschnitts bilden. Die Lage der Primer auf dem Sense und Antisense Strang grenzt also die zu analysierende Sequenz ein. Für jeden PCR Ansatz ist demnach ein Primer Paar notwendig [59].

Gewöhnlich werden bei einer PCR-Reaktion 30 bis 40 Zyklen durchlaufen, wobei jeder Zyklus aus drei Schritten besteht:

1. Eine Hitzedenaturierung bei 94°C überführt Doppel- in Einzelstrang DNA.
2. In der nun folgenden Annealing-Phase bei Temperaturen zwischen 50 und 65°C lagern sich die Primer spezifisch an die entsprechenden Sequenzen der nun vorliegenden Einzelstrang DNA an.
3. Im folgenden Synthese-Schritt wird das gewünschte Fragment anhand der Einzelstrangmatrize erstellt.

Durch eine hitzestabile DNA-Polymerase werden die im Ansatz vorhandenen Desoxyribonucleotidtriphosphate zu einem neuen Strang, ausgehend von den Primern, zusammengefügt. Man benutzt dazu ein aus dem thermophilen

Bakterium *Thermus aquaticus* isoliertes Enzym, die Taq-Polymerase, welches der wiederholten Exposition bei 94°C standhält [58] .

Die vorhandene DNA dient jeweils als Vorlage, so daß bei jedem Zyklus eine Verdopplung erfolgt.

Durch den Aktivitätsverlust der Polymerase sowie den Verbrauch an Substraten (Primer, dNTPs) nimmt die Amplifikationsrate nach einem exponentiellen Zuwachs während der ersten Zyklen kontinuierlich ab.

Optimale Bedingungen für das jeweilige Primer-Paar sind Voraussetzung, um eine ausreichende Menge an Produkt zu erhalten. Durch Variation von Annealing-Temperatur, Magnesiumkonzentration, Enzymkonzentration und weiterer Parameter kann eine Verbesserung der Ausbeute erreicht werden

B) Anwendung

Die PCR-Reaktion wurde mit einem 25 µl-Ansatz , bestehend aus 50 ng DNA, 5 bis 10 pmol von jedem Primer , 1x PCR-Reaktionspuffer, 0.2mM von jedem Desoxyribonucleotidtriphosphat, 1 unit Taq sowie Aqua dest. durchgeführt. Dieser Ansatz wurde mit 35 µl Paraffin überschichtet.

Das folgende Protokoll verlief nach dem „hot start“ Schema. Dies bedeutet, daß die Taq-Polymerase erst nach dem ersten vierminütigen Denaturierungsschritt hinzugefügt wird.

Die jeweiligen Protokolle sind Tabelle 2-2 zu entnehmen.

Tabelle 2-2 PCR Protokolle der Exons 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8a, 8b

Exon	Temp.(°C)	Zeit ('=min, ''=sec)	Anzahl der Zyklen
2,3,7	94	4'	1
	94	40''	36
	61	40''	
	72	20''+1''	
	72	10'	1
4,5,6,8a,8b	94	4'	1
	94	40''	36
	63	40''	
	72	30''+1''	
	72	10'	1

2.2.2 Agarosegelelektrophorese zur qualitativen und quantitativen Kontrolle der PCR-Produkte

5 µl von jeder fertigen PCR-Reaktion wurden mit 5µl Ficoll-Ladepuffer vermischt und auf ein 1.5%iges Agarosegel (1.5% Agarose, 0.001% Ethidiumbromid in 1xTBE) aufgetragen. Bei 6V/cm Gel wurde die Elektrophorese für eine Stunde durchgeführt. Das Ergebnis wurde unter ultraviolettem Licht und auf Polaroidfilm festgehalten. Nur Proben, die in einer ausreichenden Konzentration und ohne unspezifische Produkte vorlagen, wurden zur weiteren Analyse mittels SSCP verwendet.

2.2.3 SSCP

A) Prinzip

Die SSCP-Methode hat große Bedeutung in der Mutationssuche erlangt [53]. Sie basiert darauf, daß bei nicht denaturierenden elektrophoretischen Bedingungen Einzelstrang DNA (ssDNA) eine oder mehrere stabile Konformationen besitzt, was Auswirkungen auf das Laufverhalten in einem Polyacrylamidgel hat. Da die Basensequenz die Konformation definiert, kann ein Basenaustausch eine Änderung im Laufverhalten bewirken, welche als Abweichung der Lauflänge gegenüber dem Wildtyp als sogenannter „band shift“ sichtbar wird. Unterscheidet sich im Vergleich das Bandenmuster der zu untersuchenden ssDNA zum Wildtyp des gleichen Gens, so ist dies ein Hinweis auf eine Alteration der Basensequenz. Diese Methode ist sehr sensitiv, einzelne Basensubstitution werden problemlos erfaßt [28]. Eine Aussage über die Art der Änderung kann jedoch nicht getroffen werden.

So können verschiedene Mutationen an gleicher Stelle einen identischen band shift verursachen [63]. Zur genauen Identifikation der Mutation muß die direkte Sequenzierung herangezogen werden.

Die optimalen Bedingungen für die Elektrophorese können sich von Gen zu Gen, bzw. Fragment zu Fragment, unterscheiden. Zur Verbesserung der Sensitivität können die Ionenkonzentration (TBE-Puffer), der Glycerinanteil, das Bisacrylamid/ Acrylamid-Verhältnis, die Geltemperatur, sowie die Menge der geladenen ssDNA verändert werden [50]. Fragmente mit einer Größe von über 400 Basenpaaren sollten vor dem Auftragen mit Restriktionsenzym verdaut werden.

B) Anwendung

Die Patienten-DNA wurde für jedes Exon mit zwei verschiedenen SSCP-Bedingungen untersucht.

Zur Verwendung kamen ein 8%iges Polyacrylamidgel einmal mit (PAAG) und einmal ohne Glycerin (10%) (PAA).

Die experimentellen Schritte im Einzelnen:

1. Herstellung der Polyacrylamidgel Lösung:

Mischen von 24ml 1xTBE, 32ml Rotiphorese-Lösung (30%Acrylamid, 0.8%Bisacrylamid), 51ml aqua dest. und 12ml Glycerin (wasserfrei), bzw. 24ml 1xTBE, 32ml Rotiphorese-Lösung und 63ml aqua dest.. Mit der Zugabe von 40µl TEMED sowie 1ml APS startet die Polymerisation.

2. Nach gründlicher Durchmischung wird die Lösung zwischen zwei vorher präparierte Glasplatten gegossen. Um eine vollständige Polymerisation zu gewährleisten wurde eine Wartezeit von mindestens einer Stunde eingehalten.

3. 5-6µl PCR-Produkt wurden mit 8µl Formamid Ladepuffer versetzt und bei 95°C 10min denaturiert. Nach dreiminütiger Kühlung auf Eis und anschließender Zentrifugation wurden die Proben auf die Gele aufgetragen.

4. Die Elektrophorese variiert je nach Länge des Fragmentes und Art des Gels. Sie dauerte bei Raumtemperatur zwischen 9-20 Stunden bei 12-20 Watt. Als Laufpuffer wurde 1xTBE verwendet.

5. Um die Banden sichtbar zu machen fand anschließend eine Silberfärbung [11] statt.

Die einzelnen Schritte der Färbung:

- Das Gel wird nach Überführung in eine Glasschale für 5 min in 10%igem Alkohol fixiert.
- Darauf folgt die 3-minütige Oxidation in 1%iger Salpetersäure.
- Im nächsten Schritt wird zwei mal mit aqua dest. gespült, um ein Anfärben des Hintergrundes durch anhaftende Ionen zu vermeiden.
- Nun erfolgt die Färbung in Silbernitratlösung (12mM) für 20 min.
- Ein erneutes zweimaligen Spülen geht der Entwicklung voraus.
- Diese wird durch zweimaliges Hinzugießen von Entwicklerlösung durchgeführt. Das Wechseln der Lösung ist wichtig, um den Silberniederschlag zu entfernen.
- Nachdem die Banden die gewünschte Intensität erreicht haben, kann die Reaktion durch Zugabe von 10%iger Essigsäure (zwei Minuten) gestoppt werden.

- Als letzter Schritt wird das Gel 5 min mit Wasser gespült.
- Einschweissen in Plastikfolie erlaubt eine jahrelange Aufbewahrung der Gele.

2.2.4 Heteroduplices

Mittels SSCP-Analyse kann man die überwiegende Anzahl der Sequenzunterschiede gut darstellen. Allerdings können solche Mutationen übersehen werden, welche durch ihre Lokalisation nicht zu Veränderungen in der Sekundärstruktur des Einzelstrangs führen. Solche Lokalisationen können zum Beispiel am Ende der Amplikons oder in einer langen stabilen Region liegen.

Einzelsträngige DNA verschiedener Allele lagert sich bei heterozygoten Individuen zu Heteroduplex Formationen zusammen, welche sich durch langsamere elektrophoretische Wanderung von den korrespondierenden Homoduplices unterscheiden [68]. Es wird vermutet, daß beim Zusammenlagern des Wildtyps mit dem mutiertem Allel eine „offenere“ Konfiguration an der Stelle des Mismatches entsteht; dies erklärt das unterschiedliche Verhalten bei der Elektrophorese.

2.2.5 Haplotypenanalyse mittels polymorpher Mikrosatellitenmarker

A) Prinzip

Das Ziel der Haplotypenanalyse in diese Studie war einen möglichen Founder Effect zu erfassen.

Liegen zwei Loci auf verschiedenen Chromosomen, werden sie unabhängig voneinander vererbt. Dabei liegt die Rekombinationsfraktion bei 0,5. Liegen zwei Loci auf dem selben Chromosom, kann es vorkommen, daß sie zusammen weitervererbt werden. Diese Wahrscheinlichkeit steigt um so mehr, je näher sie beieinander liegen, weil nur ein crossover genau in dem kleinen Teilstück dazwischen zu einer Rekombination führt. Da also die Rekombination zweier Loci von der zwischen Ihnen liegenden Entfernung

abhängig ist, ist die Rekombinationsfraktion nichts anderes, als ein Maß für die räumliche genetische Entfernung. Die Entfernung zwischen zwei Loci, die eine Rekombinationsfraktion von 1% zeigt, wird als 1 Centimorgan (cM) definiert.

Polymorphe Mikrosatellitenmarker werden auch VNTRs genannt (variable number of tandem repeats). Diese VNTRs bestehen aus einer Sequenz oft wiederholter kurzer Basenfolgen, z.B. CA. Es gilt für sie also (CA) n oder allgemein (NNN) n , wobei n die Zahl der Wiederholungen zwischen 10 und 60 ist. Diese Polymorphismen werden nach den mendelschen Regeln vererbt; daß heißt n ist bei unterschiedlichen Individuen auch unterschiedlich groß.

Diese Phänomene macht man sich bei der Suche nach einem sogenannten Founder Effekt zu nutze. Dabei will man herausfinden, ob die gleiche Mutation bei verschiedenen Individuen auf einen "Urvater" zurückgeht und durch Generationen weitervererbt wurde, oder ob es sich um irgendwann aufgetretene Neumutationen handelt.

Dazu wählt man zwei oder mehr VNTRs, die sich in der Nähe des fraglichen Locus befinden und untersucht die nicht miteinander verwandten Patienten. Sind die Allele identisch, kann ein Founder Effekt angenommen werden. Im anderen Fall ergibt sich ein unterschiedliches Bandenmuster.

B) Anwendung

Der 25 µl PCR- Ansatz für ein „cold start“ Verfahren wird in zwei Schritten präpariert (vgl. auch 2.2.1):

Zuerst werden die DNA und der gewählte Marker zu einem 0,5 µl Ansatz zusammenpipettiert, mit Paraffinöl bedeckt und anschließend in den Gefrierschrank gestellt.

Im zweiten Schritt wird der Reaktionsansatz aus 19,25 µl dH₂O, 2,5µl Pufferlösung, 0,75 µl MgCl, 0,5 µl dNTP, 2*0,35 µl des Primerpaares, sowie 0,1 µl Taq auf Eis zusammenpipettiert.

Anschließend werden beide Ansätze vermischt, zentrifugiert und in den auf 95°C vorgeheizten PCR- Block gegeben und nach folgendem Muster amplifiziert:

Tabelle 2-3 Amplifizierungsschema der PCR zur Haplotypenanalyse

Temp. (°C)	Zeit (‘=min; ″=sec)	Anz. der Zyklen
94	2’	1
94	40’’	2
57	40’’	
52	1’	
94	40’’	35
55	40’’	
72	30’’	
72	10’	

Verwendete Marker:

<u>RLBP1</u>	<u>99.483</u>
Marker	cM
D15S653	91.620
D15S652	100.561

Der quantitative und qualitative Erfolg der PCR Reaktion wird durch Agarosegelelektrophorese kontrolliert (vgl. 2.2.2).

Die Auswertung erfolgt durch Auftragen auf ein PAA-Gel und anschließendem Färben (vgl. 2.2.3).

2.2.6 Sequenzierung

Die Sequenzierungsmethode nach Sanger et al. basiert auf dem Prinzip, die Synthese des 5´ nach 3´ Stranges basenspezifisch abzubrechen. Die dadurch entstandenen DNA-Fragmente zeigen durch ihre Größe die Position der jeweiligen Base an. Nach ihrer Größe geordnet spiegeln sie somit die Basensequenz des untersuchten DNA-Abschnitts wieder [60].

Bei der Sequenzierungsreaktion wird durch den Einbau von Didesoxynucleosid-Triphosphaten (ddNTPs), welche sich von dNTPs durch das Fehlen des Hydroxylrestes in der 3'-Position der Desoxyribose unterscheiden, der basenspezifische Kettenabbruch während der Extension erreicht. Die fehlende Hydroxylgruppe verhindert eine Verlängerung der DNA-Kette.

Die Reaktionen wurden mit folgenden Reagenzien in einer 0.2 ml GeneAmp PCR tube durchgeführt:

3µl gereinigtes PCR-Produkt;

2µl Big-Dye Terminator-Mix;

4,6µl destilliertes Wasser und

0,4µl Primer (10 pmol).

Das folgende Protokoll wurde im GeneAmp PCR System von Perkin Elmer durchgeführt.

1. 96°C für 10s
2. 50°C für 5s
3. 60°C für 4min

Diese drei Schritte wurden 25 mal wiederholt, danach wurde auf 4°C heruntergekühlt.

Die entstandenen Produkte wurden mittels Ethanol Präzipitation von den inkorporierten Terminatoren getrennt und in einer Vakuum Zentrifuge für 5 min getrocknet. Nach Zugabe von Template Supression Reagenz wurden die Proben 2 min auf 90°C erhitzt und solange auf Eis gekühlt, bis sie auf den Applied Biosystems 373 Automated DNA Sequencer geladen wurden.

2.2.7 Mutationsanalyse mittels Restriktionsenzymverdau

Restriktionsenzyme sind Endonucleasen prokaryontischer Herkunft, welche doppelsträngige DNA innerhalb kurzer Erkennungssequenzen schneiden. Mit Hilfe eines Computerprogramms läßt sich somit für jedes DNA-Fragment ein spezifisches Muster erstellen, aus dem die Schnittstellen der jeweiligen

Endonucleasen hervorgehen. Schon eine Punktmutation kann dieses Muster verändern, indem eine Schnittstelle wegfällt oder neu entsteht.

Der Verdau durch das jeweilige Enzym muß bei einer vom Hersteller vorgegebenen Temperatur mit bestimmten Reagenzien über einen gewissen Zeitraum stattfinden. Das Ergebnis läßt sich dann elektrophoretisch feststellen.

2.2.8 Splice Score Berechnung

Der Splice Score ist ein statistischer Wert, der die statistische Schneidewahrscheinlichkeit an einer mit AG markierten Schnittstelle zwischen Exon und Intron ausdrückt. Mutationen, die in der unmittelbaren Nähe der Schnittstelle zu einer Änderung der Basensequenz führen, verändern die statistische Schnittwahrscheinlichkeit. Diese kann durch ein Rechenverfahren ermittelt werden.

In meiner Arbeit wurde zur Splice Score Bestimmung die von Shapiro et al. 1987 [61] beschriebene Methodik angewand. Dabei wird jeder Base in Abhängigkeit von ihrer Position bezogen auf die Exon/Intron Grenze ein bestimmter Wert zugeordnet. Anhand einer Formel kann man aus den Werten daraufhin den Score bestimmen.

In meiner Arbeit handelte es sich um menschliche in 5'→ 3' verlaufende Einzelstrang DNA. Tabelle 2-4 fand dabei Anwendung.

Tabelle 2-4 Wertekala zur Splice Score Berechnung

Lokalisation	A	C	G	T
-3	32	37	19	12
-2	58	13	15	15
-1	10	4	78	8
+1	0	0	100	0
+2	0	0	0	100
+3	57	2	39	2
+4	71	8	12	9
+5	5	6	84	5
+6	16	15	22	47

Die Werte wurden in folgende Formel eingesetzt:

$$\text{Score} = 100 (t - t_{\min}) / (t_{\max} - t_{\min})$$

Dabei gilt:

t = Summe aller Werte in der zu scorenden Sequenz

t_{min} = Summe der niedrigsten Werte in allen 8 Positionen = 47

t_{max} = Summe der höchsten Werte in allen 8 Positionen = 595

2.2.9 Nucleotidsequenzen

Als Referenzen der Nucleotidsequenzen der für CRALBP codierenden Region wurden die Ergebnisse von zwei Studien benutzt. Die Sequenz der rein codierenden DNA (cDNA) wurde der Veröffentlichung von Crabb et al. von 1988 entnommen [17]. Die Basensequenz der gesamten Genregion inclusive Introns stammt aus der Veröffentlichung von Intres et al. aus dem Jahr 1994 [33].

Die Nomenklatur der gefundenen Mutationen erfolgte gemäß den Vorschlägen von Beaudet und Tsui [3], sowie denen der internationalen Arbeitsgruppe für Nomenklatur [2].

3. Ergebnisse

Die Exons 2-8 des für CRALBP codierenden Gens wurden untersucht. Exon 1 (132 bp) ist komplett nicht translatiert und wurde somit in das Screening nicht mit aufgenommen.

Das Patientenkollektiv betrug für die Screening-Untersuchung auf allen Exons 100 Personen. Auf Exon 4 wurden zusätzlich noch weitere 211 Personen untersucht. Alle Patienten sind an der autosomal rezessiv vererbten Form der Retinitis pigmentosa (arRP) erkrankt. Zur Anwendung gelangten die in Kapitel 2 ausführlich beschriebenen Methoden. Alle Patienten, die nur auf Exon 4 per SSCP Analyse untersucht wurden und die dort eine Konfigurationsänderung/Mutation aufwiesen (Pat.# 267, 341, 446, 521, 528, 535, 716), wurden auf allen anderen Exons gescreent. Abbildungen werden nur von den relevanten, noch nicht veröffentlichten Veränderungen gezeigt.

Die Ergebnisse für jedes Exon sind wie folgt:

3.1. Untersuchungen im Exon 2

Das Exon hat eine Länge von 112 bp.

3.1.1 Substitution 853G/A

Bei einem Patienten (Pat.# 267) fand sich in der SSCP Analyse eine Bandenverschiebung in Richtung Kathode und das Auftreten einer zusätzlichen Bande im PAA-Gel, sowie eine Heteroduplexstruktur im PAA-Gel mit Glycerin. Die daraufhin durchgeführte Sequenzierung ergab eine Basensubstitution von Guanin zu Adenin an Stelle 853 der RLBP1 gDNA (853G/A); (cDNA: 114G/A). Diese Veränderung befindet sich an dritter Position eines codierenden Triplets. Sowohl CGG, als auch CGA codieren für

Arginin. Folglich bleibt die Aminosäuresequenz unverändert; von einer Pathogenität kann nicht ausgegangen werden.

3.1.2. Restliche Patienten

Alle anderen Patienten zeigten ein identisches, unauffälliges Bandenmuster.

3.2. Untersuchungen im Exon 3

Das Exon hat eine Länge von 129 bp. Ein Patient (Pat.# 703) zeigte bei der SSCP Analyse eine fehlende Bande im PAA-Gel, sowie eine Heteroduplex Struktur im PAAG-Gel. Bei der anschließenden Sequenzierung konnte allerdings keine Veränderung in der Basensequenz nachgewiesen werden. Die Veränderungen bei der SSCP-Analyse sind somit am ehesten auf Verunreinigungen zurückzuführen.

Alle anderen Patienten zeigten ein Bandenmuster wie die Kontrollproben.

3.3. Untersuchungen im Exon 4

Das Exon hat eine Länge von 205 bp. Bei der SSCP Analyse zeigten sich zahlreiche Veränderungen, so daß beschlossen wurde, die DNA weiterer dem Institut zur Verfügung stehender, an arRP erkrankter, nicht miteinander verwandter Patienten auf diesem Exon zu untersuchen. Somit wurde in diesem Fall ein Patientengut von insgesamt 311 Patienten gescreent.

3.3.1. Deletion 2778del6

Bei 9 Patienten (Pat.# 71, 76, 87, 98, 341, 397, 446, 535, 716) zeigten sich bei der SSCP Analyse zusätzliche Banden kathodenwärts im PAA-Gel, sowie zwei zusätzliche Banden und eine Heteroduplex Struktur im PAAG-Gel (Abb. 3). Die daraufhin durchgeführte Sequenzierung ergab eine 6 Basen Deletion

an Stelle 2778 der genomischen DNA (2778del6) (cDNA: 529+2del6) (Abb. 4). Diese Deletion wurde durch das Restriktionsenzym TspRI bestätigt, da durch die Mutation die Enzymschnittstelle wegfällt. Anstelle von 4 Banden beim Wildtyp, erkennt man im Agarose Gel bei der heterozygoten Form 3, bei der homozygoten Form nur 2 Banden. Eine homozygote Form konnte allerdings bei keinem Patienten gefunden werden. Anschließend wurden als Normalkontrollen die DNA von 50 randomisierten nicht an arRP erkrankten Personen auf diesem Exon untersucht. Dabei zeigten ebenfalls 2 von 50 Personen im SSCP das für diese Deletion typische Bandenmuster.

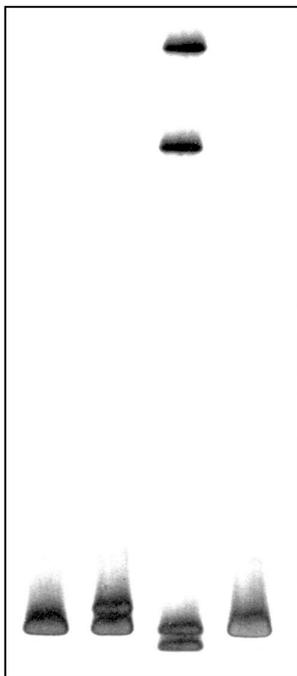
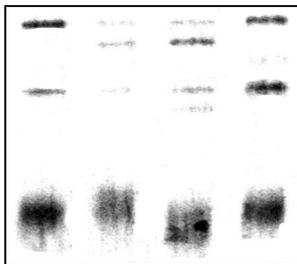


Abbildung 3
PAAG-Gel 2778del6

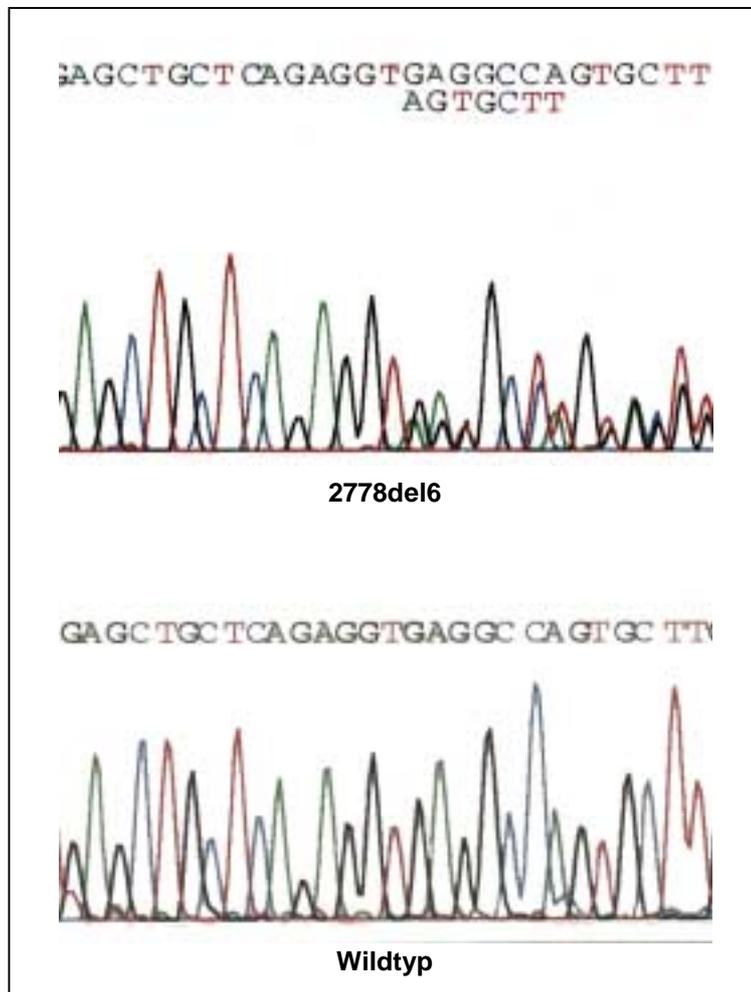
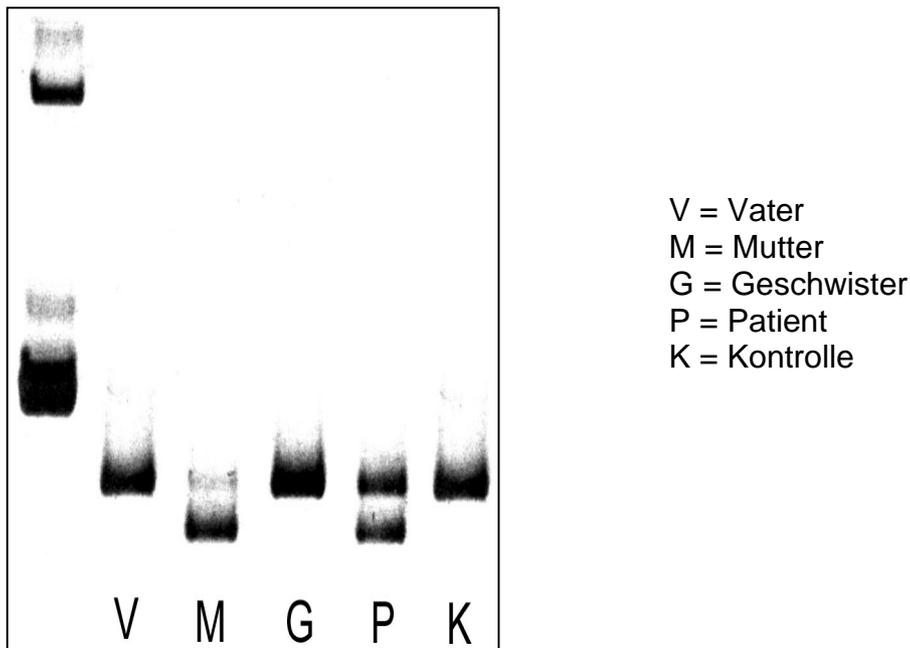


Abbildung 4
Sequenz und Kontrolle 2778del6

Bei einem der Patienten wurde eine Familienanalyse durchgeführt, da noch eine weitere heterozygote Mutation in Exon 6 gefunden wurde (vgl. 3.5.1). Dabei ergab sich, daß die Mutter in diesem Exon ein identisches Bandenmuster mit dem Patienten aufweist, während das des Geschwisterkindes und des Vaters dem Wildtyp entsprechen (Abb. 5).



Familienanalyse 2778del6

Abbildung 5

Die Deletion 2778del6 liegt außerhalb des Exons, aber auf Grund der unmittelbaren Nähe zur Splice Site wurde der Splice Score bestimmt. Für den Wildtyp ergab sich ein Splice Score von 94,89, für die Mutante ein Splice Score von 73,72.

Wegen der Häufigkeit dieser Deletion wurde ebenfalls eine Haplotypenanalyse zur Bestimmung eines möglichen Founder Effektes durchgeführt. Es gab keine Gemeinsamkeiten der Banden auf dem PAA-Gel, weswegen ein Founder Effekt weitestgehend ausgeschlossen werden kann (Abb. 6).

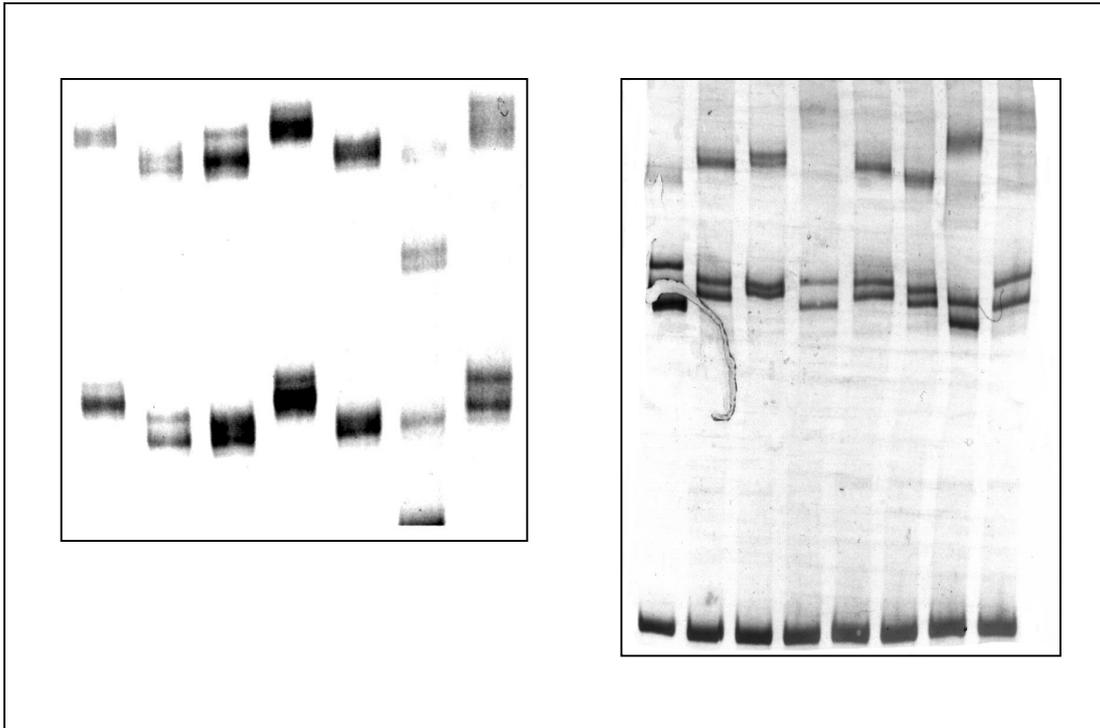


Abbildung 6 Haplotypenanalyse mit D15S652 und D15S653

3.3.2 Substitution 2733C/T

Ein Patient (Pat.# 414) zeigte bei der SSCP Analyse im PAA-Gel anstelle von drei Einzelbändern drei Doppelbänder. Im PAA-Gel mit Glycerin bot der Patient zwei zusätzliche Einzelstrangbänder. Die anschließende Sequenzierung ergab auf Position 2733 eine heterozygote Basensubstitution von Cytosin zu Thymin (2733C/T) (cDNA: 486C/T). Diese Veränderung befindet sich an dritter Position eines codierenden Triplets. Sowohl CGC, als auch CGT codieren für Arginin. Folglich bleibt die Aminosäuresequenz unverändert; von einer Pathogenität kann nicht ausgegangen werden.

3.3.3. Substitution 2736A/C

Ein Patient (Pat.# 267) zeigte in der SSCP Analyse sowohl im PAA-Gel als auch im PAA-Gel mit Glycerin einen Bandshift in Richtung Kathode. Die anschließende Sequenzierung ergab auf Position 5866 eine homozygote Basensubstitution von Adenin zu Cytosin (2736A/C) (cDNA: 489A/C). Diese Veränderung befindet sich an dritter Position eines codierenden Triplets. Sowohl GCA als auch GCC codieren für Alanin. Folglich bleibt die Aminosäuresequenz unverändert und von einer Pathogenität kann nicht ausgegangen werden.

3.3.4 Substitution 2657C>T

Ein Patient (Pat.# 521) zeigte in der SSCP Analyse unter beiden Bedingungen zusätzliche Banden. Bei der anschließenden Sequenzierung wurde auf Position 2657 eine heterozygote Basensubstitution von Cytosin auf Thymin festgestellt (2657C>T) (cDNA: 410C>T) (Abb.7). Diese Veränderung befindet sich an zweiter Position eines codierenden Triplets (Codon 75). Im Wildtyp kodiert TCG für Serin, bei der Mutante kodiert TTG für Leucin.

Der Patient wurde für alle weiteren Exons durchgescreent, wobei keine weitere heterozygote Mutation gefunden werden konnte.

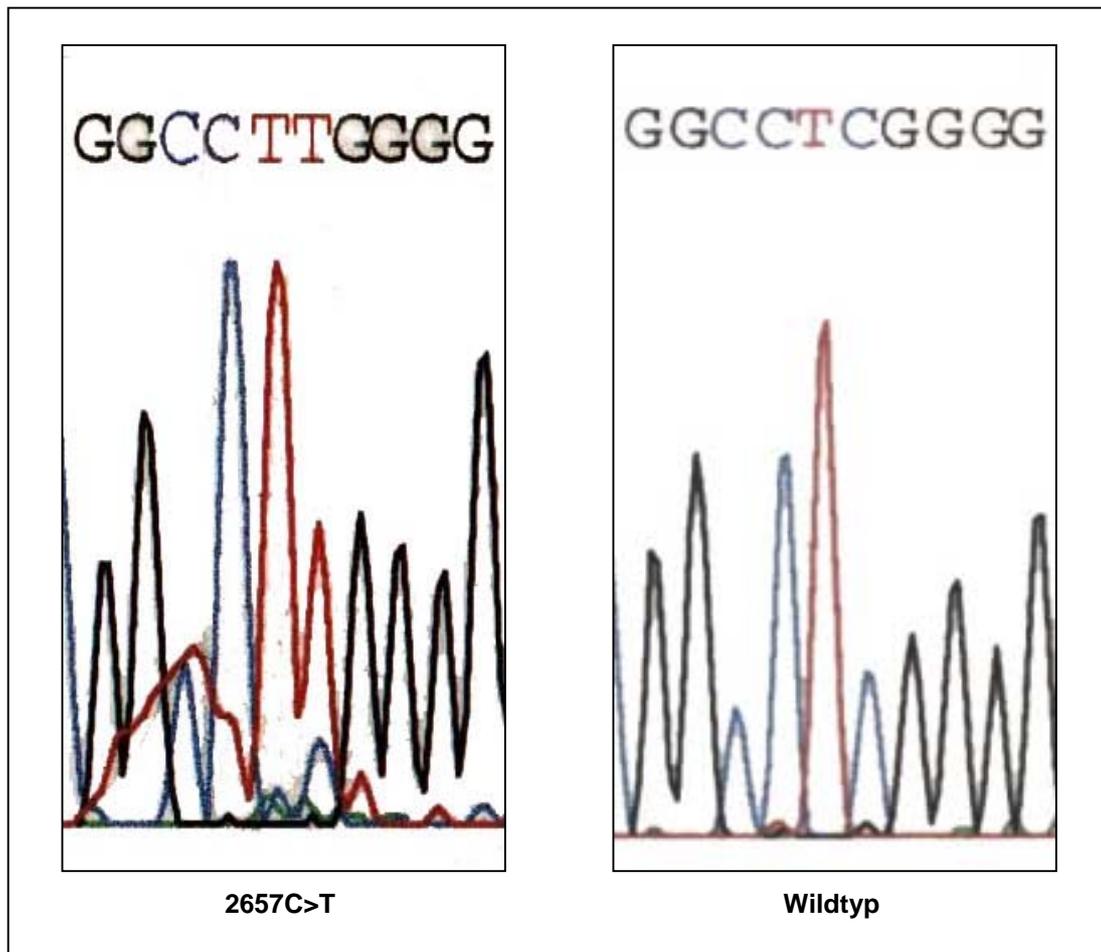


Abbildung 7 Sequenz und Kontrolle 2657C>T

3.3.5 Substitution 2684C>T

Ein Patient (Pat.# 528) wies in der SSCP Analyse unter beiden Bedingungen zusätzliche Banden auf. Diese erklärten sich durch die bei der folgenden Sequenzierung auf Position 2684 gefundene heterozygote Basensubstitution von Cytosin auf Thymin (2684C>T) (cDNA: 437C>T) (Abb.8). Hierbei wird ein codierendes Triplet (Codon 84) an zweiter Position verändert. GCG codiert im Wildtyp für Alanin, GTG codiert in der Mutante für Valin.

Auch bei diesem Patienten erfolgte eine Sequenzanalyse für alle weiteren Exons. Doch auch hier war die Suche nach einer weiteren Mutation leider erfolglos.

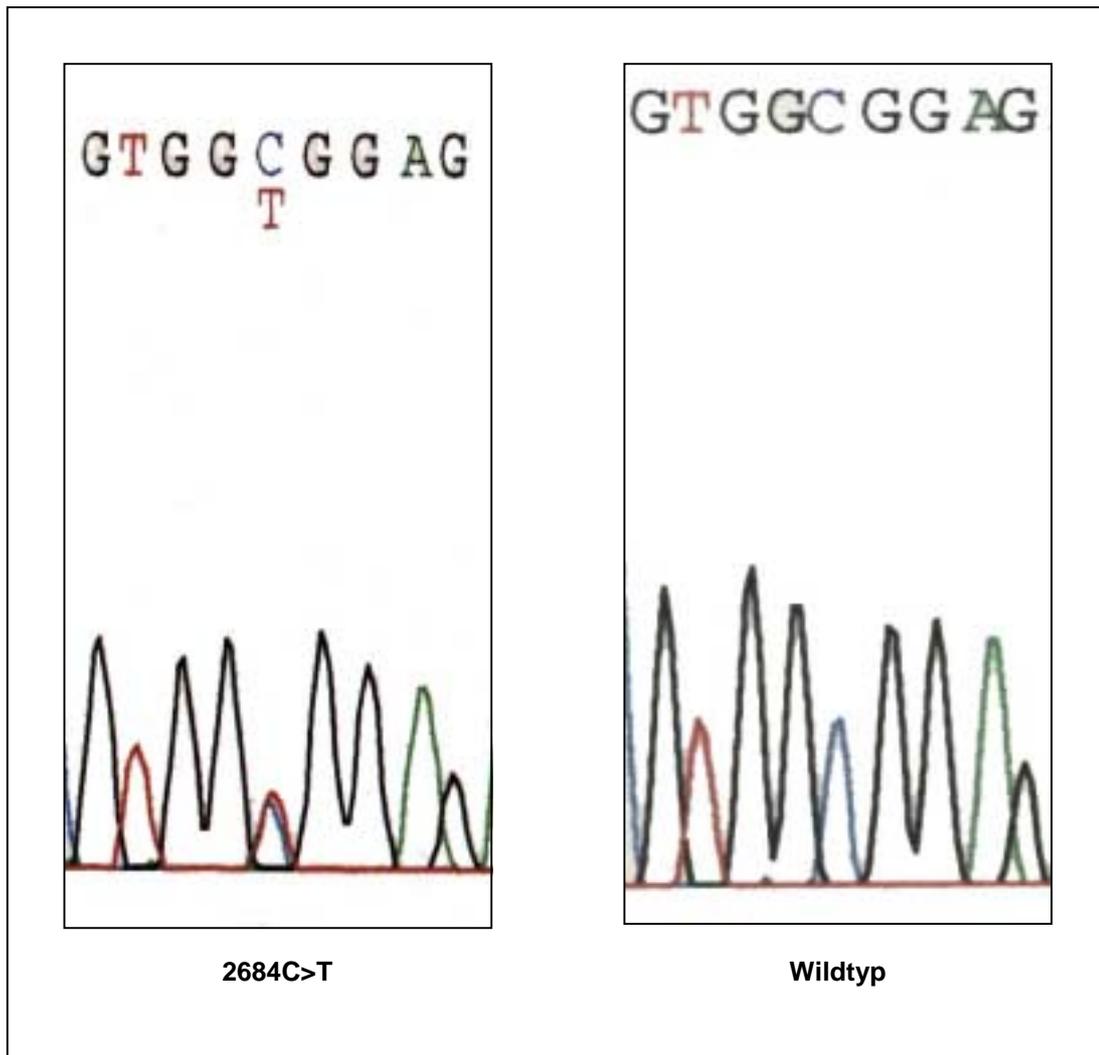


Abbildung 8 Sequenz und Kontrolle 2684C>T

3.3.6 Restliche Patienten

Alle restlichen Patienten wiesen identische Bandenmuster auf.

3.4. Untersuchungen im Exon 5

Das Exon hat eine Länge von 179 bp.

3.4.1. Substitution 4763G>A

Bei der SSCP- Analyse zeigte ein Patient (Pat.# 267) im PAAG-Gel bei den 3 charakteristischen Einzelstrangbanden Veränderungen auf. Die oberste Bande fehlte, während die mittlere eine Doppelbande aufwies. Die untere war unverändert. Die anschließende Sequenzierung ergab auf Position 4763 eine homozygote Basensubstitution von Guanin zu Adenin (4763G>A) (cDNA: 635G>A). Die Mutation verändert die zweite Stelle eines Codons. Statt CGG für Arginin findet sich CAG für Glutamin. Es handelt sich bei dieser Substitution um die von Maw et al. beschriebene Mutation [47].

3.4.2 Restliche Patienten

Alle anderen Patienten zeigten das typische Bandenmuster.

3.5. Untersuchungen im Exon 6

Das Exon hat eine Länge von 159 bp.

3.5.1 Deletion 8518delG

Ein Patient (# 535) zeigte bei der SSCP Analyse Doppelbandenbildung in beiden Bedingungen. Im PAA-Gel erkennt man anodenwärts eine Doppelbande und im PAA-Gel mit Glycerin eine Dreierbandenstruktur im Gegensatz zu der sonst üblichen Einerbande (Abb. 9). Die daraufhin durchgeführte Sequenzierung ließ die heterozygote Deletion 8518delG erkennen. Diese Deletion liegt genau an Position +1 nach Exonende (cDNA: 867+1delG) (Abb. 10). Daraus resultiert eine signifikante Veränderung des

Splice-Scores, der beim Wildtyp 67,3 und bei der Mutante 53,6 ergibt. Zur weiteren Bestätigung der Mutation wurde auch hier ein Enzymverdau mit dem Enzym TspR I durchgeführt. Dieses Enzym schneidet den Wildtyp in zwei Fragmente, wobei es an der Mutationsstelle seine Erkennungssequenz hat. Im Agarose Gel sind vier Banden erkennbar. Durch die Deletion wird diese Erkennungssequenz verändert und das Enzym kann nicht mehr schneiden. Im Agarose Gel sind bei Heterozygotie nur drei Banden sichtbar.

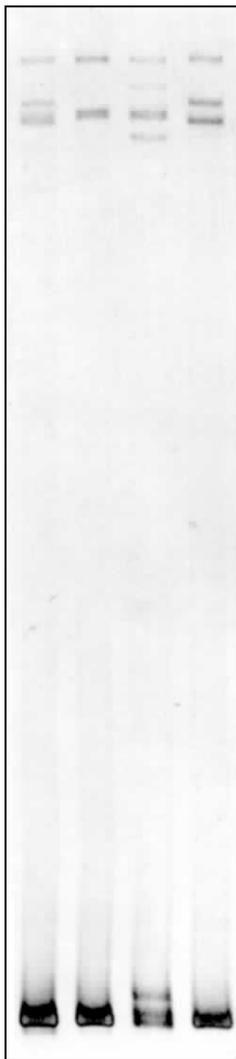


Abbildung 9
PAAG-Gel 8518delG

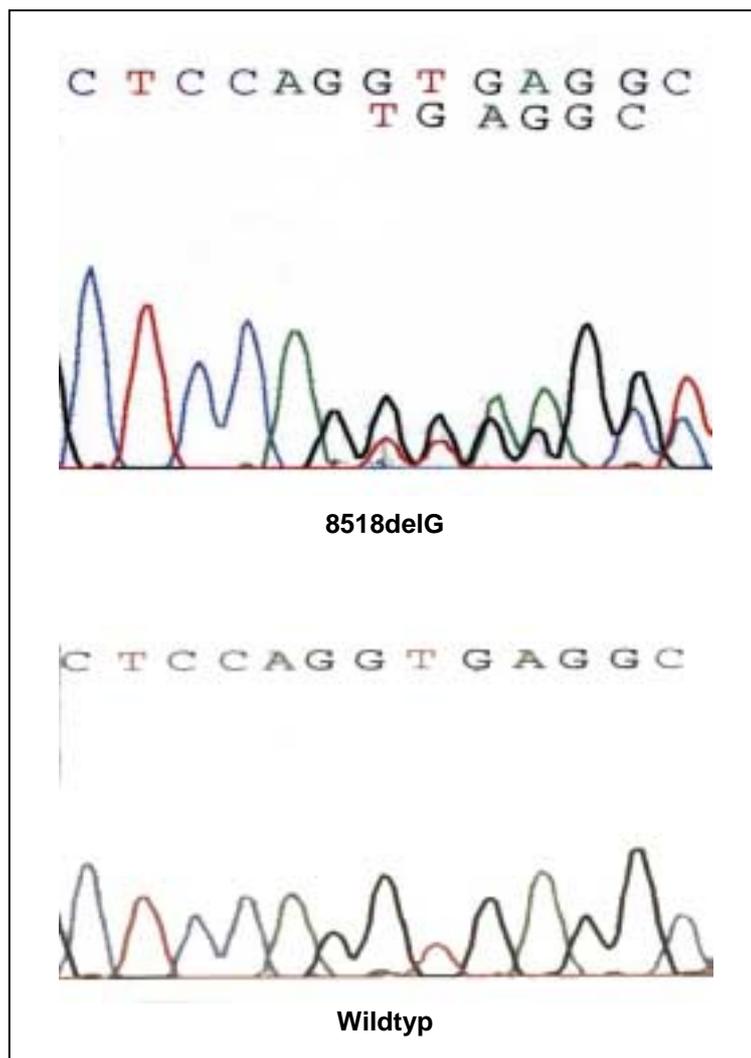


Abbildung 10
Sequenz und Kontrolle 8518delG

Bei diesem Patienten wurde eine Familienanalyse durchgeführt wegen einer weiteren heterozygoten Sequenzveränderung im Exon 4 (vgl. 3.3.1). Es wurde die DNA der Mutter, des Vaters und eines Geschwisterkinds mit der

SSCP Analyse untersucht. Bei den Doppelbanden ist deutlich zu erkennen, daß der Vater und das Geschwisterkind für dieses Exon identische Bandenmuster mit dem Patienten aufzeigen, während das Bandenmuster der Mutter dem Wildtyp entspricht (Abb. 11). In Verbindung mit den Ergebnissen der Familienanalyse auf Exon 4 ist daher vorstellbar, daß die beiden heterozygoten Mutationen zusammen ursächlich für die RP Erkrankung dieses Patienten sind.

Das Ergebnis der familienanalyse ist schematisch in Figur 3 dargestellt.

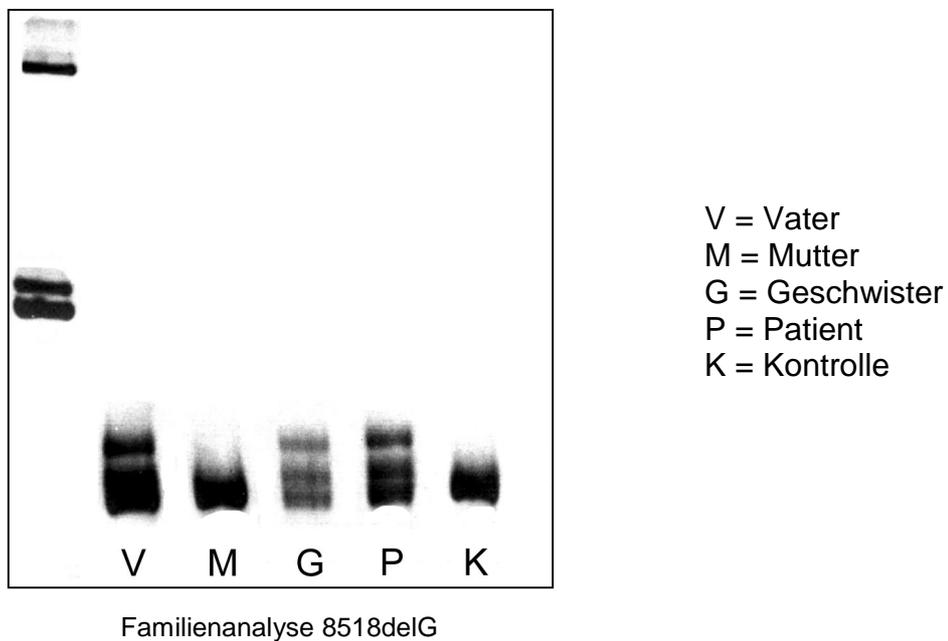
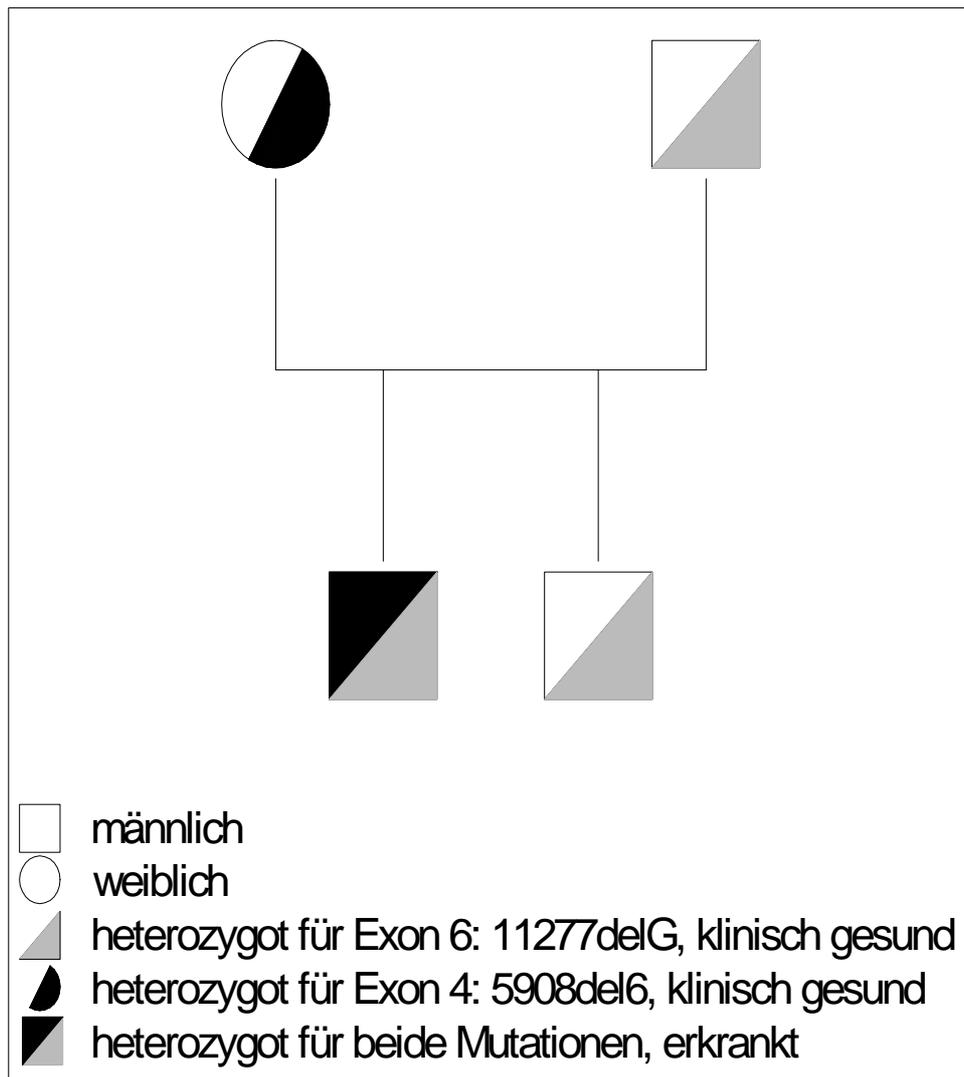


Abbildung 11



Figur 3 Stammbaum Patient #535

3.5.2 Restliche Patienten

Die restlichen Patienten zeigten ein dem Wildtyp entsprechendes Bandenmuster.

3.6. Untersuchungen im Exon 7

Das Exon hat eine Länge von 111 bp.

3.6.1 Substitution 9057C/T

Ein Patient (Pat.# 582) zeigt bei der SSCP Analyse den anderen Patienten gegenüber Veränderungen im Bandenmuster unter beiden Bedingungen auf. Im PAA-Gel zeigt dieser Patient in 3 von 4 charakteristischen Banden eine Doppelbande. Im PAA-Gel mit Glycerin zeigt er bei den Einzelsträngen kathodenwärts eine Doppelbande. Die daraufhin erfolgte Sequenzierung ergab einen heterozygoten Basenaustausch von Cytosin nach Thymin an Position 9057 (9057C/T). Diese Stelle befindet sich allerdings 24 Basenpaare vor dem ersten Nucleotid (im Intron 6) von Exon 7 (cDNA: 868–24C/T). Demnach ist diese Mutation weit außerhalb der codierenden Regionen angesiedelt und somit höchstwahrscheinlich ohne weitere Relevanz.

3.6.2. Restliche Patienten

Alle anderen Patienten zeigten die typischen Bandenmuster.

3.7 Untersuchungen im Exon 8

Das Exon hat eine Länge von 555 bp. Auf Grund seiner Länge wurde es in zwei Teilstücken untersucht, die hier der Einfachheit halber 8a und 8b genannt werden.

3.7.1. Untersuchungen im Exonteilstück 8a

Bei der SSCP Analyse zeigten alle Patienten identische Bandenmuster. Auf weitere Untersuchungen wurde deswegen verzichtet.

3.7.2. Untersuchungen im Exonstück 8b

Bei der SSCP Analyse zeigten sich verschiedene Bandenmuster, die alle häufig vertreten waren, so daß der Verdacht von Polymorphismen nahe lag. Analysiert wurden der Wildtyp, die beiden homozygoten Polymorphismen, sowie ein für beide Polymorphismen heterozygoter Patient.

3.7.2.1 Substitution 9772G/T

Bei einem Patienten (Pat. #339) fand sich bei der SSCP Analyse im PAA-Gel ein abweichendes 3-Banden Muster und im PAA-Gel mit Glycerin ein ebenfalls auffälliges in Richtung Anode verschobenes 2 Banden Muster. Die erfolgte Sequenzierung erbrachte eine homozygote Substitution auf Position 97721 von Guanin auf Thymin (9772G/T; cDNA: 1304G/T). Obwohl noch auf Exon 8 gelegen, befindet sich diese Mutation 107 bp hinter dem ersten STOP Codon. Zwei weitere sind sogar noch dazwischengeschaltet. Diese Position läßt an eine klinische Relevanz nicht denken.

3.7.2.2. Substitution 9901G/A

Bei einem Patienten (Pat.# 397) zeigte sich in der SSCP Analyse ein 3-Bandenmuster unter beiden Bedingungen. Die anschließende Sequenzierung erbrachte einen homozygoten Basenaustausch von Guanin auf Adenin. Diese Substitution (9901G/A) lag außerhalb von Exon 8 (cDNA: 1317+116G/A) sowie 175 bp Basenpaare hinter dem Stopcodon. Auch hier ist auf Grund der Position der Substitution keine klinische Relevanz gegeben.

3.7.2.3. Restliche Patienten

Anhand der Bandenmuster der übrigen Patienten läßt sich sagen, ob ein Wildtyp, eine Heterozygotie für jeweils eine der beiden Mutationen, eine Homozygotie für eine der beiden Mutationen oder eine Heterozygotie für beide Mutationen vorliegt. Auf weitere Analysen wurde verzichtet.

Tabelle 3-1 Übersicht der gefundenen Sequenzvarianten

Exon	Sequenzvarianten	Erwartete Folgen
2	853G/A	?
4	2778del6	Splice Score Alterat.
	2733C/T	?
	2736A/C	?
	2657C>T	Serin>Leucin Codon 75
	2684C>T	Alanin>Valin Codon 84
5	4763G>A	Arginin>Glutamin Codon 150
6	8518delG	Splice Score Alterat.
7	9057C/T	?
8	9772G/T	?
	9901G/A	?

4. Diskussion

Bis vor einigen Jahren waren die Mutationen, die man mit der Genese von Retinitis pigmentosa in Verbindung brachte, auf Gene beschränkt, die unmittelbar für Komponenten des Phototransduktionsprozesses in der Photorezeptorzelle codieren oder für Strukturproteine (vgl. 1.2.3). Obwohl Mutationen in acht Genen entdeckt werden konnten, so stellten sie doch nur einen geringen Prozentsatz der Krankheitsfälle dar [22]. Es war also wahrscheinlich, daß Veränderungen an Komponenten außerhalb der Rezeptorzelle für die Entstehung der Krankheit in Frage kommen könnten. Cotran et al. vermuteten bereits 1990, daß eventuell Mutationen am für CRALBP codierenden Gen ebenfalls für Formen der Retinitis pigmentosa verantwortlich sein könnten. Allerdings konnten sie damals noch keinen Hinweis dafür finden, daß eine solche Mutation in Zusammenhang mit RP steht [15]. Erst 1997 bestätigten zwei Veröffentlichungen in Nature Genetics diese These. So konnten Maw et al. erstmals eine Mutation im RLBP1-Gen im Zusammenhang mit Retinitis pigmentosa nachweisen [47]. In der gleichen Ausgabe beschreiben Gu et al. Mutationen im Gen RPE65, einem Gen, das für ein Protein codiert, welches an der enzymatischen Regeneration von 11-cis-Retinal beteiligt ist [30]. RLBP1 kodiert für CRALBP, das ebenfalls in den Regenerationsvorgang von 11-cis-Retinal eingebunden ist. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht die Ergebnisse von Maw et al. weiter zu untermauern und weitere Mutationen in diesem Gen zu lokalisieren, was auch gelang.

4.1 Diskussion der Ergebnisse

Die in meiner Versuchsreihe gefundenen Mutationen sind nicht gleichmäßig auf die einzelnen Exons verteilt. Man könnte folglich annehmen, daß es im Gen RLBP1 Regionen gibt, in denen sich die Anzahl von Sequenzveränderungen häufen. So konnten in den Exons 3 und 8a keine Mutationen nachgewiesen werden, während allein in Exon 4 fünf

verschiedene existieren. Dieser Eindruck täuscht allerdings, da andere Studien, die später noch besprochen werden, auch in den anderen Exons eine oder mehrere Mutationen nachweisen konnten. Demnach ergibt sich in der Gesamtheit betrachtet eine relativ ausgeglichene Verteilung der Mutationen über die einzelnen Exons. Eine besonders vulnerable Region scheint folglich nicht zu bestehen.

Insgesamt konnten 11 Mutationen in dem Gen RLBP1 nachgewiesen werden. Davon waren 6 klinisch irrelevant, da sie sich entweder in einem Intron befanden oder es sich um Basensubstitutionen an dritter Stelle eines Codons handelte, die nicht zu einem Aminosäureaustausch führten. Bei den gefundenen 5 Mutationen, die eine Änderung der Proteinstruktur zur Folge haben, war nur eine homozygot; die 4 restlichen waren heterozygot. Jedoch konnten bei diesen 4 Patienten nur in einem Falle zwei heterozygote Mutationen bei einer Person aufgezeigt werden.

Bei Exon 8b lagen die beiden gefundenen Mutationen (9772G/T, 9901G/A) weit nach dem STOP Codon. Es wurde von den 100 untersuchten Patienten jeweils einer gefunden, der für eine der beiden Mutationen eine Homozygotie aufwies. Der Rest verteilte sich auf Wildtyp und heterozygote Varianten. Da sich die Veränderungen aber wie schon gesagt 107 bzw. 175 Basenpaare weit im nicht-codierenden Bereich befinden, kann von einer Relevanz für die Pathogenese der RP nicht ausgegangen werden.

Ebenso verhält es sich mit der dem Exon 7 zugeordneten Mutation 9057C/T. Sie liegt 24 Basenpaare vor dem Beginn des Exons und somit ebenfalls im nicht codierenden Bereich. Hierfür ist nur ein Patient heterozygot. Auch hier ist keine pathogenetische Relevanz gegeben.

Es wurden drei weitere Mutationen gefunden, die zwar in Exons liegen, allerdings nicht die Aminosäurestruktur des Proteins verändern. In Exon 2 wurde eine Basensubstitution auf Position 853 von Guanin auf Adenin (853G/A) festgestellt. Dieser Austausch befindet sich an dritter Stelle des entsprechenden Codons. Da jedoch der genetische Code für eine

Aminosäure an dritter Stelle variabel ist [46], codieren sowohl das Triplet CGG als auch CGA für die selbe Aminosäure, nämlich Arginin. Folglich wird die Aminosäuresequenz nicht verändert; das Protein bleibt in seiner Struktur und Eigenschaften gleich. Auch in diesem Falle ist kein kausaler Zusammenhang zwischen Sequenzveränderung und Krankheit gegeben.

Ebenso verhält es sich mit zwei weiteren Mutationen an dritter Stelle eines Triplets, die auf Exon 4 nachgewiesen werden konnten. Sie liegen in direkt aufeinanderfolgenden Triplets, allerdings bei verschiedenen Patienten. Beide wurden jeweils nur bei einem einzigen Patienten gefunden. Die Mutation 2733C/T in heterozygoter Form, Mutation 2736A/C in homozygoter. Auch hier gilt: Wildtyp und Mutante codieren für die gleiche Aminosäure.

Es wurden in den Exons 2,3,7 und 8 keine oder nur irrelevante Sequenzveränderungen entdeckt.

1999 veröffentlichten Morimura et al. ihre Ergebnisse der bisher umfangreichsten Screening-Untersuchung in diesem Gen [51]. Sie untersuchten insgesamt 324 Patienten. Ebenso wie in dieser Arbeit fanden sie mehr (10) in Betracht auf die Netzhauterkrankung konsequenzlose Veränderungen, konnten aber folgende vier relevanten, homozygoten Mutationen nachweisen:

1. Intron 3: T1335C ;splice donor site, IVS3+2 (GT zu GC)
2. Exon 6: T8140A; Met226Lys (ATG zu AAG)
3. Exon 7: C9096T; Arg234Trp (CGG zu TGG)
4. Exon 8: 9483delC; Gln278(1 bp del) (CAG zu –AG)

All diese Mutationen traten jeweils nur einmal auf, wobei 1. und 2. in ein und demselben Patienten vorkommen. Alle drei Patienten leiden unter der selben Form der RP, der Retinitis punctata albescens, weshalb die Autoren darauf schließen, daß diese 4 Mutanten ursächlich für diesen speziellen Phänotypen sind. Patienten mit Retinitis punctata albescens bieten im ERG Zeichen der generalisierten Netzhautdegeneration, eine gesteigerte Adaptationsschwelle für das Dunkelsehen sowie ophtalmoskopisch

verdünnte Arteriolen und weißlich/gelbe Ablagerungen subretinal. Wegen der extrem niedrigen Inzidenz dieses Phänotypen erscheint es als nicht verwunderlich, daß die von Morimura nachgewiesenen Mutationen nicht bei den in dieser Dissertation untersuchten Patienten gefunden wurden. Folglich scheint sich die Vermutung der Autoren zu bestätigen, daß die von ihnen beschriebenen Varianten nur für die Retinitis punctata albescens verantwortlich sind.

Eine weitere Arbeit, die sich mit Mutationen auf dem Gen RLBP1 beschäftigte, konnte ebenfalls in Exon 7 eine Mutation feststellen. Burstedt et al. konnten bei 20 Personen mit Bothnia Dystrophy, einer Variante der Retinitis punctata albescens, eine homozygote Cytosin zu Guanin Substitution mit resultierendem Aminosäuretausch bei Position 234 von Arginin auf Tryptophan [12] nachweisen. Hier lag ein Founder Effekt vor, was wiederum erklärt, daß diese Mutation nicht in dem hier untersuchten Patientengut vorkam.

Die bereits mehrfach angesprochene, von Maw et al. bei einem indischen Patienten erstmals beschriebene Mutation 4763G>A in Exon 5, welche zu einem Aminosäureaustausch bei Residuum 150 von Arginin nach Glutamin führt, konnte auch bei dieser Versuchsreihe in homozygoter Form bei einem indischen Patienten gefunden werden. Es konnte allerdings nicht hinreichend geklärt werden, ob die untersuchte DNA in beiden Fällen nicht von ein und dem selben Patienten stammte. Fest steht nur, daß der von mir untersuchte Patient ebenfalls aus Indien kommt. Dennoch kann dieses Resultat als Bestätigung der Ergebnisse von Maw et al. gewertet werden.

In einer weiteren aktuellen Studie von Bernal et al., in der 50 Familien mit arRP, sowie 4 Familien mit Retinitis punctata albescens untersucht wurden, konnten keine pathogenetisch relevanten Mutationen nachgewiesen werden [4]. Interessanterweise ist in diesem Patientengut auch nicht die Sequenzveränderung 2778del6 beschrieben worden.

Das wohl auffälligste Ergebnis der Untersuchungen in dieser Arbeit findet sich eindeutig in Exon 4. Dort ist an der Splice Site zu Intron 5 eine 6 bp Deletion gefunden worden. Vor allem die Inzidenz dieser Mutation ist bemerkenswert. Von zuerst 100 untersuchten Patienten waren 4 positiv, so

daß 211 weitere in diesem Exon nachgescreent wurden. Insgesamt konnte in 9 Fällen, d. h. knapp 3% diese Deletion gefunden werden. Die Möglichkeit eines Founder-Effekts wurde angedacht, konnte aber durch die anschließende Haplotypen-Analyse nicht bestätigt werden. Es ist bemerkenswert, daß die Schnittwahrscheinlichkeit durch die Lokalisation mitten in der Splice Site signifikant abnimmt (von knapp 95% auf etwa 74%). Zu beachten sind zwei Tatsachen: Zum einen wurde bei der Kontrollgruppe von 50 randomisierten Personen ebenfalls diese Mutation in zwei Fällen gefunden. Zum anderen konnte keine einzige homozygote Variante entdeckt werden. Einen ähnlichen Rückschluß zieht Morimura, der in seiner Studie 3 Patienten mit 2778del6 fand sowie 4 in der Kontrollgruppe. Er mißt dieser Mutation keine Bedeutung zu und erwähnt sie nur kurz in einer mit „Polymorphismen, seltene stille Varianten und seltene Varianten mit unklarer Pathogenität“ betitelten Auflistung. Die Vermutung liegt also nahe, besonders wenn man die Kontrollgruppen im Auge behält, daß es sich hierbei um eine Normvariante handelt.

Bei einem Patienten konnte eine weitere heterozygote Mutation auf dem anderen Allel gefunden werden. Es handelt sich ebenfalls um eine Deletion, die in der Literatur noch nicht beschrieben ist: In Exon 6 findet sich in der Splice Site ein Wegfall von Guanin genau an Position +1 nach Exonende (8518delG). Auch hier findet eine signifikante Veränderung des Splice Scores von 67,3 im Wildtyp zu 53,6 bei der Mutante statt.

Klinisch weist der Patient einen early-onset Verlauf auf. Bereits im Vorschulalter beklagte er Probleme beim Nacht- und Dämmerungssehen. Diese Klinik läßt eine Schädigung und den Untergang der für diese Fähigkeit benötigten Stäbchen-Photorezeptorzellen vermuten und ist typisch für die RP (vgl. 1.2.1 und 1.2.2). Es stellte sich eine stetige Progradienz der Degeneration ein, so daß erste subjektive Gesichtsfeldveränderungen im Alter von 25 Jahren auftraten. Zu diesem Zeitpunkt wurde das Blitz-ERG als erloschen befundet, bei der Fundoskopie offenbarten sich blasse Papillen, deutlich verengte Gefäße, sowie eine unregelmäßige Pigmentierung im peripheren Pigmentepithel. Knochenkörperchenpigmentierungen wurden

nicht gefunden. Es wurde die Diagnose einer Retinitis Pigmentosa sine pigmentu gestellt. Zum Zeitpunkt der letzten Kontrolluntersuchung mit 46 Jahren wurde das isolierte Stäbchen-ERG als erloschen, das photopische ERG seitengleich mit deutlich reduzierten Zapfen-Antworten bewertet. Im skotopischen ERG fiel auf, daß die Maximalantwort (Zapfen-Stäbchen-Mischantwort) eine nahezu identische Kurve mit dem photopischen Einzelblitzsignal aufwies. Diese Tatsache läßt vermuten, daß die Maximalantwort in diesem Fall nur durch das Zapfensystem erzeugt wird, was auf eine vollständige Funktionseinbuße der Stäbchen-Photorezeptorenzellen hindeutet. Die Fundoskopie war mit den Vorbefunden gleich, jetzt aber noch zusätzlich mit ausgeprägten atrophischen Veränderungen der Macula vergesellschaftet. Die Diagnose der Retinitis Pigmentosa sine pigmentu wurde aufrecht erhalten.

Interessant ist die Klinik des Patienten unter zwei Aspekten. Zum einen gleichen die oben beschriebenen ERG-Befunde denen, die auch für eine Vitamin-A-Mangelretinopathie charakteristisch sind. Bei dem Patienten ist anamnestisch von einem exogenen Vitamin-A-Mangel nicht auszugehen. Dennoch spricht die Klinik für eine Störung des Vitamin-A-Haushaltes. Dieses läßt sich mit den genetischen Befunden korrelieren. Der Patient trägt zwei allelische heterozygote Mutationen im RLBP1-Gen. Saari et al. [56] zeigen in ihrer Arbeit auf, daß CRALBP den Vitamin-A-Stoffwechsel beeinflusst (vgl. 1.3.2), so daß davon auszugehen ist, daß bei diesem Patienten ein relativer Vitamin-A-Mangel herrscht. Das deutet darauf hin, daß die in dieser Arbeit entdeckte Mutationskonstellation durch negative Auswirkungen auf die Verstoffwechslung des Rhodopsins pathogen ist.

Zum zweiten offenbaren sich deutliche klinische Parallelen zu anderen Patienten mit CRALBP-Mutationen. Insbesondere zu denen, die von Maw et al. [47] beschrieben wurden, zeigt sich eine deutliche Übereinstimmung. Jene Patienten zeichnen sich ebenfalls durch einen early-onset und stark eingeschränkte bis erloschene ERGs aus. Die fundoskopischen Befunde muß man als identisch bewerten: enggestellte Gefäße, maculäre Degeneration ohne Knochenkörperchen. Ob die von Maw et al.

beschriebenen versprengten weißen Flecken auf dem Retinagrund der bei dem hier untersuchten Patienten festgestellten unregelmäßigen Pigmentierung entsprechen oder eher auf eine Retinitis punctata albescens deuten, ist nicht eindeutig zu klären. Somit ist im Rahmen des Literaturvergleichs keine genaue Zuordnung möglich.

Maw et al. kommen ebenfalls zu der Schlußfolgerung, daß der Vitamin-A-Haushalt durch eine Mutation in CRALB negativ alteriert wird und somit zur Ausbildung von RP führt. Die von ihnen geäußerte Hoffnung, einen Großteil der nicht Syndrom-assoziierten RP-Fälle einem gestörten Vitamin-A-Stoffwechsel zuzuschreiben, hat sich allerdings bislang noch nicht bestätigen lassen. Insgesamt wurden bei doch relativ hohen Screening Zahlen in den hier diskutierten CRALBP-assoziierten Studien nur wenige relevante Mutationen gefunden. Besonders die von Burstedt et al. [12] und Morimura et al. [52] beschriebenen Mutationen beziehen sich ausschließlich auf die Variante der Retinitis punctata albicans. Zwar zeigen sich auch hier klinische Parallelen (insbesondere das Fehlen der RP typischen Knochenkörperchen), für einen eingehenden Vergleich fehlen allerdings ausführliche Daten über die Resultate der elektrophysiologischen Untersuchungen. Dennoch bleibt zu vermuten, daß ein hohes krankheitsauslösendes Potenzial in Veränderungen an den mit dem Vitamin-A-Stoffwechsel verbundenen Proteinen liegt, wie z.B. auch dem RPE65-Gen (Gu et al. [30]). Weitere Studien auf diesem Feld, auch an anderen Kandidatengenen könnten weitere interessante Rückschlüsse erlauben.

Um zu beweisen, daß es sich bei den in dieser Arbeit gefundenen Mutationen um allelische Veränderungen handelt, wurde die DNA der Eltern und des Geschwisterkindes des betroffenen Patienten untersucht. Bei der Untersuchung der Familie ergab sich, daß der Vater und das Geschwisterkind heterozygot für die Mutation 8518delG in Exon 6 sind, während die Mutter in Exon 4 eine Heterozygotie für die 2778del6-Mutante besitzt. Mutter, Vater und das Geschwisterkind sind phänotypisch unauffällige Träger, während das beide Mutationen aufweisende Kind erkrankt ist. Diese Familienanalyse unterstützt die Vermutung, daß die Kombination aus beiden Mutationen zur Erkrankung an RP führt.

Die Relevanz von Splice Site Mutationen wurde ausführlich von Krawczak et al. [41] dargelegt, so daß eine Kombination von 2 heterozygoten Splice Site Mutationen sehr wohl für eine Pathogenität spricht. Interessant sind auch die Überlegungen, die sich in Anbetracht der oben erwähnten Kontrollgruppenresultate ergeben könnten. Aus den gefundenen Ergebnissen ließe sich folgern, daß die in der Normalbevölkerung vorkommende Normvariante 2778del6 in Kombination mit einer weiteren, für Retinitis pigmentosa spezifischen, heterozygoten Mutation des RLBP1-Gens sehr wohl pathogen sein könnte. Die klinischen Auswirkungen dieser Schlußfolgerung werden weiter unten diskutiert (vgl. 4.2). Voraussetzung ist allerdings sicherlich der Nachweis von weiteren Kombinationen der Deletion 2778del6 mit anderen heterozygoten Mutationen.

In dieser Arbeit wurden noch zwei weitere heterozygote Mutationen entdeckt, die bisher noch nicht beschrieben sind. Es handelt sich um jeweils einen Basenaustausch, 2657C>T und 2684C>T, lokalisiert im Exon 4. Beide verändern die Aminosäuresequenz. Im ersten Fall ersetzt Leucin das Serin des Wildtypes, im zweiten Valin das Alanin. Allerdings konnten in beiden Fällen keine weitere heterozygote Mutation gefunden werden. Dennoch bleiben diese beiden Veränderungen mögliche Kandidaten im Hinblick auf eine Pathogenität bezüglich RP und es bleibt abzuwarten, ob in etwaigen Folgestudien diese Mutationen eine Rolle spielen werden.

4.2 Ausblick

Die interessante Mutation dieser Arbeit ist ohne Zweifel die 6 bp Deletion in Exon 4. Bemerkenswert ist, daß Morimura et al. dieser Variante in ihrer Arbeit keinerlei Bedeutung zumessen. In dieser Dissertation konnte aufgezeigt werden, daß diese Variante eventuell doch von Bedeutung ist. Dadurch, daß bei einem Patienten zusätzlich noch eine andere heterozygote Mutation gefunden wurde, läßt sich der Schluß ziehen, daß diese, allein nicht

mit RP assoziierte und auch in der Normalbevölkerung vorkommende Variante, in Kombination mit einer pathogenen Mutation sehr wohl krankheitsrelevant sein kann. Sie würde somit einen Risikofaktor für diese Krankheit darstellen. Könnten in anderen Studien weitere Kombinationen von 2778del6 mit anderen Mutationen bei an RP erkrankten Patienten nachgewiesen werden, dann hätte das sicherlich den Zusammenhang zwischen dieser Mutante und RP eindrucksvoll bewiesen.

Desweiteren gilt es für die zuvor noch nicht beschriebenen heterozygoten Mutationen 2657C>T und 2684C>T in Exon 4 eine Pathogenität zu beweisen. Könnte eine homozygote Mutation bei einem Patienten nachgewiesen werden, so wäre auch dies ein weiterer kleiner Baustein in dem Versuch die Genetik der RP zu entschlüsseln. Denn nach wie vor gilt für die Medizin, daß am besten behandelt werden kann, was verstanden wird.

Ebenfalls interessant wäre die Entdeckung einer homozygoten Variante der Deletion einer Base an der Splice Site von Exon 6. Der Beweis der alleinigen Pathogenität dieser Mutation würde die oben aufgestellte These unterstützen.

An dieser Stelle läßt sich eine Parallele zum CFTR-Gen ziehen. Mutationen in diesem Gen sind Ursache für die klassische Mukoviszidose (CF), wie auch der genitalen Form, der kongenitalen beidseitigen Vas-deferens-Aplasie (CBAVD). Im Intron 8 des CFTR-Gens kommt ein Polypyrimidintrakt in drei verschiedenen Längen (5{IVS8-5T}, 7{IVS8-7T} oder 9{IVS8-9T} Thymidin) vor, wobei dieser entscheidend die Erkennung des Exons 9 beeinflußt. Mit 7T oder 9T wird das Exon 9 in 70-90% der Fälle in die mRNA-Transcripte eingebaut, mit 5T nur in 10-40%. Eine heterozygote Mutation an einem Allel mit IVS8-7T/bzw. 9T auf dem anderen Allel führt entsprechend noch nicht zur CBAVD, wohl aber mit IVS8-5T [65].

Dieser Zusammenhang legt dar, daß eine in einem Intron gelegene Variante im Rahmen einer „compound“ Heterozygotie sehr wohl pathogen sein kann.

Die klinische Relevanz der Untersuchungen dieser Dissertation ergibt sich daraus, daß es nun als erwiesen angesehen werden kann, daß nicht nur in Einzelfällen Mutationen im retinalen Pigmentepithel ursächlich für RP sind. Daraus resultiert eine neue Behandlungsperspektive. Bisher konnten mit RP

assoziierte Syndrome nur symptomatisch behandelt werden, wie z.B. das Bassen-Kornzweig-Syndrom durch Vitamin A Gaben [40] oder das Refsum-Syndrom durch Phytansäure-arme Kost [54]. Alle weiteren Behandlungsversuche waren unspezifisch, wie zum Beispiel die hochdosierte Vitamin A Gabe [7]. Jetzt ergibt sich eventuell die Möglichkeit zu einer kurativen Therapie. Zur Zeit werden Versuche durchgeführt, bei denen die Erfolgchancen einer Transplantation von retinalem Pigmentepithel ausgetestet werden [1,24]. Bisher nur im Tierversuch durchgeführt, steht man allerdings auch hier, wie in der gesamten Transplantchirurgie, vor dem Problem der immunogenen Abstoßung [71]. Sollten in der Zukunft Transplantationsreihen am Menschen erfolgreich sein, dann könnte einem bedeutenden Anteil von RP Patienten geholfen werden.

Diese Arbeit zeigt einmal mehr, daß es sich bei Mutationen in Genen, die für Proteine des RPE codieren, nicht um isolierte Einzelfälle handelt, sondern der Anteil an Gesamtfällen im Verlauf weiterer Screeninguntersuchungen ansteigt. Das unterstützt somit neue therapeutische Ansätze.

5. Zusammenfassung

Retinitis pigmentosa ist eine weltweit verbreitete, genetisch bedingte Augenkrankheit mit einer Inzidenz von etwa 1: 4000. Sie führt im Verlauf zum Verlust des Sehvermögens der Patienten und beruht auf Veränderungen im Erbgut, wobei verschiedene Vererbungsmodi existieren. In dieser Dissertation wurde die DNA von 100 Patienten, die an autosomal-rezessiv vererbter RP (arRP) erkrankt sind, auf Mutationen im Gen RLBP1, welches für das zelluläre Reinaldehyd-bindende Protein (CRALBP) codiert, untersucht. Weitere 211 Patienten wurden nur in Exon 4 des RLBP1-Gens analysiert. Dabei konnten insgesamt 11 Sequenzveränderungen gegenüber dem Wildtyp festgestellt werden, wobei sich sechs als pathogenetisch irrelevante Polymorphismen erwiesen, indem sie seltene oder häufigere Varianten ohne Aminosäureaustausch darstellten oder außerhalb der codierenden Regionen lagen.

Fünf Mutationen führten zu einer Änderung der Aminosäuresequenz oder alterierten die Splice-Stelle zwischen Exon und Intron. Die einzige homozygote Mutation 4763G>A (Arg→Glu in Codon 150), die in Exon 5 entdeckt wurde, ist in der Literatur bereits beschrieben. Zwei Basensubstitutionen, 2657C>T (Ser→Leu in Codon 75) und 2684C>T (Ala→Val in Codon 84), konnten in heterozygoter Form bei jeweils einem Patienten festgestellt werden, ohne eine zweite RLBP1-Mutation zu finden. Hier wäre die Pathogenität der Erbgutveränderung in zukünftigen Studien durch den Nachweis einer homozygoten Form oder die Kombination mit einer weiteren heterozygoten Mutation noch zu beweisen.

Ein Patient zeigte eine (im gesamten Patientengut häufig vorkommende) heterozygote 6 bp Deletion an der Splice Site zu Intron 5 (2778del6) sowie eine heterozygote 1 bp Deletion an der Splice Site zu Intron 7 (8518delG). Erstere ist in der Literatur bisher nur als vereinzelt vorkommende Variante ohne Relevanz beschrieben, letztere noch gar nicht. Es konnte in dieser Arbeit eine Konsegregation der beiden Veränderungen mit dem Phänotyp der Retinitis Pigmentosa sine pigmentu nachgewiesen werden, so daß die

Kombination dieser beiden Mutationen wahrscheinlich die Ursache für die Erkrankung des Patienten darstellt.

Insgesamt zeigt diese Arbeit eine genetische Ursache sowie zwei weitere wahrscheinlich pathogene Mutationen für arRP auf und bestätigt zudem nochmals bereits veröffentlichte Forschungsergebnisse anderer Gruppen.

Diese Dissertation versteht sich schlußendlich als ein weiterer Baustein auf dem Weg zum besseren Verständnis und auch Behandlung der Krankheit Retinitis pigmentosa.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Algvare PV. Clinical possibilities in retinal pigment epithelial transplantations. *Acta Ophthalmol Scand* 1997; 75(1):1.
- [2] Antonarakis SE. Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations. Nomenclature Working Group. *Hum Mutat* 1998; 11(1):1-3.
- [3] Beaudet AL, Tsui LC. A suggested nomenclature for designating mutations. *Hum Mutat* 1993; 2(4):245-248.
- [4] Bernal S, Calaf M, Adan A, Solans T, Valverde D, Ayuso C, Baiget M. Evaluation of RLBP1 in 50 autosomal recessive retinitis punctata albescens Spanish families. *Ophthalmic Genetics* 2001, 22(1):19-25.
- [5] Bernstein PS, Law WC, Rando RR. Isomerization of all-trans-retinoids to 11-cis-retinoids in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84(7):1849-1853.
- [6] Berson EL. The Friedenwald Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34(5):1659-1676.
- [7] Berson EL, Rosner B, Sandberg MA, Hayes KC, Nicholson BW, Weigel-DiFranco C *et al.* A randomized trial of vitamin A and vitamin E supplementation for retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol* 1993; 111(6):761-772.
- [8] Bok D. Retinal transplantation and gene therapy. Present realities and future possibilities. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34(3):473-476.
- [9] Bok D. The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision. *J Cell Sci Suppl* 1993; 17:189-195.
- [10] Boughman JA, Fishman GA. A genetic analysis of retinitis pigmentosa. *Br J Ophthalmol* 1983; 67:449-454.
- [11] Bunge S, Fuchs S, Gal A. Simple and nonisotopic methods to detect unknown gene mutations in nucleic acids. *Methods in Molecular Genetics* 1996; 8:26-36.

- [12] Burstedt MS, Sandgren O, Holmgren G, Forsman-Selb K. Bothnia Dystrophy Caused by Mutations in the Cellular Retinaldehyde-Binding Protein Gene (RLBP1) on Chromosome 15q26. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40(5):995-1000.
- [13] Chang GQ, Hao Y, Wong F. Apoptosis: final common pathway of photoreceptor death in rd, rds, and rhodopsin mutant mice. *Neuron* 1993; 11(4):595-605.
- [14] Chen Y, Johnson CM, West KA, Goldflam S, Bean MF, Huddleston MJ *et al.* Mapping the Retinoid-binding Domain of Cellular Retinaldehyde-binding Protein. In: Crabb JW, ed. *Techniques in Protein Chemistry V*. San Diego: Academic Press. 1994: 371-378.
- [15] Cotran PR, Ringens PJ, Crabb JW, Berson EL, Dryja TP. Analysis of the DNA of patients with retinitis pigmentosa with a cellular retinaldehyde binding protein cDNA. *Exp Eye Res* 1990; 51(1):15-19.
- [16] Crabb JW, Carlson A, Chen Y, Goldflam S, Intres R, West KA *et al.* Structural and functional characterization of recombinant human cellular retinaldehyde-binding protein. *Protein Sci* 1998; 7(3):746-757.
- [17] Crabb JW, Goldflam S, Harris SE, Saari JC. Cloning of the cDNAs encoding the cellular retinaldehyde-binding protein from bovine and human retina and comparison of the protein structures. *J Biol Chem* 1988; 263(35):18688-18692.
- [18] Crabb JW, Johnson CM, Carr SA, Armes LG, Saari JC. The complete primary structure of the cellular retinaldehyde-binding protein from bovine retina. *J Biol Chem* 1988; 263(35):18678-18687.
- [19] Deigner PS, Law WC, Cañada FJ, Rando RR. Membranes as the energy source in the endergonic transformation of vitamin A to 11-cis-retinol. *Science* 1989; 244(4907):968-971.
- [20] Dryja TP. Gene-based approach to human gene-phenotype correlations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(22):12117-12121.
- [21] Dryja TP, Finn YT, Peng YW, McGee TL, Berson EL, Yau KW. Mutations in the gene encoding the alpha- subunit of the rod cGMP gated channel in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:10177-10181.

- [22] Dryja TP, Li T. Molecular genetics of retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet* 1995; 4:1739-1743.
- [23] Dryja TP, McGee TL, Reichel E, Hahn LB, Cowley GS, Yandell DW *et al.* A point mutation in the rhodopsin gene among patients in one form of retinitis pigmentosa. *Nature* 1990; 343:364-366.
- [24] Durlu YK, Tamai M. Transplantation of retinal pigment epithelium using viable cryopreserved cells. *Cell Transplant* 1997; 6(2):149-162.
- [25] Faktorovich EG, Steinberg RH, Yasumura D, Matthes MT, LaVail MM. Basic fibroblast growth factor and local injury protect photoreceptors from light damage in the rat. *J Neurosci* 1992; 12(9):3554-3567.
- [26] Futterman S, Saari JC, Blair S. Occurrence of a binding protein for 11-cis-retinal in retina. *J Biol Chem* 1977; 252(10):3267-3271.
- [27] Gal A, Apfelstedt-Sylla E, Janecke AR, Zrenner E. Rhodopsin mutations in inherited retinal dystrophys and dysfunction. Osborne NN, Chader GJ, editors. *Prog Retin Eye Res* [16], 51-79. 1997.
- [28] Glavac D, Dean M. Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. *Hum Mutat* 1993; 2(5):404-414.
- [29] Grüsser O-J, Grüsser-Cornehls U. Gesichtssinn und Okulomotorik. In: Schmidt RF, Thews G, eds. *Physiologie des Menschen*. 26 ed. Berlin: Springer. 1995.
- [30] Gu SM, Thompson DA, Srikumari CR, Lorenz B, Finckh U, Nicoletti A *et al.* Mutations in RPE65 cause autosomal recessive childhood-onset severe retinal dystrophy. *Nat Genet* 1997; 17(2):194-197.
- [31] Heckenlively JR, Rodriguez JA, Daiger SP. Autosomal dominant sectoral retinitis pigmentosa. Two families with transversion mutation in codon 23 of rhodopsin. *Arch Ophthalmol* 1991; 109(1):84-91.
- [32] Huang SH, Pittler SJ, Huang X, Oliveira L, Berson EL, Dryja TP. Autosomal recessive retinitis pigmentosa caused by mutations in the alpha subunit of rod cGMP phosphodiesterase. *Nat Genet* 1995; 11(4):468-471.
- [33] Intres R, Goldflam S, Cook JR, Crabb JW. Molecular cloning and structural analysis of the human gene encoding cellular retinaldehyde-binding protein. *J Biol Chem* 1994; 269(41):25411-25418.

- [34] Jaeger W, Klein D, Goebel HH, Krastel H. Hereditäre Erkrankungen der Netzhautperipherie. In: Hammerstein W, Lisch W, eds. *Die Bibliothek des Augenarztes: Ophthalmologische Genetik, Band 105*. Stuttgart: Enke. 1985.
- [35] Jones SE, Meerabux JM, Yeats DA, Neal MJ. Analysis of differentially expressed genes in retinitis pigmentosa retinas. Altered expression of clusterin mRNA. *FEBS Lett* 1992; 300(3):279-282.
- [36] Junqueira L, Carneiro J. Histologie. Schiebler T, Peiper U, Schneider F, editors. 2. 1986. Berlin, Heidelberg, New York, Springer- Verlag.
- [37] Jurkles B, Zrenner E, Wessing A. [Retinitis pigmentosa--clinical, genetic and pathophysiologic aspects]. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1997; 210(1):1-18.
- [38] Kajiwara K, Berson EL, Dryja TP. Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/ RDS and ROM 1 loci. *Science* 1994; 264:1604-1608.
- [39] Kimberling WJ, Möller C. Clinical and molecular genetics of Usher syndrome. *J Am Acad Audiol* 1995; 6(1):63-72.
- [40] Kornzweig AL. Bassen-Kornzweig syndrome. Present status. *J Med Genet* 1970; 7(3):271-276.
- [41] Krawczak M, Reiss J, Cooper DN. The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet* 1992; 90(1-2):41-54.
- [42] LaVail MM, Li L, Turner JE, Yasumura D. Retinal pigment epithelial cell transplantation in RCS rats; normal metabolism in rescued photoreceptors. *Exp Eye Res* 1992; 55:555-562.
- [43] Leydhecker W, Grehn F. Augenheilkunde. 25. 1993. Berlin, Heidelberg, New York, Springer- Verlag
- [44] Lippert H. *Anatomie*. 3 ed. München: Urban & Schwarzenberg. 1993.
- [45] Lolley RN, Rong H, Craft CM. Linkage of photoreceptor degeneration by apoptosis with inherited defect in phototransduction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35(2):358-362.
- [46] Löffler G. Funktionelle Biochemie. 1993. Berlin, Heidelberg, New York, Springer Verlag.

- [47] Maw MA, Kennedy B, Knight A, Bridges R, Roth KE, Mani EJ *et al.* Mutation of the gene encoding cellular retinaldehyde-binding protein in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nat Genet* 1997; 17(2):198-200.
- [48] McLaughlin ME, Sandberg MA, Berson EL, Dryja TP. Recessive mutations in the gene encoding the beta- subunit of phosphodiesterase in patients with retinitis pigmentosa. *Nat Genet* 1993; 4:130-134.
- [49] Meindl A, Dry K, Herrmann K, Manson F, Ciccodicola A, Edgar A *et al.* A gene (RPGR) with homology to the RCC1 guanine nucleotide exchange factor is mutated in X linked retinitis pigmentosa (RP3). *Nat Genet* 1996; 13:35-42.
- [50] Michaud J, Brody LC, Steel G, Fontaine G, Martin LS, Valle D *et al.* Strand-separating conformational polymorphism analysis: efficacy of detection of point mutations in the human ornithine delta-aminotransferase gene. *Genomics* 1992; 13(2):389-394.
- [51] Morimura H, Berson EL, Dryja TP. Recessive mutations in the RLBP1 gene encoding cellular retinaldehyde-binding protein in a form of retinitis punctata albescens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40(5):1000-1004.
- [52] Nicoletti A, Wong DJ, Kawase K, Gibson LH, Yang-Feng TL, Richards JE *et al.* Molecular characterization of the human gene encoding an abundant 61 kDa protein specific to the retinal pigment epithelium. *Hum Mol Genet* 1995; 4(4):641-649.
- [53] Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(8):2766-2770.
- [54] Refsum S. Heredopathia atactica polyneuritiformis. Phytanic acid storage disease. Refsum's disease: a biochemically well defined disease with a specific dietary treatment. *Arch Neurol* 1981; 38:605-606.

- [55] Rosenfeld PJ, Cowley GS, McGee TL, Sandberg MA, Berson EL, Dryja TP. A null mutation in the rhodopsin gene causes rod photoreceptor dysfunction and autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nat Genet* 1992; 1(3):209-213.
- [56] Saari JC, Bredberg DL, Noy N. Control of substrate flow at a branch in the visual cycle. *Biochemistry* 1994; 33(10):3106-3112.
- [57] Saari JC, Huang J, Possin DE, Fariss RN, Leonard J, Garwin GG *et al.* Cellular retinaldehyde-binding protein is expressed by oligodendrocytes in optic nerve and brain. *Glia* 1997; 21(3):259-268.
- [58] Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239(4839):487-491.
- [59] Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA *et al.* Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230(4732):1350-1354.
- [60] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74(12):5463-5467.
- [61] Shapiro MB, Senapathy P. RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res* 1987; 15(17):7155-7174.
- [62] Shastri BS. Review: Signal transduction in the retina and inherited retinopathies. *Cell Mol Life Sci* 1997; 53:419-429.
- [63] Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* 1993; 16(2):325-332.
- [64] Sparkes RS, Heinzmann C, Goldflam S, Kojis T, Saari JC, Mohandas T *et al.* Assignment of the gene (RLBP1) for cellular retinaldehyde-binding protein (CRALBP) to human chromosome 15q26 and mouse chromosome 7. *Genomics* 1992; 12(1):58-62.
- [65] Stuhmann M. Das klinische Spektrum von Fertilitätsstörungen durch Mutationen im CFTR-Gen. *Reproduktionsmedizin* 1998, 14:54-65

- [66] Travis GH, Groshan KR, Lloyd M, Bok D. Complete rescue of photoreceptor dysplasia and degeneration in transgenic retinal degeneration slow (rds) mice. *Neuron* 1992; 9(1):113-119.
- [67] Weil D, Blanchard S, Kaplan J, Guilford P, Gibson F, Walsh J *et al.* Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type 1B. *Nature* 1995; 374(6517):60-61.
- [68] White MB, Carvalho M, Derse D, O'Brien SJ, Dean M. Detecting single base substitutions as heteroduplex polymorphisms. *Genomics* 1992; 12(2):301-306.
- [69] Wright A. A searchlight through the fog. *Nat Genet* 1997; 17:132-134.
- [70] www.sph.uth.tmc.edu/retnet/home.htm
- [71] Zhang X, Bok D. Transplantation of retinal pigment epithelial cells and immune response in the subretinal space. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39(6):1021-1027.

7. Anhang

7.1 Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Institutes für Humangenetik des Universitätsklinikums Eppendorf danken. Ständig hatten sie ein offenes Ohr für mich und jeder stand mir mit Rat und Tat zur Seite. Durch sie ist dieses Institut ein El Dorado für Doktoranden!

Mein ganz besonderer Dank und meine Anerkennung gelten meinem Betreuer Herrn Dr. Su Min Gu, ohne dessen Engagement und Hilfe ich den experimentellen Teil der Arbeit nie hätte bewerkstelligen können. Egal wie verzwickelt die Situation war, er wußte immer einen Ausweg.

Herrn Prof. Dr. Gal danke ich für die Möglichkeit, an seinem Institut zu promovieren, und für die eingehende Beratung bei der Niederschrift der Arbeit.

Herrn Kurosh Simaifar und Herrn Hilko Gerdes danke ich für die praktische Hilfe bei dem Layout der Dissertation.

Herr Dirk Bremser war in den zahllosen gemeinsamen Laborstunden ein Bruder im Geiste und ist seitdem ein guter Freund.

Meiner Familie danke ich nicht nur, sondern Ihr ist diese Arbeit gewidmet!

Meinem Bruder Peer möge sie zusätzlich als Inspiration gelten.

7.2 Lebenslauf

Jens Carsten Ritter	geb. am 10.11.1971
Heussweg 88	in Hilden
20255 Hamburg	ledig

Eltern: Dr. Ernst-Hasso Ritter und Edith Helene Ritter, geb. Silbermann

Beruflicher Werdegang

seit 08/00 Arzt im Praktikum auf der Intensivstation der Abteilung für
Thorax- Herz- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums
Eppendorf

Praktisches Jahr

01/00-04/00 Chirurgie am Regionalspital Lachen, Schweiz
08/99-12/99 Innere Medizin an der University of the West Indies, W.I.
04/99-08/99 Gynäkologie am Albertinen Krankenhaus, Hamburg

Bildungsweg

10/93-04/00 Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
06/00 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08/98 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/96 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1996 Stipendium des Boeringer Ingelheim Fonds, Stuttgart

82-92 Besuch des Schloß-Gymnasiums-Benrath, Düsseldorf
89 Besuch der Allentown High School, USA
06/92 Abitur am Schloß-Gymnasium-Benrath
10/89 High School Graduation mit Hochschulzulassung in den USA

78-82 Besuch der Gemeinschaftsgrundschule Urdenbach,
Düsseldorf

7.3 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, im Jahre 2001

Jens Carsten Ritter