

Aus dem
Institut für Humangenetik
Direktor Prof. Dr. med. A. Gal

**Mutationen im Rhodopsin- und Peripherin-Gen
bei Patienten mit erblicher Netzhautdystrophie
unter Bezug zur Elektrophysiologie und Patho-
physiologie**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Sebastian Schulz-Jürgensen

aus Hamburg

Hamburg, 2003

Angenommen von dem Fachbereich Medizin

der Universität Hamburg am: 17. 05. 2004

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs

Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuß, die/der Vorsitzende/r: Prof. Dr. A. Gaj

Prüfungsausschuß: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. O. Schaub

Prüfungsausschuß: 3. Gutachter/in: Priv. Doz. Dr. U. Finckh

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1	Retinitis pigmentosa (RP)	5
1.1.1	Grundlagen	5
1.1.2	Klinik	5
1.1.3	Untersuchungsmethoden	6
1.1.3.1	Fundoskopie	6
1.1.3.2	Gesichtsfeldperimetrie	7
1.1.3.3	Elektroretinogramm (ERG)	7
1.1.4	Klinische Klassifikation	9
1.1.5	Genetik	10
1.1.5.1	Erbgänge	10
1.1.5.2	Suche nach Gendefekten	11
1.1.5.3	Kandidatengene	11
1.1.5.4	Gefundene Gene und Genloci	12
1.1.5.5	Allelische und Nicht-allelische Heterogenität	12
1.1.5.6	Genetische Klassifikationsansätze	13
1.1.6	Sehvorgang: Physiologie und allgemeine Pathophysiologie	14
1.1.6.1	Physiologie	14
1.1.6.2	Genfunktion-bezogene Pathophysiologie	17
1.1.6.3	Pathophysiologische Ansätze aus dem ERG	17
1.1.6.4	Pathophysiologische Ansätze aus der Histologie und Pathologie	22
1.1.6.5	Extragenetische Kofaktoren in der Pathophysiologie	24
1.2	Rhodopsin	25
1.2.1	Kartierung, Isolierung und Sequenzierung des Gens	25
1.2.2	Struktur und Physiologie	25
1.2.3	Ansätze zur Pathophysiologie	28
1.2.4	Charakteristika der Rhodopsin-Mutationen	31
1.2.5	Klassifikation der Rhodopsin-Mutationen	32
1.2.6	Aktuell bekannte Mutationen	34

1.3	Peripherin/rds	35
1.3.1	Kartierung, Isolierung und Sequenzierung des Gens	35
1.3.2	Struktur und Physiologie	35
1.3.3	Ansätze zur Pathophysiologie	39
1.3.4	Charakteristika der Peripherin-Mutationen	41
1.3.5	Klassifikation der Peripherin-Mutationen	42
1.3.6	Aktuell bekannte Mutationen	43
1.4	Therapeutische Ansätze	44
2.	Material und Methoden	
2.1	Materialien	48
2.1.1	Chemikalien	48
2.1.2	Nucleotide	49
2.1.3	Enzyme	49
2.1.4	DNA-Molekulargewichts-Marker	50
2.1.5	Geräte	50
2.1.6	Sonstige Materialien	51
2.2	Patientenkollektiv	51
2.3	DNA-Isolierung	51
2.4	Polymerase Ketten-Reaktion (PCR)	52
2.4.1	Planung der PCR-SSCP-Untersuchung	52
2.4.1.1	Rhodopsin	52
2.4.1.2	Peripherin	53
2.4.2	Prinzip der PCR	53
2.4.3	Materialien	54
2.4.3.1	Primer	54
2.4.3.2	Desoxynukleotide (dNTP)	55
2.4.3.3	Taq-Polymerase	55
2.4.3.4	Cetus-Puffer	56
2.4.4	Durchführung der PCR	56
2.4.4.1	PCR-Ansatz	56
2.4.4.2	PCR-Programm	56
2.4.5	Kontrolle der PCR-Amplifikation auf Agarose-Gel	58

2.4.5.1	Material	58
2.4.5.2	Herstellung des 1% Agarose-Gels	58
2.4.5.3	Durchführung der Elektrophorese	59
2.5	Single Strand Conformation Polymorphism-Analyse (SSCP)	59
2.5.1	Prinzip	59
2.5.2	Durchführung der SSCP-Analyse	60
2.5.2.1	Material	60
2.5.2.2	Herstellung der Gele	61
2.5.2.3	Nichtdenaturierende Gelelektrophorese	62
2.5.3	Silberfärbung	63
2.5.3.1	Prinzip	63
2.5.3.2	Färbungsprotokoll	63
2.5.3.3	Praktische Durchführung der Silberfärbung	64
2.6	Sequenzierung	64
2.6.1	Prinzip der manuellen Sequenzierung	64
2.6.1.1	Material	65
2.6.1.2	Einzelstrang-PCR	65
2.6.1.3	Aufreinigung der Einzelstrang-PCR-Produkte	66
2.6.1.4	Sequenziervorgang	66
2.6.1.5	Auswertung auf Sequenziergel durch Autoradiographie	67
2.6.2	Prinzip der automatischen Sequenzierung	68
2.6.2.1	Material	68
2.6.2.2	Vorbereitung/Aufreinigung des PCR-Produktes	69
2.6.2.3	Durchführung der Sequenzierung	69
2.6.2.4	Aufreinigung des Cycle Sequencing-Produktes	69
2.6.2.5	Auswertung der automatischen Sequenzierung	70
2.7	Restriktionsverdau	70
2.7.1	Prinzip	70
2.7.2	Durchführung	71

3. Ergebnisse

3.1	Gefundene Veränderungen im Rhodopsin-Gen	72
3.1.1	Rhodopsin-Mutationen	72
3.1.1.1	Thr17Met	72
3.1.1.2	Cys187Tyr	76
3.1.2	Rhodopsin-Polymorphismen	78
3.2	Gefundene Veränderungen im Peripherin-Gen	79
3.2.1	Peripherin-Mutationen	79
3.2.1.1	Pro216Ser	79
3.2.1.2	Pro216Leu	82
3.2.1.3	Ser218Pro	84
3.2.2	Peripherin-Polymorphismen	88

4. Diskussion

4.1	Abschätzung der Sensitivität des Screenings	89
4.2	Genotyp-Phänotyp-Relation	91
4.2.1	Rhodopsin	91
4.2.1.1	Rho Thr17Met	91
4.2.1.2	Rho Cys187Tyr	92
4.2.2	Peripherin	95
4.2.2.1	Peri Pro216Ser	95
4.2.2.2	Peri Pro216Leu	96
4.2.2.3	Peri Ser218Pro	96
4.3	Pathophysiologische Überlegungen	97
4.3.1	Rhodopsin	97
4.3.2	Peripherin	100
4.4	Zusammenhang zwischen ERG und Schädigungsmuster	103

5. Zusammenfassung	108
---------------------------	------------

6. Literaturverzeichnis	110
--------------------------------	------------

7. Anhang	
------------------	--

Danksagung

Lebenslauf

Erklärung

1. Einleitung

1.1 Retinitis pigmentosa

1.1.1 Grundlagen

Retinitis pigmentosa (RP) ist die Bezeichnung für eine Gruppe genetisch heterogener, aber klinisch in Grundzügen ähnlicher Netzhauterkrankungen. Gemeinsames Merkmal ist der (zunächst) vorwiegende Befall der Stäbchen, so daß man auch von einer Stäbchenerkrankung sprechen kann. Die Bezeichnung „Retinitis“ ist dabei nicht korrekt, da es sich nicht um eine entzündliche Erkrankung handelt, hat sich aber international durchgesetzt [202].

Erstmalig wurde die Erkrankung 1855 von F.C. Donders als Gruppe erblicher Störungen mit progressiver Netzhautdegeneration beschrieben [40]. Ebenfalls im vorletzten Jahrhundert wurde das Vorkommen von (autosomal-dominant erblicher) Retinitis pigmentosa in mehreren Generationen beobachtet, wie z.B. von Ayres im Jahre 1886 [10].

Die Angaben zur Inzidenz liegen zwischen 1: 3.000 und 1: 5.000. Weltweit sind damit etwa 1,5 Millionen Menschen betroffen [18,47,89,202].

1.1.2 Klinik

Die gemeinsamen Symptome der Erkrankung sind eine Nachtblindheit mit bilateralem symmetrischem und fortschreitendem Gesichtsfeldverlust und ein zunehmend anormal werdendes ERG als Ausdruck eines progressiven Verlustes der Photorezeptorfunktion [202].

Die Krankheit beginnt in der Regel in der Jugend mit Adaptationsschwierigkeiten, Nachtblindheit und Ausfällen in der mittleren Peripherie des Gesichtsfeldes. Im Verlauf kommt es zu einer Farbsehstörung (Blau-Blindheit), einem Verlust des peripheren Gesichtsfeldes und teilweise auch zu einem Verlust zentraler Gesichtsfeldareale [18].

Retinitis pigmentosa zeigt häufig einen zweistufigen Verlauf. Die erste Stufe ist geprägt von einer sehr langsamen Progression. In der zweiten Stufe kommt es zu einem exponentiellen Verlust der Gesichtsfeldfläche, der annähernd einer e-Funktion entspricht, mit einem jährlichen Verlust von 20% [120,202].

Der anfänglich schleichende Verlauf der Erkrankung führt dazu, daß viele Patienten eine Einschränkung ihres Sehvermögens erst bei Beteiligung auch zentraler Gesichtsfeldareale bemerken. Häufig behalten die Patienten auch nach gesetzlich anerkannter Blindheit einen brauchbaren Sehrest [202]. In einer großen Studie an 500 Betroffenen gab ein Viertel der Befragten an, keine Gesichtsfeldausfälle zu bemerken, nachweisbar waren sie jedoch bei allen Patienten. Die übrigen stellten Gesichtsfeldausfälle mit durchschnittlich 24 Jahren fest. 1/7 der Betroffenen gaben an, nicht unter Nachtsichtproblemen zu leiden, 1/5 der Patienten berichteten sogar über eine bessere Sicht bei Dämmerung. Bei 40% der

Befragten traten akute Sehverluste auf, meist ausgelöst durch Streß, Krankheit oder einer Kombination aus beidem. Sehr selten (<2%) fand sich eine Netzhautablösung, was zumindest bei akuten Sehverlusten eine augenärztliche Untersuchung angezeigt erscheinen läßt. Außerdem klagte 1/3 der Befragten über Lichtblitze, dies jedoch meist in fortgeschrittenen Krankheitsstadien. An Begleiterkrankungen fanden sich in der Hälfte der Fälle regelmäßige Kopfschmerzen und bei ca. 40% systemische Krankheiten wie Taubheit (häufig angeboren im Rahmen eines Usher-Syndroms), Arthritiden, neurologische Defizite, seltener Knochenprobleme, Polydaktylie oder Krampfanfälle. Die Häufung von Kopfschmerzen läßt bei einer Untergruppe eine Migräne-Variante vermuten.

Eine große Zahl von Patienten berichtet über tägliche Schwankungen ihres Sehvermögens, teilweise auch über einen Verlust an Sehvermögen vom frühen Morgen über den Vormittag. Dies deckt sich mit einer großen Varianz der gemessenen Gesichtsfeldgröße bei konsekutiven Augenarztbesuchen [84].

Im Vergleich zur Normalbevölkerung fällt eine höhere Inzidenz von Refraktionsanomalien, besonders Myopie, auf. Dies ließe sich durch eine fehlende Rückkopplung in der Wachstumsphase erklären, da für eine regelrechte Refraktionsentwicklung eine scharfe Objektabbildung auf der Retina nötig ist. Andererseits erklärt es ebensowenig das Auftreten von Refraktionsanomalien ab dem höherem Lebensalter wie die Hyperopie bei einigen Formen der Retinitis pigmentosa [202].

Da es jedoch noch immer keine solide Basis für Prognosen über die Entwicklung des Sehvermögens gibt, kann der Kliniker nur eine relativ schlechte und gleichzeitig vage Prognose abgeben und dem Patienten durch die Verordnung vergrößernder Sehhilfen oder von Kantenfiltergläsern für lichtempfindliche Patienten sowie die Therapie der Sekundärerkrankungen helfen [84,202].

1.1.3 Untersuchungsmethoden

1.1.3.1 Fundoskopie

Der Name der Erkrankung leitet sich von dem klassischen fundoskopischen Befund bei Patienten mit RP ab: Veränderungen im retinalen Pigmentepithel führen erst zu einer Depigmentierung, anschliessend zu einer Hyperpigmentierung mit Bildung von sog. Knochenkörperchen, die eine intraretinale Pigmentmigration darstellen [202]. Das Pigment findet sich vor allem kreisförmig in der mittleren Netzhautperipherie, wo sich die meisten Stäbchen befinden [18,152]. Außerdem gelten als charakteristische diagnostische Zeichen Gefäßverengungen, beidseits symmetrische wachsgelbe Papillen, Makulaveränderungen, Reflexverbreiterung, Glaskörperkondensationen, speziell zystoide Veränderungen, Makulaödem in 33% der Fälle und in 65% der Fälle eine Katarakt [202]. Die wichtigsten Differentialdiagnosen des fundoskopischen Bildes sind Lues, Röteln, Medikamenten-

einnahme, Fundus albipunctatus cum nyctalopia, dominante Drusen und Atrophia gyrata [202].

1.1.3.2 Gesichtsfeldperimetrie

Eine weitere wichtige Untersuchungsmethode ist die Gesichtsfeldperimetrie, die durch verschiedene Farbfilter eine Differenzierung zwischen Stäbchen- und Zapfenfunktion ermöglicht. Dabei ist grünblaues Licht (Wellenlänge 500 nm) spezifisch für Stäbchen, rotes (656 nm) für Zapfen [202].

Der Verlauf der Erkrankung ist gekennzeichnet durch ein anfängliches Ringskotom in der mittleren Peripherie, auf das eine zunehmende Gesichtsfeldeinschränkung von peripher her folgt [159]. Insgesamt fällt auf, daß die obere Gesichtsfeldhälfte stärker befallen ist als die untere [120]. Der Gesichtsfeldverlust beträgt in der zweiten Verlaufsstufe durchschnittlich 1,11 log-Stufen pro Jahr [18]. Damit liegt die Zeitspanne für einen 50% Gesichtsfeldverlust („Halbwertszeit“) bei ca. 7 Jahren [77]. Wenn ein Makulaödem und eine Katarakt ausgeschlossen sind, ergibt sich eine gute Korrelation zwischen Dauer der Erkrankung und Ausmaß der Gesichtsfeldeinschränkung. Das Auftreten eines Makulaödems führt zu einem zusätzlichen Verlust von 6,23 log-Stufen.

Es werden ca. 10° zentrales Gesichtsfeld benötigt, um unabhängig mobil zu sein; dieses Kriterium erfüllen 93% der Betroffenen unter 20 Jahren, 89% zwischen 20 und 40 Jahren und 60% über 40 Jahren [120]. Die Mehrheit der Betroffenen ist im Alter von 60 Jahren gesetzlich anerkannt blind, wobei das Gesichtsfeld auf weniger als 20° eingeschränkt ist [18].

1.1.3.3 Elektroretinogramm (ERG)

Mit Hilfe der oben beschriebenen Untersuchungsmethoden allein war es bis in die Mitte der sechziger Jahre nicht möglich, frühe Stadien der Retinitis pigmentosa von selbstbegrenzenden oder konstanten Netzhauterkrankungen zu unterscheiden. Dies änderte sich mit der Einführung der Elektroretinographie (ERG) [17,18]. Dabei werden mit Lichtblitzen evozierte Potenziale über eine kontaktlinsenförmige Elektrode gegenüber einer indifferenten Elektrode als Netzhautpotentiale abgeleitet. Die normale Antwort auf einen Lichtblitz besteht dabei aus einer initialen negativen a-Welle, die dem Potential in den Photorezeptoren direkt entspricht, gefolgt von einer positiven b-Welle, die einem Signal in den Bipolaren und Ganglienzellen entspricht (siehe Abbildung 1).

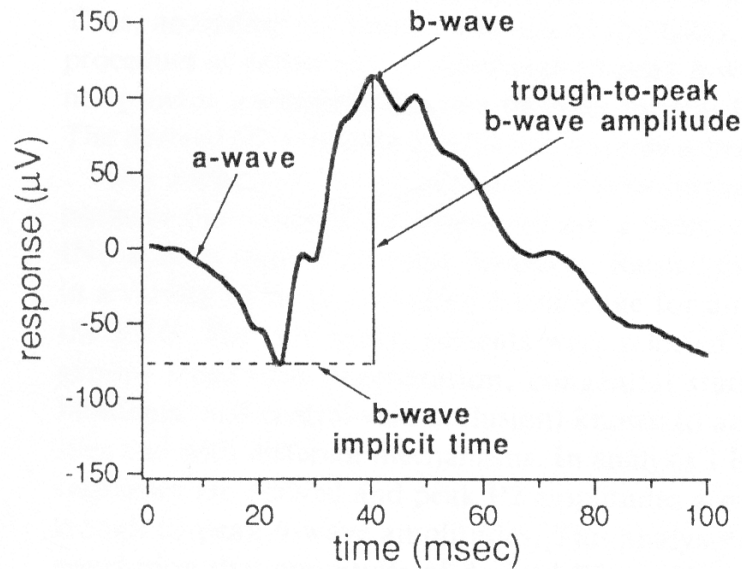


Abb. 1: a- und b-Welle der ERG-Untersuchung, dargestellt auch die wichtigsten Meßwerte implizite b-Wellen Latenz und 'trough-to-peak'-b-Wellen-Amplitude [86]

Untersucht werden hierbei vorwiegend die Amplituden und Latenzzeiten der b-Wellen. Die Normwerte betragen für die b-Wellen-Latenz der Stäbchen <108 ms, für die der Zapfen <32 ms. Für die Amplituden gibt es jeweils von den Testbedingungen abhängige Normwerte, beispielsweise >100 μV bei blauen Streifen oder >350 μV bei weißen Streifen als Stimuli [18,120], die teilweise auch altersbezogen mit höheren Grenzwerten angegeben werden [140]. Durch die kürzeren Latenzzeiten für Zapfen lassen sich im ERG die Ergebnisse für Stäbchen und Zapfen durch Flackerlicht mit 30 Hz differenzieren, da nur die Zapfen in der Lage sind, hierbei die Einzelimpulse aufzulösen [47]. Um selektiv die Stäbchen zu untersuchen, werden blaue Lichtreize oder ein abgeschwächtes weißes Lichtsignal bei Dunkeladaptation eingesetzt [18,140].

Die Untersuchungsergebnisse hängen davon ab, ob die Augen zu Beginn der Untersuchung hell- oder dunkeladaptiert waren. Die Empfindlichkeit der Zapfen ist nach längerer Dunkeladaptation herabgesetzt und wird durch Helladaptation besser. Der Potentialzuwachs ist um so größer, je geringer das Ausgangspotential war [202]. Bei Stimulation dunkeladaptierter Augen mit einem weißen Lichtblitz, der normalerweise eine gemischte Stäbchen- und Zapfenantwort hervorruft, kommt es bei RP-Patienten zu dem typischen Bild einer reinen Zapfenantwort [159].

Bei Patienten mit Retinitis pigmentosa ist unabhängig vom Vererbungsmodus die Antwort der Zapfen auf blaues Licht nicht nachweisbar oder zumindest deutlich reduziert in der Amplitude, die b-Welle ist verzögert. Diese Veränderungen treten teilweise schon Jahre vor dem Auftreten erster subjektiver Symptome oder ophthalmologisch sichtbarer Veränderungen auf. Die so nachweisbaren Veränderungen korrelieren jedoch nur sehr grob mit den Sehverlusten. Für eine differenziertere Auswertung wird daher eine

computergestützte Auswertung von Mittelwerten angewandt, da Amplituden unter 10 μV , die noch mit einem Restsehvermögen einhergehen, als Einzelimpuls nicht mehr nachweisbar sind. So lassen sich detaillierte Untersuchungen bis weit unter 1 μV durchführen. Bei den meisten Instanzen werden Patienten mit ERG-Antworten unter 0,05 μV als blind anerkannt [18].

Eine Longitudinalstudie über 3 Jahre zeigte bei einer nicht signifikant veränderten Sehschärfe und einer Verkleinerung des Gesichtsfelddurchmessers um 4,6% eine Reduktion der fovealen ERG-Antworten um 5,2% und eine Verringerung der Gesamt-ERG-Amplituden um 16-18,5%, je nach Lichtimpulsfrequenz. Dies spricht in erster Linie für periphere Verluste an ERG-Sehleistung. Das intraretinale Pigment nahm im Beobachtungszeitraum um 54% zu. Damit erscheint das ERG als sensitivere Untersuchungsmethode zur Verlaufskontrolle, da es deutlich besser mit dem Sehvermögen korreliert und die Veränderungen des Augenhintergrundes nicht proportional dazu sind [18]. Eine direkte Korrelation konnte für die Schwellenwerte in Gesichtsfeldperimetrie und ERG etabliert werden [25].

1.1.4 Klinische Klassifikation

Von Massof und Finkelstein stammt eine Klassifikation der autosomal dominanten RP in zwei Typen, deren erster sich durch einen frühen Beginn der Nachtblindheit im Kindesalter, einen frühen diffusen Verlust an Stäbchensensitivität in der Gesichtsfeldperimetrie mit einem erst später einsetzenden Verlust an Zapfensensitivität auszeichnet. Der zweite Typ zeigt demgegenüber einen regionalen Verlust der Sensitivitäten beider Rezeptorgruppen und einen späteren Beginn der Nachtblindheit [123].

Durchgesetzt hat sich eine Klassifikation nach Lynness et al. [120], die ebenfalls auf dem Verhältnis von Stäbchen- und Zapfenfunktion beruht und sich mit der vorhergehenden von Massof und Finkelstein weitgehend in Übereinstimmung bringen läßt. Dabei wird die Erkrankung in zwei große Typen unterteilt. Typ 1, oder D-Typ (diffuser Typ), ist beschrieben als ein früher, diffuser Verlust der Stäbchenempfindlichkeit mit länger erhaltener Zapfenfunktion und einer konzentrischen Gesichtsfeldeinengung. Typ 2, oder R-Typ (regionaler Typ), ist dagegen gekennzeichnet durch einen regionalen Verlust der Stäbchen- und Zapfenfunktion, einen späteren Beginn der Nachtblindheit und einen nur gering progressiven Verlust der Gesichtsfeldperipherie.

Kriterien für den D-Typ sind eine Erhöhung der Sensitivitätsgrenzen für grünes Licht um 1,5 log-Stufen in allen Netzhautarealen sowie das Vorhandensein mindestens eines Bereiches, in dem die Erhöhung der Sensitivitätsschwelle für rotes Licht weniger als eine log-Stufe beträgt und wo das Verhältnis der Sensitivitätsgrenzen von grünem zu rotem Licht größer als 1,5 ist.

Der R-Typ ist demgegenüber definiert durch die Erhöhung der Sensitivitätsgrenze für grünes und rotes Licht um mehr als 0,5 log-Stufen in mindestens einem Netzhautareal sowie die Existenz mindestens eines Netzhautareals, in dem die Sensitivitätsgrenze um weniger als 1 log-Stufe für rotes und grünes Licht erhöht ist. Die Differenzierung erfolgt klassisch mit der Farbperimetrie. In den ERG-Untersuchungen zeigen sich etwa gleiche Ergebnisse für beide Typen bei der Untersuchung mit für Zapfen spezifischen roten Lichtimpulsen, entsprechend den Gesichtsfeldarealen mit nur geringgradig gestörter Zapfenfunktion bei beiden Typen. Deutlich unterschiedliche Ergebnisse ergeben sich hingegen bei der Stimulation mit schwachen blauen Lichtreizen, die für die Zapfen unter-schwellig sind. Die Patienten mit D-Typ-RP weisen hier nur minimale Antworten auf, die auch durch eine leichte Stimulation der Zapfen zu erklären sein können. Die Patienten der anderen Gruppe zeigen dagegen normale oder nur leicht pathologische ERG-Befunde, was durch Areale mit verbliebener Stäbchenfunktion zu erklären ist [120].

Dem diffusen Typ (Typ 1) sind ca. 22% der adRP-Patienten zuzuordnen, die übrigen 78% dem regionalen Typ (Typ 2) [94]. Der Beginn der Nachtblindheit liegt bei Typ 1-Patienten normalerweise in den ersten zwei Lebensdekaden, beim Typ 2 gibt es insgesamt eine größere Streuung, wobei der Beginn im Mittel nach dem 18. Lebensjahr liegt, was auch als Kriterium zur Differenzierung herangezogen werden kann [63]. Insgesamt hat der Typ 2 die bessere Prognose, zu bedenken ist jedoch eine große Streuung in dieser Gruppe [63].

Die bei autosomal dominanten Erbgängen mögliche Einteilung nach der Stäbchenfunktion ist bei X-chromosomal vererbter Retinitis pigmentosa nicht möglich, da die Befunde innerhalb der Familien nicht konstant sind [84].

Die gelegentlich verwandte Bezeichnung sektorielle Retinitis pigmentosa wird von verschiedenen Autoren unterschiedlich definiert. In jedem Fall handelt es sich um einen Befall nur eines oder zweier Quadranten der Retina, es bestehen jedoch zwischen den Autoren Unterschiede bezüglich des Einschlusses einer Progressivität und der Kriterien für die nicht-befallenen Areale [63].

1.1.5 Genetik

1.1.5.1 Erbgänge

Die Vererbung der Retinitis pigmentosa erfolgt über alle bekannten Vererbungsmodi. Dabei treten bei 19-25% autosomal dominante, bei ca. 20% autosomal rezessive und bei 8% X-chromosomal rezessive Vererbung auf, in 47% handelt es sich um Simplex-Fälle, bei denen der Erbgang wegen des Einzelfalles innerhalb einer Familie nicht festgestellt werden kann [18,202]. In den meisten Fällen handelt es sich hier vermutlich um autosomal-rezessiv erbliche oder, seltener, X-chromosomal erbliche Formen. Daneben wurden in

Einzelfällen X-chromosomale Erbgänge mit vollständiger Penetranz auch bei Frauen, sowie mitochondriale Erbgänge beschrieben [42,51].

Retinitis pigmentosa ist darüber hinaus die erste genetische Erkrankung, für die eine digenische Vererbung bewiesen werden konnte. Dabei müssen für eine Erkrankung zwei voneinander unabhängige Gene je eine rezessive Mutation aufweisen, damit es zur Erkrankung kommt. Die Stammbäume zeigen die Charakteristika verschiedener Erbgänge [42].

1.1.5.2 Suche nach Gendefekten

Für die Suche nach Gendefekten stehen prinzipiell zwei Methoden zur Verfügung. Die erste geht von der Untersuchung von Kandidatengenen aus. Auf diese Weise wurde beispielsweise das Gen Peripherin/rds, dessen Mutationen für eine Netzhautdegeneration bei der Maus verantwortlich sind, identifiziert.

Die zweite Methode besteht in Kopplungsanalysen. Dabei wird innerhalb von Familien mit einem vererbten Merkmal (z.B. RP-Phänotyp) untersucht, ob das Merkmal mit einem oder mehreren in der Lokalisation bekannten Markern (z.B. Polymorphismen) gemeinsam vererbt wird (kosegregiert). Das Verhältnis der Wahrscheinlichkeit einer Kopplung zu der einer Nichtkopplung wird logarithmisch ausgedrückt und ab einem bestimmten logarithmischen Index (LOD-Score) für signifikant angesehen. Auf der Grundlage der Annahme, daß Rekombinationen statistisch gleichmäßig über das Genom verteilt auftreten, läßt sich anhand der auftretenden Rekombinationshäufigkeit der Abstand zwischen Marker und Genort abschätzen [146].

Das Problem hierbei ist, daß die Eingrenzung häufig nur ungenau möglich ist, da in vielen Fällen nur jeweils eine Familie verfügbar ist. Häufig angewendet wird daher die Kombination aus Kopplungsanalysen und anschließender Prüfung der dort angesiedelten Kandidatengene [42].

1.1.5.3 Kandidatengene

Als Kandidatengene für Retinitis pigmentosa kommen alle Gene in Frage, die für am Sehvorgang beteiligte Proteine sowie in der Netzhaut angesiedelte Strukturproteine kodieren. Dies sind z.B. die Strukturproteine Peripherin (6p21) und rod outer segment protein 1 (ROM1; 11q12), die Funktionsproteine Rhodopsin (3q22), Transducin (3p), cGMP-Phosphodiesterase (PDE; 4p16 und 5q33), cGMP-aktivierter Ionenkanal (4p12, Xq27, 2q11, 16q13 und 8q21), Recoverin (17p13), Retinol-bindendes Protein (10q23), Rhodopsin-Kinase (13q34) und Arrestin/S-Antigen (2q37) [19,89].

Als tierische Homologe ist besonders das retinal degeneration slow (rds)-Gen der Maus zu nennen, das zur Entdeckung des Peripherin-Gens als Verursacher für RP beim

Menschen geführt hat. Daneben wurden besonders Gene von Kühen, Hunden und Drosophila-Arten untersucht.

1.1.5.4 Gefundene Gene und Genloci

Die für Retinitis pigmentosa in Kopplungsanalysen gefundenen Genloci wurden meist chronologisch mit RP1, RP2, RP3, ... benannt. Beschriebene Genloci im Zusammenhang mit RP sind:

1p21.2 (RP18, dom., HPRP3) [200,RetNet], 1p22.1 (RP19, rez., ABCA4) [194,RetNet], 1p31.2 (RP20, rez., RPE65) [194,RetNet], 1q31.3 (RP12, rez., CRB1) [194,RetNet], 1q41 (rez., USH2A) [194,RetNet], 2p11-p16 (RP28, rez.) [RetNet], 2q13 (rez., MERTK) [194,RetNet], 2q31-q33 (RP26, rez.) [RetNet], 3q22.1 (RP4, dom., rez., Rhodopsin) [50,141,RetNet], 4p16.3 (rez., PDE6B) [45,65,RetNet], 4p12 (rez., CNGA1) [45,RetNet], 4q32-q34 (RP29, rez.) [RetNet], 4q32.1 (rez., LRAT) [RetNet], 5q33.1 (rez., PDE6A) [45,RetNet], 6p21.2 (RP7, dom., digen., Peripherin/rds) [51,RetNet], 6p21.31 (RP14, rez., TULP1) [RetNet], 6cen-q15 (RP25, rez.) [RetNet], 7p13-p15.1 (RP9, dom., PIM1K) [92,RetNet], 7q32.1 (RP10, dom., IMPDH1) [45,96,Retnet], 8q12.1 (RP1, dom) [RetNet], 8q12.3 (rez., TTPA) [RetNet], 10q23.1 (rez., RGR) [194,RetNet], 11q12.3 (digen., ROM1) [45,RetNet], 14q11.2 (RP27, dom., NRL) [194], 15q23 (rez., NR2E3) [194,OMIM], 15q26.1 (rez., RLBP1) [194,RetNet], 16p12.1-p12.3 (rez., RP22) [RetNet], 16q13 (rez., CNGB1) [RetNet], 17p13.3 (RP13, dom., PRPF8) [74,RetNet], 17q22 (RP17, dom.) [RetNet], 17q25 (dom., FSCN2) [RetNet], 19q13.3 (dom., CRX) [194,RetNet], 19q13.42 (RP11, dom. PRPF31) [4,194,RetNet], Xp11.23 (RP2) [RetNet], Xp21.1 (RP3, RPGR) [OMIM], Xp21.2-p21.3 (RP 6) [51], Xq21.1 (PGK1) [RetNet], Xq26-q27 (RP24) [RetNet].

1.1.5.5 Allelische und nicht-allelische Heterogenität

Da die identifizierten Gene bislang nur die Erklärung für 20 - 25% der Fälle von Retinitis pigmentosa liefern und darüber hinaus noch keiner der anderen gefundenen Genloci einen Hotspot für Kopplung zeigt, sogar im Gegenteil häufig nur eine einzige Familie an einer bestimmten Stelle eine Kopplung darstellt, wird davon ausgegangen, daß es wahrscheinlich zwischen 50 und 100 Genloci für Retinitis pigmentosa gibt [42]. Untersuchungen an Fruchtfliegen mit Photorezeptordegenerationen oder -fehlfunktionen ergaben mindestens 70 verschiedene Genloci, was ebenfalls für eine große Anzahl beim Menschen spricht [nach 42]. Dieses Phänomen, daß es zu jedem Vererbungsmodus verschiedene Genloci gibt, wird nicht-allelische Heterogenität genannt [42].

Darüber hinaus gibt es bei Retinitis pigmentosa eine sehr ausgeprägte allelische Heterogenität. Darunter versteht man das Vorkommen verschiedener Mutationen in demselben Gen [42]. So sind zum Beispiel über 90 Rhodopsin-Mutationen und über 65 Peripherin-Mutationen beschrieben worden [63,107,112].

Durch die genetischen Untersuchungen wurde deutlich, daß auch bei ähnlichen klinischen Befunden eine sehr ausgeprägte genetische Heterogenität existieren kann. Somit erscheint eine Klassifikation nach genetischen Kriterien deutlich sinnvoller.

1.1.5.6 Genetische Klassifikationsansätze

Von vielen Autoren wird eine genetische Klassifikation der Retinitis pigmentosa gefordert, da sie sich davon Ansätze zum Verständnis und später auch zur Therapie versprechen.

Eine genetische Klassifikation beginnt grob mit der Einteilung in die verschiedenen Erbgänge, unterscheidet dann weiter in die dabei betroffenen Gene bzw. gefundenen Genloci und differenziert, wo möglich, die konkreten Mutationen in den einzelnen Genen.

Auch hierbei gilt die Einschränkung der großen klinischen Heterogenität selbst bei gleichem Gen und sogar gleicher Mutation [94]. Dies gilt als Hinweis auf nichtgenetische Einflußfaktoren, die zumindest verlaufsmodulierend wirken [18,63].

Erbgang-Phänotyp-Korrelation

Die Bedeutung des Erbgangs für die Klinik der Retinitis pigmentosa wird an verschiedenen klinischen Parametern deutlich: Das kritische Alter für den Übergang der ersten Krankheitsphase mit langsamer Progredienz in die zweite mit deutlich beschleunigtem Verlauf liegt bei den dominanten Erbgängen bei 32 Jahren, bei X-chromosomaler Vererbung bei 20 Jahren [202]. Bei autosomal rezessiver Vererbung liegt es dazwischen, die Streuung ist hier jedoch so groß, daß sich diese Angabe weniger aussagekräftig erscheint [63].

Auch liegt das Erblindungsalter für Männer mit X-chromosomaler Retinitis pigmentosa mit durchschnittlich 30-45 Jahren deutlich niedriger als für Männer mit autosomal rezessiver Retinitis pigmentosa, wo eine gesetzlich anerkannte Blindheit erst im Alter von 45-60 Jahren eintritt [18]. Konduktorinnen X-chromosomaler Vererbung zeigen mit zunehmendem Lebensalter sowohl subklinische Abnahmen der ERG-Antworten als auch fundoskopische Veränderungen. Häufig sind es irreguläre, sektorielle Funduspigmentationen, in 60% ein taporetinaler Reflex und teilweise im späteren Lebensalter leichte Gesichtsfeldverluste [18,202]. Die ERG-Veränderungen können somit zur Überprüfung des Konduktorinnen-Status bei Töchtern obligater Überträgerinnen X-chromosomaler RP verwendet werden [18].

Der Ausschluß der Diagnose Retinitis pigmentosa ist bei Geschwistern aus einer Familie mit autosomal rezessiver Vererbung bereits im Alter von 6-8 Jahren, bei autosomal dominanter Vererbung erst im Alter von 12-16 Jahren elektroretinographisch möglich [202].

Locus-Phänotyp-Korrelation

Derzeit sind für Retinitis pigmentosa mindestens 26 Genloci bekannt, die teilweise bereits klinisch und durch ihren Vererbungsmodus unterscheidbar sind. Dies ist Ausdruck der bei Retinitis pigmentosa anzutreffenden nicht-allelischen Variabilität. Eine Übersicht der bekannten Loci und ihrer Merkmale gibt Tabelle 1 im Anhang (S. A1).

Den Versuch einer Zusammenfassung verschiedener Gendefekte zu wenigen pathophysiologischen Klassen stellt die Klassifikation von van Soest et al. (1999) dar. Es werden hier Defekte des Abbaus und der Erneuerung der Außensegmente (Klasse 1 mit meist dominantem Erbgang) von Störungen in der Signaltransduktion (Klasse 2 mit meist rezessivem Erbgang) und Veränderungen des Retinalmetabolismus unterschieden. Rhodopsin und Peripherin gehören dabei vom Pathomechanismus in Klasse 1, wozu auch der autosomal dominante Erbgang paßt [193].

Mutation-Phänotyp-Korrelation

Neben der nicht-allelischen gibt es bei Retinitis pigmentosa eine ausgeprägte allelische Variabilität [42]. Eine Korrelation zwischen einzelner Mutation und Phänotyp ist in Teilen möglich und wird exemplarisch an bekannten Rhodopsin- und Peripherin-Mutationen diskutiert (siehe 1.2.3 und 1.3.3).

1.1.6 Sehvorgang: Physiologie und allgemeine Pathophysiologie

1.1.6.1 Physiologie

Die Stäbchen und Zapfen bestehen aus zwei miteinander verbundenen Bereichen, einem inneren und einem äußeren Segment. Während im inneren Segment die Proteinsynthese stattfindet, ist im äußeren Segment die Phototransduktion, die Umwandlung von Lichtimpulsen in elektrische Impulse, lokalisiert. Das äußere Segment ist mit einem Stapel von Scheibchen gefüllt, an deren Membran die elektrischen Vorgänge der Phototransduktion stattfinden [89]. Zum Aufbau der Photorezeptoren siehe Abbildung 2 [79,80].

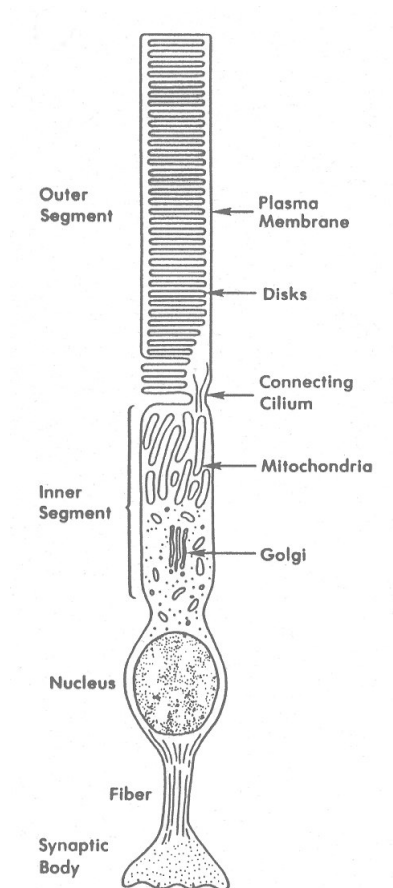


Abb. 2: Schematische Darstellung des Photorezeptors mit Innen- und Außensegment [79,80]

Die Scheibchen in den Außensegmenten von Stäbchen und Zapfen entstehen durch Evaginationen der Membran des verbindenden Ciliums zwischen Innen- und Außensegment. Dabei entsteht zeitgleich zur Evagination der Membran eine Verbindung zwischen der proximalen Membran der distaleren Evagination und der distalen Membran der nachfolgenden Evagination und es bildet sich eine zirkuläre Falte um die Peripherie der Scheibchen. Diese Verbindung schließt sich bei Stäbchen vollständig, bei Zapfen bleiben häufig kleinere Defekte offen. Somit stellt der Innenraum der Scheibchen einen mehr oder weniger streng abgetrennten extrazellulären Raum im Außensegment des Photorezeptors dar. Dieser Vorgang beginnt am proximalen, dem Innensegment zugewandten Ende des Außensegmentes, und die reifenden und ausgereiften Scheibchen bewegen sich auf den distalen Pol zu [173]. Zur Verdeutlichung siehe Abbildung 3.

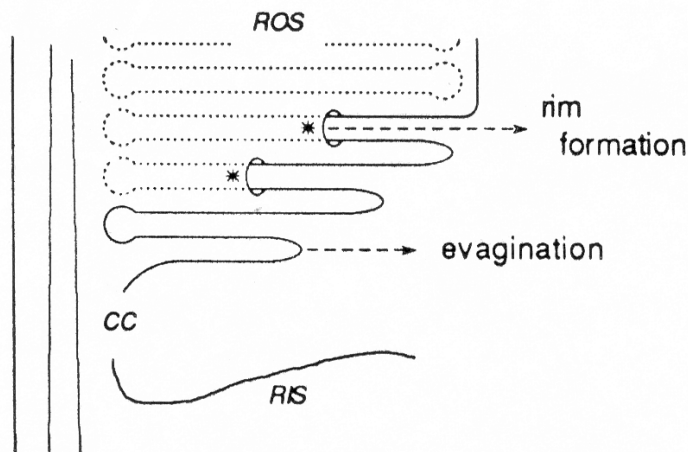


Abb. 3: Scheibchenentstehung im Außensegment des Photorezeptors durch Evagination und Umschlagfaltenbildung. ROS: rod outer segment (Stäbchenaußensegment), rim formation: Umschlagfaltenbildung, CC: connecting cilium (Verbindendes Cilium), RIS: rod inner segment (Stäbcheninnensegment) [9]

In die Membran eines jeden Scheibchens eines Stäbchens sind etwa 10.000 Rhodopsin-Moleküle integriert. Das einzelne Rhodopsin-Molekül ist ein Transmembranprotein, das durch die Anordnung seiner Transmembrandomänen eine Art Tasche für ein Molekül 11-cis-Retinal bildet. Trifft ein Photon auf einen solchen Komplex aus Rhodopsin und Photopigment, wird das 11-cis-Retinal durch diese Aktivierung isomerisiert zu all-trans-Retinal. Das dadurch aktivierte Rhodopsin (Metarhodopsin II) tritt in Wechselwirkung mit dem G-Protein Transducin, wodurch das gebundene Guanosindiphosphat (GDP) durch Guanosintriphosphat (GTP) ersetzt wird. Dabei kommt es zur Spaltung in die GTP-tragende α -Untereinheit und die β - und γ -Untereinheit. Dieser Schritt stellt gleichzeitig eine starke Amplifikation des Signals dar, da ein Molekül all-trans-Retinal 500 Moleküle Transducin aktivieren kann.

Die GTP-tragende α -Untereinheit des Transducins aktiviert nun ihrerseits die zyklische GMP-Phosphodiesterase (PDE), wobei die beiden γ -Untereinheiten von dem Komplex aus α - und β -Untereinheit abgetrennt werden. Die aktivierte PDE hydrolysiert das zyklische GMP (cGMP) zu 5'GMP. Mindestens drei cGMP-Moleküle sind an einen cGMP-gesteuerten Ionenkanal gebunden, der durch die Konformationsänderung am GMP verschlossen wird. Da der Kanal im offenen Zustand den Durchgang von ein- und zweiwertigen Ionen ermöglicht, kommt es bei seinem Verschluss zu einer Hyperpolarisation des Photorezeptors, was den Beginn der elektrischen Signaltransduktion darstellt.

Parallel zu dem Vorgang der Aktivierung läuft ein Mechanismus zur Begrenzung der Reaktion und Inaktivierung des Photorezeptors. Während der cGMP-gesteuerte Ionenkanal geschlossen ist, werden weiterhin Ca^{2+} -Ionen im Austausch mit Na^{+} -Ionen durch eine $\text{Na}^{+}\text{-Ca}^{2+}$ -Pumpe nach extrazellulär gepumpt. Somit sinkt die Ca^{2+} -Konzentration intrazellulär. Dies aktiviert das Protein Recoverin, welches seinerseits die

Guanylatzyklase aktiviert. Diese stellt intrazellulär wieder höhere cGMP-Spiegel her, wodurch der geschlossene cGMP-gesteuerte Ionenkanal wieder geöffnet wird. Rhodopsin wird unterdessen durch das Zusammenwirken des Enzyms Rhodopsin-Kinase und des Proteins Arrestin (Synonyme: 48-kd-Protein, S-Antigen) durch Phosphorylierung des carboxy-terminalen Endes inaktiviert. Nach der Abspaltung von Rhodopsin wird das all-trans-Retinal über enzymatische Vorgänge wieder in 11-cis-Retinal umgewandelt und kann anschließend einen neuen Komplex mit Rhodopsin bilden [80,89].

1.1.6.2 Genfunktion-bezogene Pathophysiologie

Für die Pathophysiologie der Retinitis pigmentosa werden je nach beteiligtem Gen und je nach der dort aufgetretenen Mutation verschiedene Mechanismen für die Zellschädigung angenommen.

Diese ergeben sich teilweise aus der Funktion der beteiligten Gene: So wird für die cGMP-Phosphodiesterase (PDE), welche physiologischerweise den erhöhten cGMP-Spiegel des aktivierten Photorezeptors senkt, eine Schädigung durch das Fehlen dieser Wirkung und ein Zelluntergang durch die erhöhten intrazellulären cGMP-Werte angenommen. Für Peripherin, welches als Strukturprotein die Umschlagfalten der Scheibchen stabilisiert, kann eine Schädigung durch die fehlende Regenerationsfähigkeit der Außensegmente angenommen werden. Da das Molekül Rhodopsin eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion spielt, ist eine Schädigung dieses Prozesses durch veränderte Rhodopsin-Moleküle plausibel, jedoch noch nicht unbedingt ein Untergang des Photorezeptors, v.a. nicht der Zapfen, die kein Rhodopsin enthalten [169]. Die konkreten Ansätze zu Pathomechanismen bei Rhodopsin und Peripherin werden an späterer Stelle bei 1.2 und 1.3 diskutiert.

Da die verschiedenen Genschäden im Endeffekt zu einem sehr ähnlichen phänotypischen, fundoskopischen Bild führen, wird vermutet, daß die verschiedenen Veränderungen auf einer gemeinsamen pathologischen Endstrecke zusammenführen [169]. Siehe hierzu auch

1.1.6.4

1.1.6.3 Pathophysiologische Ansätze aus dem ERG

Mit der Elektroretinographie läßt sich die Netzhautfunktion bei Patienten mit Retinitis pigmentosa im zeitlichen Verlauf darstellen. Um dabei Aussagen über den Verlauf der Erkrankung und die zugrunde liegenden Mechanismen zu gewinnen, wurden Computermodelle zur Entstehung der verschiedenen ableitbaren Potentiale entwickelt [85,86,87]. Dadurch können die Signale weiter differenziert und verschiedenen (elektro-)physiologischen Grundgrößen der an der Phototransduktion beteiligten Zellen zugeordnet werden. Die Modelle sollen hier kurz vorgestellt werden, um die Rückschlüsse von bei

Patienten gefundenen ERG-Veränderungen auf mögliche Schädigungsmuster plausibel zu machen. Dies soll an ausgewählten Patienten nachvollzogen werden.

Um eine getrennte Untersuchung der Einzelpotentiale der beteiligten Zellen zu ermöglichen, wurde rechnerisch die Gesamtwelle des ERG in eine P3-Welle, entsprechend den Photorezeptoren, und eine P2-Welle als Reaktion der Inneren Körnerschichten und Ganglienzellen der Netzhaut aufgetrennt. Da die Inneren Körnerschichten erst später innerviert werden und die P2-Welle somit später einsetzt, entspricht die P3-Welle bis zum Einsetzen der P2-Welle der a-Welle. Die b-Welle des ERG ergibt sich dann aus der Superposition der Signale von P3- und P2-Welle. Zur Veranschaulichung siehe Abbildung 4.

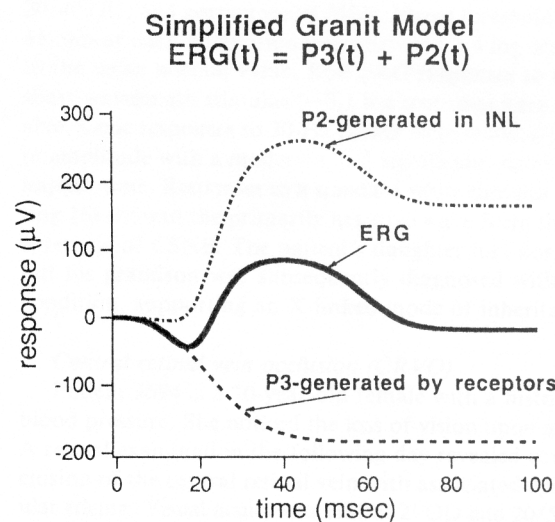


Abb. 4: Schematische Darstellung der Zusammensetzung der ERG-Welle aus P3-Welle (in den Photorezeptoren generiert) und P2-Welle (in der Inneren Körnerschicht (Inner Nuclear Layer, INL) generiert) [86].

Für die P3-Welle des ERG wurde ein mathematisches Modell entworfen, das aus einem linearen Filter und einem nachgeschalteten statischen nichtlinearen Filter mit Sättigungsfunktion besteht. Der erste wird physiologisch dem Vorgang der Phototransduktion zugeordnet, die innerhalb weiter Grenzen als linearer Prozeß zwischen Signalintensität und Anzahl der Isomerisationen beschrieben ist. Der zweite Filter entspricht der Signalweiterleitung durch die Potentialverschiebung an den Ionenkanälen, welche durch die begrenzte Anzahl an Ionenkanälen eine Sättigung bei starken Reizen aufweist. In dieses Modell fließen für den linearen Filter eine Konstante für die Korrelation von Signal und Antwort ein sowie für den nichtlinearen Filter die maximale Amplitude ($R_{m_{p3}}$) und eine Halbsättigungskonstante (σ_{p3}). Um nur die Stäbchen zu untersuchen, wird die Mitantwort der Zapfen auf den Stimulus mit blauen Lichtimpulsen rechnerisch eliminiert. Die gute Übereinstimmung der vorhergesagten mit den tatsächlichen a-Wellen macht

deutlich, daß das ursprünglich von einem einzelnen Photorezeptor ausgehende Modell auf die Summe der Einzelpotentiale Anwendung finden kann.

Dabei konnte gezeigt werden, daß die Amplitude der führenden Zacke der a-Welle proportional zu der ihr zugrunde liegenden Rezeptorantwort ist und somit die erste Phase der ERG-Antwort ein Maß für die Stäbchenaktivität ist. Jedoch zeigt sich schon bei einer Normalpopulation eine erhebliche Schwankungsbreite in der a-Wellen-Amplitude auf ein einheitliches Signal. Durch die Konstanz der Form und des zeitlichen Ablaufs ergibt sich dennoch die Möglichkeit, aus dem Korrekturfaktor für die Angleichung von pathologischen ERGs eine Aussage zur Stäbchenfunktion zu machen. Anhand der Amplitude der P3- bzw. a-Welle lässt sich jedoch nur die Stäbchenfunktion insgesamt untersuchen, eine Differenzierung in die Funktion des linearen und des nicht-linearen Filters ist nicht möglich [85].

Auf der Grundlage dieser Untersuchungen wurde ein mathematisches Modell auch für die P2-Welle entwickelt, das die errechneten Signale des P3-Wellen-Modells als Grundlage hat und die Prozesse der Inneren Körnerschicht und Ganglienzellschicht simuliert. Zur Simulation eines das tatsächliche ERG gut darstellenden Prozesses wurden für die Generation der P2-Welle aus der P3-Welle drei Filter hintereinandergeschaltet. Der erste ist ein biphasischer linearer Filter, der das biphasische Verhalten der P2-Welle bei stärkeren Lichtimpulsintensitäten berücksichtigt, der zweite ein statischer nichtlinearer Filter zur Erfassung des Sättigungseffektes der inneren Zellschichten gegenüber den Signalen der Rezeptoren und als drittes ein weiterer linearer Filter für eine angemessene Verzögerung des Signals.

Dieses Modell für die P2-Welle enthält ebenfalls Konstanten für das Verhältnis der linearen Filter sowie eine maximale Amplitude (Rm_{p2}) und eine Halbsättigungskonstante (σ_{p2}) des nichtlinearen Filters. Bei der Zusammenfassung der beiden Modelle läßt sich die komplette ERG-Antwort in Abhängigkeit von der Impulsstärke in ihrem zeitlichen Verlauf rechnerisch vorhersagen.

Dabei lassen sich die Konstanten der beiden Modelle zu insgesamt fünf zusammenfassen: der Maximalamplitude (Rm_{p3}) und Halbsättigungskonstanten (σ_{p3}) des P3-Generators, der Maximalamplitude (Rm_{p2}) und Halbsättigungskonstante (σ_{p2}) des P2-Generators und einer allgemeinen Konstanten, die sich aus den Einzelkonstanten der linearen Filter zusammensetzt und den Gesamtwert zusätzlich in Abhängigkeit von der Netzhautoberfläche beeinflusst.

Um aus den Ergebnissen der Untersuchungen Rückschlüsse auf die zugrundeliegende Störung ziehen zu können, ist eine Zuordnung der rechnerischen Größen zu Eigenschaften der beteiligten Zellen wichtig. Die Halbsättigungskonstanten der jeweiligen Generatoren stehen für die Sensitivität der Rezeptoren- bzw. Bipolaren- und Ganglienzellschicht. Die

Maximalamplituden sind Ausdruck der maximalen Rezeptorantwort bzw. der maximalen Weiterleitung der Inneren Körnerschicht. Die Gesamtkonstante c faßt die linearen Prozesse in den verschiedenen Zellen zusammen und ist ein Maß für die an der Signaltransduktion teilnehmende Netzhautfläche [86].

Auf der Grundlage des geschilderten Modells ergibt sich die Möglichkeit, durch Variation der eingehenden Parameter real auftretende ERG-Veränderungen nachzustellen und damit Rückschlüsse auf die zugrunde liegenden Veränderungen in der Netzhaut zu ziehen. Es zeigt sich, daß eine alleinige Verlängerung der impliziten P2-Latenz (Zeit zwischen Reiz und Maximum der P2-Welle) nur durch eine Erniedrigung der Rezeptorsensitivität (Erhöhung von σ_{p3}) zustande kommen kann. Damit stellt die implizite P2-Latenz ein Maß für die Rezeptorsensitivität dar.

Für Veränderungen der Maximalamplitude von P2 gibt es zwei Möglichkeiten: (1.) Veränderungen der Maximalantwort der Rezeptoren (Rm_{p3}) und der Sensitivität des P2-Generators (σ_{p2}) führen bei horizontaler Verschiebung (verlängerte implizite P2-Latenz) zu einer Erniedrigung von P2. (2.) Die Maximalantwort der Bipolaren (Rm_{p2}) und die Gesamtkonstante c haben hier einen ähnlichen Einfluß ohne Beeinflussung der impliziten P2-Latenz.

Hiermit ist eine Differenzierung in die Gruppen 1) Veränderung von σ_{p3} , 2) Veränderung von Rm_{p3} oder σ_{p2} , und 3) Veränderung von Rm_{p2} oder c , möglich.

Die letztliche Unterscheidung wird möglich durch die zusätzliche Betrachtung der führenden Zacke der a-Welle, welche durch die Gesamtkonstante (c) und die Rezeptorsensitivität (Rm_{p3}) beeinflusst wird, nicht jedoch durch Veränderungen an den Parametern der Bipolaren- und Ganglienzellschicht (Rm_{p2} , σ_{p2}). Somit sind alle fünf Parameter eindeutig voneinander abzugrenzen als Verursacher einer spezifischen Veränderung an der ERG-Antwort [86].

Bei Retinitis pigmentosa mit vorwiegender Beteiligung der Rezeptorenschicht sind vor allem Veränderungen an den Parametern Rezeptorsensitivität (σ_{p3}) mit nachfolgend verlängerter impliziter P2-Latenz, sowie Rezeptormaximalantwort (Rm_{p3}) und Gesamtkonstante (c) als Ausdruck des regionalen Verlustes an Photorezeptoren zu erwarten. Daher sind vor allem die implizite P2-Wellen-Latenz und die maximale P3-Amplitude als Verlaufsparemeter der RP in Betracht zu ziehen. Für eine einfachere Auswertung kann dabei die trough-to-peak-b-Wellen-Amplitude (niedrigster Wert der a-Welle bis Maximum der b-Welle (siehe Abb. 1 auf Seite 8) bei relativ intakter Innerer Körnerschicht als Annäherung der P2-Welle angenommen werden [86]. Mögliche physiologische Ursachen für eine Abnahme der Rezeptorsensitivität (entsprechend einer

erhöhten Halbsättigungskonstanten (σ_{p3}) sind eine Abnahme des retinalen Pigmentes, eine hypoxische Schädigung der Rezeptoren sowie die Abnahme der beschriebenen Signalamplifikation in den Rezeptoren. Eine Abnahme der Maximalantwort der Rezeptorenschicht läßt sich durch eine metabolische oder hypoxische Schädigung der einzelnen Rezeptoren erklären oder aber durch einen gleichmäßigen Rezeptorverlust, wodurch jede Bipolare Zelle weniger Eingangssignal bekommt.

Die Veränderungen an der zweiten betroffenen Schicht lassen sich schwerer mit konkreten Krankheitsbildern in Übereinstimmung bringen. Für die kongenitale stationäre Nachtblindheit wird ein Prozeß angenommen, bei dem die Sensitivität der Bipolaren-Schicht abnimmt.

Die Abnahme der Gesamtkonstanten führt zu einer linearen Reduktion der gesamten Signalantwort. Da das Modell von einer homogenen Netzhaut ausgeht, stellen sich auch regionale Verluste an Photorezeptoren als eine Abnahme der Gesamtkonstanten dar.

Detaillierte Untersuchungen mit Modellen heterogen geschädigter Netzhaut zeigen, daß der Tatsache eines unterschiedlichen Ausmaßes an Schädigung in verschiedenen Teilen der Netzhaut sogar eine große Bedeutung zukommt. Dabei spielt sowohl die Fläche des mehr betroffenen Netzhautareals als auch das Ausmaß der (Mehr-) Schädigung in diesem Areal eine Rolle. Eine Veränderung der Rezeptorsensitivität oder -maximalamplitude im betroffenen Areal über einen Schwellenwert von 1,8 bis 2,7 log-Stufen reduziert die b-Wellen-Maximalamplitude auf die prozentuale Restfläche intakter Netzhaut. Aber auch eine geringere Veränderung eines dieser beiden Parameter im Bereich von 0,5 log-Stufen führt schon zu einer signifikanten Veränderung der b-Wellen-Maximalamplitude.

Im Gegensatz dazu haben homogene Veränderungen an der gesamten Retina einen sehr viel geringeren Einfluß auf die Amplitude der b-Welle, wo erst ab 1,2 log-Stufen eine Veränderung sichtbar wird. Ein gleich großer Verlust an Netzhautsensitivität oder -maximalantwort über nur einer Netzhauthälfte würde die Maximalamplitude der b-Welle bereits um 30% reduzieren. Dies bedeutet, daß ein gleichmäßiger Untergang von Photorezeptoren über die gesamte Netzhaut, beispielsweise der Verlust jedes zweiten Photorezeptors, kaum Einfluß auf die Maximalamplituden der b-Welle haben würde, wohingegen regionale Verluste in Größe der halben Retina zur Halbierung der Maximalamplitude führen. Die physiologische Erklärung hierfür liegt darin, daß jeweils mehrere Rezeptoren Signale an eine Bipolare weitergeben, so daß bei einem gleichmäßigen Rezeptorverlust weiterhin jede Bipolare ein Signal produzieren würde, während bei regionalen Verlusten an Photorezeptoren die Bipolaren in gleichem Ausmaß betroffen wären. Damit wird deutlich, warum bei Retinitis pigmentosa mit vorwiegend regionalem Rezeptorverlust bereits in frühen Stadien starke Veränderungen an der b-Wellen-

Maximalamplitude auftreten. Andererseits wird deutlich, daß die starken ERG-Veränderungen bei Patienten mit Retinitis pigmentosa das Ausmaß der Schädigung, zumindest der intakteren Netzhautareale, zu hoch einschätzen lassen. Es muß also eine größere Fläche intakter Netzhaut angenommen werden als die reduzierte b-Welle glauben läßt [87].

Studien, die ERG-Ergebnisse in Longitudinalstudien verfolgen und hierbei eine Abnahme der Amplifikation der Stäbchenantwort im zeitlichen Verlauf nachweisen, zeigen für einige Patienten die Existenz von noch voll funktionsfähigen Stäbchen. Da diese auch bei der Geburt normal gewesen sein müssen und eine Mutation alle Zellen gleichermaßen betreffen müßte, kann davon ausgegangen werden, daß bei diesen Patienten zum Zeitpunkt der Geburt alle Photorezeptoren ein normales Maß an Transduktion aufwiesen [169].

Die dann abnehmende Transduktion und Amplifikation kann am ehesten mit einer Schädigung einzelner funktionaler Felder erklärt werden, da die parallele Abnahme von a- und b-Wellen-Amplituden nur bei einer Schädigung von größeren zusammenhängenden Feldern von Photorezeptoren, die alle dieselbe Bipolare versorgen, möglich ist. Die gleichmäßige Abnahme von b- und a-Welle ist zudem ein Hinweis darauf, daß die Zellen der Inneren Körnerschichten nicht geschädigt sind, da hierbei eine überproportionale Abnahme der b-Wellen-Amplitude relativ zur a-Wellen-Amplitude zu erwarten wäre.

Zur Erklärung der reduzierten Amplifikation sind rein funktionale Veränderungen in strukturell unveränderten Photorezeptoren völlig ausreichend. Die beobachtete Verkürzung der Photorezeptoren kann natürlich trotzdem eine Bedeutung für die Transduktion und Amplifikation haben [169].

1.1.6.4 Pathophysiologische Ansätze aus der Histologie und Pathologie

An histologischen Veränderungen lassen sich eine Verschmälerung des retinalen Pigmentepithels, ein Verlust an Stäbchen und Zapfen, teilweise eine Verkürzung der Außensegmente und eine vermehrte retinale Pigmentierung nachweisen [18,169].

Mikroskopische Zellzählungen an Spendernetzhäuten von RP-Patienten und gesunden Kontrollen zeigten hierbei in Abhängigkeit von der Schwere des Krankheitsbildes signifikante Abnahmen der Zellzahl in der Äußeren Körnerschicht (Photorezeptoren) und, weniger ausgeprägt, auch in der Ganglienzellschicht [166]. Die Abnahme der Zellzahl in der Ganglienzellschicht war jedoch nicht konstant, so fand sich bei völliger Blindheit ein Spektrum von unveränderter Ganglienzellzahl bis hin zum vollständigen Verlust der normalen Zytoarchitektur. Die Innere Körnerschicht (Bipolare) zeigte nur im Vergleich der Gruppe mit fortgeschrittener RP mit der Kontrollgruppe eine signifikante Abnahme der Zellzahl, diese jedoch auch deutlich geringer ausgeprägt als in den anderen Schichten.

Der Unterschied im Zelluntergang der verschiedenen Schichten paßt zu den Ergebnissen der ERG-Untersuchungen, die ebenfalls eine Schädigung primär der Rezeptorenschicht als Ursache der Veränderungen voraussagt.

Als Erklärung für den milderen Befall der Inneren Körnerschicht werden ein direkter Effekt des Gendefektes auch auf die Ganglienzellschicht, ein Schutz der Bipolaren durch ihre andere elektrische Aktivität oder eine verminderte Perfusion der Netzhaut diskutiert, welche die Ganglienzellen stärker als die Bipolaren betreffen würde. Alternativ könnte die mikroskopisch geringere Zellzahlverringering auch ein Artefakt durch eine Gliaproliferation und Müller-Zell-Migration mit fälschlicher Deutung als Körnerschichtzellen sein.

Die Zellzahlbestimmungen wurden bei RP-Patienten mit unterschiedlichem Vererbungsmodus durchgeführt. Ein Zusammenhang zwischen der Reduktion der Zellzahl in den verschiedenen Schichten und dem zugrundeliegenden Vererbungsmodus konnte hierbei nicht nachgewiesen werden. Anzunehmen wäre daher eine Unabhängigkeit von dem betroffenen Gen.

Von Bedeutung ist der Erhalt der Inneren Körnerschicht sowie der deutlich mildere Befall der Ganglienzellschicht für therapeutische Ansätze wie Photorezeptortransplantation oder Prothesenimplantation, die eine intakte Innere Netzhaut voraussetzen [166].

Auf der Suche nach einem Zusammenhang zwischen dem Gendefekt und dem beobachteten Untergang der Stäbchen und Zapfen muß aufgrund der großen genetischen Heterogenität bei gleichzeitiger Homogenität der mikroskopischen Befunde davon ausgegangen werden, daß der Mechanismus, der letzten Endes zum Untergang der Photorezeptoren führt, nicht direkt durch die Mutation, sondern durch einen zellulären Mechanismus ausgelöst wird. Dieser zelluläre Mechanismus wäre dann die gemeinsame pathologische Endstrecke, die unabhängig von der sie auslösenden Mutation abläuft und so zu dem einheitlichen phänotypischen Bild führt [198].

Der programmierte Zelltod (PCD) ist ein biologisches Programm der Zelle, welches über eine Veränderung von Transkription und Translation zur Produktion von letalen Proteinen führt, welche ihrerseits über die Aktivierung von Endonukleasen zu einer Fragmentierung der DNA und Verklumpung des Chromatins führen. In einem zweiten Schritt kommt es zur Schädigung der zytoplasmatischen Organellen und schließlich zu einer Schrumpfnekrose der Zelle [156].

Dieser Vorgang kann durch eine ganze Reihe von Stimuli ausgelöst werden und es konnte gezeigt werden, daß es sich hierbei um einen physiologischen Mechanismus bei der Entwicklung (der Netzhaut) handelt, durch den die Feinabstimmung der Verbindungen zwischen den Zellen gewährleistet wird. Auch in der reifen Netzhaut konnte PCD als Folge von atypischen Stimuli nachgewiesen werden. Bei Tiermodellen für Retinitis pigmentosa war der programmierte Zelltod der zugrundeliegende Mechanismus der Netzhaut-

degeneration [198]. So zeigen verschiedene Mausmodelle, die rds-Maus mit Peripherin/rds-Veränderung, die rd-Maus mit verändertem β -PDE-Gen und eine transgene Maus mit Rhodopsinmutation, histologisch das typische Bild des programmierten Zelltodes und weisen auch die damit einhergehende DNA-Fragmentation auf. Es fehlte eine entzündliche Reaktion, die bei Zelluntergang durch Nekrose zu erwarten gewesen wäre [30].

Derzeit noch ungeklärt ist, wodurch der Vorgang des programmierten Zelltodes gestartet wird. Zwar lässt sich für etliche Gendefekte ein Schädigungsmechanismus der Zelle ableiten, offen bleibt jedoch die direkte Kopplung zum Start des PCD-Programmes. Die beteiligten Transmitter und die verschiedenen Aktivierungs- und Inhibitionsverhältnisse sind Gegenstand der Forschung [198].

1.1.6.5 Extragenetische Kofaktoren in der Pathophysiologie

Als exogene Kofaktoren bei der Entwicklung der Retinitis pigmentosa werden Autoimmunphänomene und Fettstoffwechselstörungen diskutiert. Durch den Untergang von Photorezeptoren werden zwangsläufig intrazelluläre Moleküle dem Immunsystem ausgesetzt und können so zu einer immunologischen Reaktion führen. So wurden bei einigen Patienten Antikörper gegen Rhodopsin und Arrestin nachgewiesen, welche im Tiermodell eine Uveitis auslösen und so retinopathogen wirken können. Andererseits brachte auch eine immunsuppressive Behandlung zur Unterdrückung solcher Phänomene keinen nachweislichen Nutzen [nach 202]. Bei anderen Patienten mit RP wurden Abweichungen beim LDL-Cholesterin, dem Apolipoprotein E₂ und den vielfach-ungesättigten Fettsäuren festgestellt. Für die ungesättigten Fettsäuren wird hierbei ein Mechanismus durch eine Störung des Membranaufbaus angenommen [nach 202].

Immer wieder wird auch eine zusätzliche Schädigung durch UV-Strahlung diskutiert [133]. Auch wenn Studien bisher einen protektiven Effekt von Lichtschutz nicht sicher haben nachweisen können [nach 202], wird ein UV-Schutz der Betroffenen allgemein empfohlen [201].

1.2 Rhodopsin

1.2.1 Kartierung, Isolierung und Sequenzierung des Gens

Das menschliche Rhodopsin-Gen wurde 1984 isoliert und sequenziert [136, Sequenz siehe S. A9 im Anhang]. 1986 erfolgte die Kartierung auf Chromosom 3q21-q25 [nach 63], welche 1993 weiter präzisiert wurde auf die Lokalisation zwischen den Markern D3S21 und D3S47, mit einem maximalen LOD-Score bei D3S20, ca. 10 cM zentromerisch von D3S47 [27].

Mit einer geschätzten Prävalenz von 25-30% Mutationen im Rhodopsin-Gen bei amerikanischen adRP-Patienten ist Rhodopsin das am häufigsten veränderte Gen in dieser Population [18]. In europäischen Studien wurden nur 16% Rhodopsin-Mutationen unter den adRP-Patienten gefunden, was mit der Abwesenheit der Pro23Leu-Mutation in Europa zu erklären ist, die in den USA bei der Hälfte der Rhodopsin-Mutationen gefunden wird [27,55,144].

1.2.2 Struktur und Physiologie

Das Rhodopsin-Gen besteht aus 5 Exons von 360, 169, 165, 239 und 107 Bp Länge, die durch Introns von 1783, 1205, 116 und 833 Bp Länge unterbrochen werden. Die Aufteilung in 5 Exons sowie die Exonlängen zeigen eine große Ähnlichkeit zum bovinen Rhodopsin-Gen, wie auch die kodierende Gensequenz zu 89,7 % homolog ist [136].

Das Genprodukt ist ein monomeres Molekül aus 348 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von ca. 40.000 Da [79,80,136]. Es kommt in hoher Konzentration (80-90 % des Proteins) in den Außensegmenten der Photorezeptoren vor [nach 94]. Jedes Scheibchen enthält ungefähr 10.000 Rhodopsin-Moleküle [202]. Da jeden Tag 10% der Scheibchen abgestoßen und vom Innensegment her ersetzt werden, ist das Rhodopsin-Molekül einem sehr raschen Stoffwechsel unterworfen und Störungen dieses Stoffwechsels beeinflussen nachhaltig die Photorezeptorzelle und ihre Integrität [19].

Das Molekül ist an der Membran der intrazellulär gelegenen Scheibchen im hinteren, vom Glaskörper abgewandten Teil der Photorezeptoren sowie an der Plasmamembran der Außensegmente lokalisiert. Rhodopsin ist ein Transmembranmolekül mit 7 Membrandurchgängen (M1-7), dessen Amino-Ende an der Innenseite der Scheibchen und damit extrazellulär liegt. Das Carboxy-Ende liegt im Cytoplasma der Zelle, d.h. an der Außenseite der Scheibchen. Zwischen den Membrandurchgängen gibt es 3 intrazelluläre (i_1 - i_3) und drei extrazelluläre (e_1 - e_3) Schleifen. Zu diesen kommt noch eine weitere intrazelluläre Schleife, i_4 , durch eine doppelte Palmitierung am Carboxy-Ende, deren Palmitatketten in die Lipiddoppelmembran hineinreichen. Siehe hierzu auch Abbildung 5.

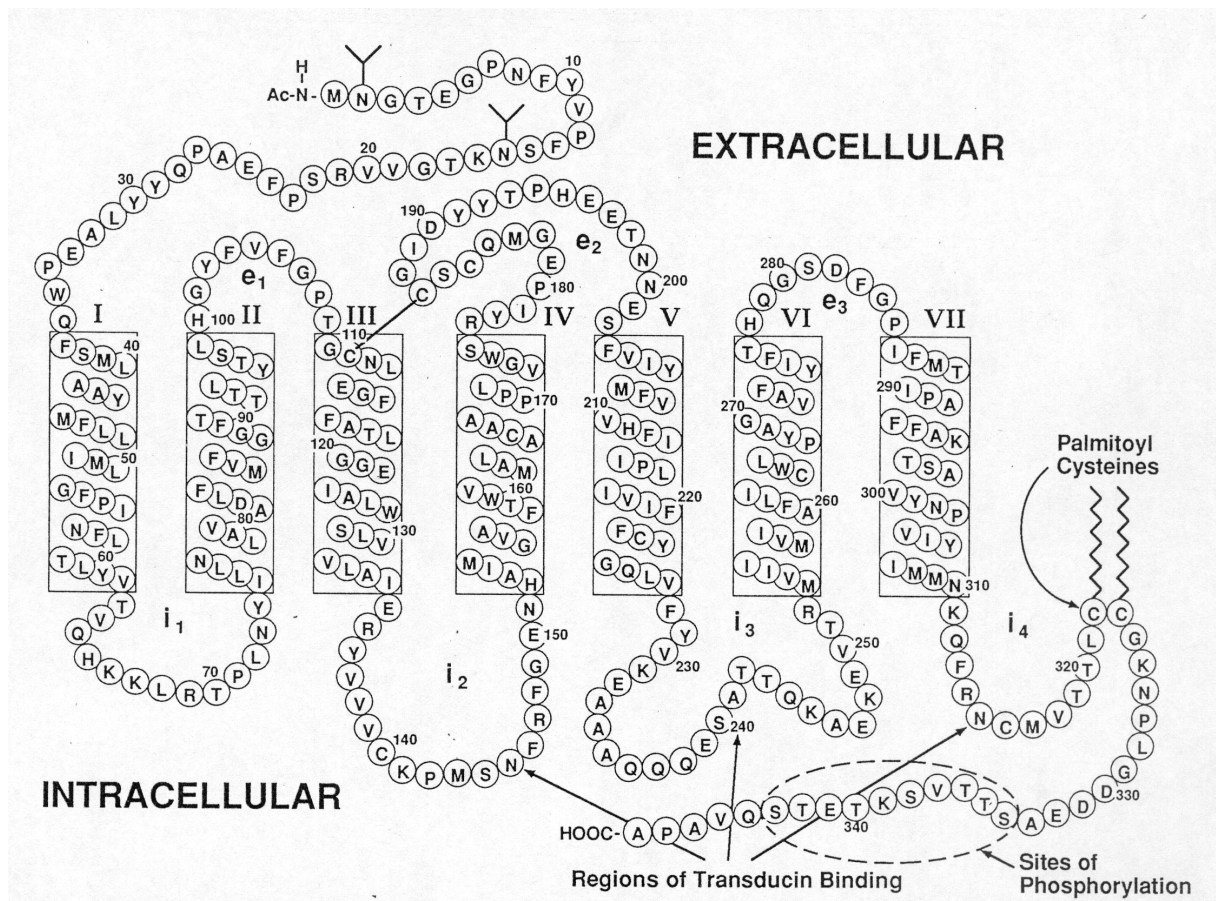


Abb. 5: Schematische Darstellung der Aminosäurekette des Rhodopsin-Moleküls in Relation zur Scheibchenmembran [79]

Jeweils etwa die Hälfte des Moleküls befindet sich intramembran und perimembran, wobei sich die perimembranen Anteile gleichmäßig auf den intra- und extrazellulären Raum verteilen [79]. Die dreidimensionale Struktur des Rhodopsin-Moleküls ergibt eine Tasche, die jeweils ein Molekül Retinal aufnimmt [18,79], siehe auch Abbildung 6.

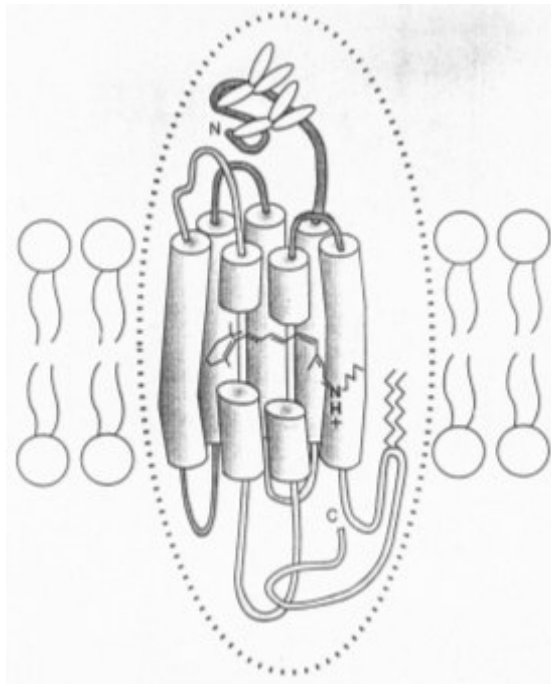


Abb. 6: Schematische Darstellung der dreidimensionalen Struktur des Rhodopsin-Moleküls in der Scheibchenmembran mit Taschenbildung um ein Molekül Retinal [79,80]

Im Rahmen der posttranslationalen Prozessierung wird das Amino-Ende acetyliert und glykosyliert (Asn2 und Asn15), was für den intrazellulären Transport und die Insertion des Moleküls in die Scheibchenmembran von Bedeutung zu sein scheint [44,79]. Daneben gibt es keine weitere typische Signalsequenz zur Membraninsertion am Amino-Ende [79].

Die verschiedenen Domänen des Rhodopsin-Moleküls sind mit bestimmten Funktionen des Proteins verbunden. Zwischen den ersten beiden extrazellulären Schleifen kommt es durch die Bildung einer Disulfidbrücke zwischen Cys110 (e_1) und Cys187 (e_2) zu einer Verbindung, die für die Aufrechterhaltung der dreidimensionalen Struktur des Moleküls von Bedeutung ist [63,79].

An Lys296 (Membrandurchgang M7) wird über eine Schiff'sche Base das 11-cis-Retinal gebunden, wobei auch die umgebenden Aminosäuren und vor allem Glu113 (M3) als Träger des Gegenions wesentlichen Einfluß auf das Absorptionsspektrum des Retinals haben [79].

Am Carboxy-Ende werden an Cys322 und Cys323 Palmitate als Thioester gebunden, die mit großer Wahrscheinlichkeit in die Lipiddoppelmembran hineinreichen, wodurch die vierte cytoplasmatische Schleife (i_4) entsteht [79].

Die extramembranen Anteile scheinen im wesentlichen für die Aufrechterhaltung der dreidimensionalen Struktur des Moleküls zuständig zu sein [79]. Darüber hinaus kommt den intrazellulären Schleifen i_2 - i_4 die Bedeutung der Bindungs- und Aktivierungsstelle für Transducin zu [62,79]. Zu den Details siehe Pathophysiologie 1.2.3.

Die transmembranen Abschnitte beeinflussen wesentlich das Milieu des Retinals, und von ihrer Intaktheit hängt auch die Bindungsfähigkeit des Rhodopsin-Moleküls für Retinal ab. Darüber hinaus beeinflussen sich die verschiedenen Anteile in ihren Funktionen gegenseitig. So konnte gezeigt werden, daß auch Mutationen der transmembranen Anteile Auswirkungen auf die dreidimensionale Struktur haben, so daß die Faltung der transmembranen und der intradiscalen Anteile gekoppelt sein müssen [66].

1.2.3 Ansätze zur Pathophysiologie

Bei der Untersuchung der Pathophysiologie bietet sich zur Übersichtlichkeit die Unterscheidung in verschiedene funktionelle Kompartimente des Moleküls sowie einige Lokalisationen mit bekannter Funktion an. Anhand der Lokalisation in Relation zur Scheibchenmembran sollen nacheinander die extrazellulären, transmembranen und intrazellulären Anteile sowie Aminosäuren oder Formationen mit bekannter Funktion besprochen werden.

Wie bereits in 1.1.6.4 erwähnt, handelt es sich bei den nachfolgend beschriebenen Veränderungen um die ersten Schritte einer pathophysiologischen Kaskade, die später auf einer gemeinsamen Endstrecke münden.

Extrazelluläre Anteile

Hierzu zählen das Amino-Ende sowie die drei extrazellulären Schleifen e_1 - e_3 . Wie bereits beschrieben, haben diese eine wichtige Bedeutung für die dreidimensionale Struktur des Moleküls und den intrazellulären Transport.

Bei Veränderungen im Bereich des Amino-Endes konnten als Folge eine gestörte Glykosylierung und ein daraus folgender gestörter intrazellulärer Transport nachgewiesen werden. Da die Photorezeptorzellen selbst nicht in der Lage sind, das Rhodopsin weiter zu metabolisieren, kann eine intrazelluläre Akkumulation des mutierten Rhodopsins [63], wie diese z.B. für Pro23His an transgenen Mäusen nachgewiesen wurde [158], zu einer Beeinträchtigung der Signaltransduktion sowie letztlich zum Zelltod führen [44].

Klassische Vertreter der strukturverändernden Mutationen im extrazellulären Bereich sind Mutationen an den durch Disulfidbindung verbundenen Cysteinen an Position 110 (e_1) und 187 (e_2). Diese Disulfidbrücke stellt die einzige bekannte dauerstabilisierende Verbindung für die dreidimensionale Struktur dar [119]. Für Veränderungen an einer der beteiligten Positionen konnte die Bildung einer atypischen Disulfidbrücke (Cys185-Cys187 bzw. Cys110-Cys185) nachgewiesen werden. Dies führt im ersten Fall zu einer aufgehobenen Retinalbindungsfähigkeit und zu einer teilweise erhaltenen Retinalbindungsfähigkeit mit verändertem chemischem Verhalten des Komplexes im anderen [91].

Die Bildung einer falschen Disulfidbrücke wird außer bei Mutationen in den betreffenden Cystein-Codons auch für die anderen, nachweislich 3-D-Struktur-verändernden,

extrazellulären Mutationen als stabilisierender Faktor der abnormen Faltstruktur angenommen [119].

Die Veränderungen der dreidimensionalen Struktur führen zu einem weniger kompakten Protein, bei dem der Anteil der α -Helix-Struktur abnimmt. Dadurch kann die Bindungsfähigkeit des Rhodopsin-Moleküls für 11-cis-Retinal in sehr unterschiedlichem Maße herabgesetzt sein. So konnte im Zellkulturmodell bei verschiedenen Mutationen im extrazellulären Bereich (e_2), z.B. Gly188Arg und Tyr191del (6 Bp), eine fast völlig aufgehobene Bindungsfähigkeit nachgewiesen werden, während bei der benachbarten Mutation Asp190Ala die Fehlfaltung deutlich weniger ausgeprägt und die Bindungsfähigkeit für Retinal kaum vom Wildtyp verschieden war [119]. Mit einer verminderten Bindungsfähigkeit für Retinal kann auch eine reduzierte Stabilität des Rhodopsin-Moleküls vergesellschaftet sein, der einen Verlust an Außensegmentstruktur nach sich zieht, wie z.B. auch beim nutritiven Vitamin-A-Mangel beobachtet wurde [nach 19].

In vitro Untersuchungen an kultivierten Zapfen mit einem durch künstliche Mutagenese hergestellten Pro23His-Rhodopsin-Gen ergaben, daß unterschiedliche Mengenverhältnisse von Rhodopsin mit intakter und defekter Faltstruktur exprimiert werden können. Dies erklärt eventuell den unterschiedlichen klinischen Verlauf bei Patienten mit der gleichen Mutation [19,66,119]

Insgesamt wurde in verschiedenen Studien festgestellt, daß Mutationen im extrazellulären Bereich des Moleküls mit einem relativ milden Verlauf bzw. gehäuft mit einer regionalen oder sektoriellen Form von RP einhergehen [63,164].

Intrazelluläre Anteile

Diese bestehen neben den drei intrazellulären Schleifen i_1 - i_3 aus dem Carboxy-Ende des Moleküls mit der vierten intrazellulären Schleife i_4 durch die Insertion der Palmitate in die Zellmembran.

Die Schleifen i_2 bis i_4 wurden als Bindungsstellen für Transducin ermittelt, wobei die weitere Differenzierung ergab, daß in der Regel zwei der drei Schleifen für eine Bindung des Transducins ausreichen, es jedoch bei bestimmten Mutationen trotz intakter Bindungsfähigkeit nicht zur Aktivierung des Moleküls kommt [62].

Die Schleife i_1 sowie das Carboxy-Ende nehmen an der Bindung des Transducins nicht teil. Das Carboxy-Ende hat jedoch eine Bedeutung bei der Inaktivierung des Rhodopsin-Moleküls. So konnte an einem Tiermodell gezeigt werden, daß bei einem Fehlen der letzten 15 Aminosäuren mit Verlust der Phosphorylierungsstellen bzw. der Bindungsstellen für Arrestin die Rezeptorantwort verlängert und bei wiederholten Reizen in kurzen Intervallen auch die erreichbare Maximalamplitude verringert ist.

Im direkten Vergleich der Rezeptorantwort auf einen Stimulus mit einem Photon zeigt sich, daß der Beginn der Rezeptorantwort bei Rhodopsinmutationen am Carboxy-Ende nicht von dem normaler Photorezeptoren zu unterscheiden ist, es jedoch nach 100 ms nicht zu dem physiologischerweise auftretenden Rückgang der Erregung kommt. Dieses bestätigt den Beginn der Inaktivierung noch während der ansteigenden Phase der Rezeptorantwort, welche durch die Phosphorylierung des Carboxy-Endes sowie die nachfolgende Bindung und Aktivierung von Arrestin (siehe 1.1.6.1) vermittelt wird [32].

In nachfolgenden histologischen Untersuchungen dieses Tiermodells zeigte sich, daß es bei der Expression eines großen Anteils mutierten Rhodopsins (mit eingeschränkter Inaktivierung) gar nicht zur Anlage eines Außensegmentes und folgender früher Degeneration kommt. Bei einem geringen Anteil verkürzten Proteins von etwa 10% kommt es zwar zur Anlage eines regulären Außensegmentes, jedoch dann zu einem progressiven Photorezeptoruntergang [32].

Das Carboxy-Ende konnte neben dem Amino-Ende als ebenfalls bedeutsam für den intrazellulären Transport des Rhodopsin-Moleküls nachgewiesen werden. Bei einer Stopmutation an Codon 344 mit Verkürzung des Proteins um vier Aminosäuren sowie bei Mutationen der letzten 5 Codons kommt es zu einer anormalen Kumulation an der Plasmamembran des Zellkörpers [37,182]. Eine direkte Interaktion zwischen dem Carboxy-Ende des Rhodopsin-Moleküls und dem Bindungsprotein des vektorialen Transportsystems des Photorezeptors konnte nachgewiesen werden, ebenso die Aufhebung der Bindungsfähigkeit bei bestimmten Mutationen (Gln344ter, Val345Met, Pro347Ser, Pro347Leu) [184].

Die Mutationen der intrazellulären Anteile gehen im Vergleich der verschiedenen Domänen mit einem besonders gravierenden Verlauf einher [164].

Transmembrane Anteile

Die transmembranen Anteile bieten zwei verschiedene Ansätze zur Pathophysiologie. Zum einen ist für ihre Insertion in die Membran der Scheibchen der hydrophile Charakter dieser Abschnitte entscheidend, so daß ladungsverändernde Mutationen über diesen Mechanismus die Insertion in die Membran stören können [66,122].

Ein zweiter Ansatz liegt in der Funktion der Retinalbindung sowie der Bindung nachfolgender Signalproteine begründet, wobei gezeigt werden konnte, daß weniger die Intaktheit der eigentlichen Retinalbindungsstelle [nach 79] als vielmehr die korrekte dreidimensionale Struktur des Proteins und das Milieu des Retinals wichtig sind für die Bindungsfähigkeit [66] und das korrekte Wellenlängenspektrum des Retinals [79].

Die Bindung von Proteinen der nachgeordneten Signalkaskade hängt von minimalen Konformationsänderungen in der Proteinstruktur ab, so daß Veränderungen der

Ausgangsstruktur, die auch von den transmembranen Anteilen mitbestimmt werden, eine Aktivierung unmöglich machen können [66,79].

Mutationen im transmembranen Bereich des Proteins zeigen einen intermediären Verlauf der Erkrankung [164].

1.2.4 Charakteristika der Rhodopsin-Mutationen

Rhodopsin-Mutationen wurden sowohl bei der autosomal dominanten als auch (sehr selten) bei der autosomal rezessiven Form der Retinitis pigmentosa und bei der autosomal dominant erblichen kongenitalen stationären Nachtblindheit (adCSNB) gefunden.

Auffällig ist eine unterschiedliche Verteilung der Mutationen in verschiedenen Regionen der Erde. Z.B. ist in den USA Pro23His mit 50% die häufigste Rhodopsin-Mutation und sorgt damit für einen großen prozentualen Anteil von Rhodopsinmutationen, während sie in europäischen Untersuchungen nicht gefunden wurde. Da anhand eines Polymorphismus gezeigt werden konnte, daß eine Verwandtschaft zwischen den Trägern der Codon23-Mutation besteht, wird in diesem Fall von einem Foundereffekt durch einen gemeinsamen Vorfahren ausgegangen. Dieses wird dadurch bestätigt, daß bei bekannter irischer Abstammung der Familie auch in Irland keine Mutationen dieses Codons gefunden werden konnten [27,44,55,144].

Für die ebenfalls häufige Pro347Leu-Mutation konnte demgegenüber anhand von Intron-Polymorphismen die Unabhängigkeit der Mutationen voneinander gezeigt werden. Hier müssen in verschiedenen Familien unabhängig voneinander gleichartige Spontanmutationen aufgetreten sein [44,94].

Vielfach wurde nach einer Häufung von Mutationen in bestimmten Bereichen des Rhodopsin-Moleküls gesucht. Jedoch zeigt sich, daß die Mutationen statistisch gleichmäßig über die verschiedenen Abschnitte verteilt sind [63]. Ein gewisser Trend besteht hin zu einer Rarifizierung von Mutationen im Bereich der intrazellulären Schleifen [63,122].

Innerhalb der Bereiche kommt es jedoch zur Bevorzugung bestimmter Codons und Basenpaare.

Diese Häufungen führen dazu, daß fast die Hälfte der Mutationen in nur 5% der Codons bzw. 7% der Basenpaare kumulieren [63]. Als einziger relativer Hotspot für verschiedene Mutationen in einem Codon zeigt sich das Codon 347 mit sechs verschiedenen bekannten Mutationen [44,63]. Eine Häufung derselben Mutation nachzuweisen ist jedoch schwierig, da bekannte Mutationen bei erneutem Auftreten meist nicht wieder publiziert werden, so daß die Frequenz einzelner Mutationen nicht exakt feststellbar ist [63].

Deutlich asymmetrisch ist die Verteilung auf die verschiedenen Arten möglicher Mutationen. Im Rhodopsin-Gen findet sich eine große Mehrheit an ‚short length‘-Mutationen mit weniger als 20 betroffenen Basenpaaren; über 90% der Mutationen sind

einzelne Basenaustausche [63]. Diese führen bis auf drei Nonsense-Mutationen [122,160,180] mit Kettenabbruch sämtlich zu einzelnen Aminosäureaustauschen (Missense-Mutationen) [63].

Insertionen und Deletionen spielen gegenüber den Einzelbasenpaaraustauschen eine deutlich untergeordnete Rolle. Auch für sie konnte kein Hotspot gefunden werden, wenn auch eine Häufung dieser Ereignisse im Exon 5 des Gens zu verzeichnen ist [63].

Von besonderem Interesse für die Erforschung der Pathophysiologie sind die Nonsense-Mutationen, die zu einem frühzeitigem Abbruch der Aminosäurenkette führen. Bisher wurden drei Mutationen dieser Art gefunden: Gln64ter, Glu249ter und Gln344ter [122,160,180], sowie eine Splicestellenmutation in Intron 4 [160]. Von diesen führen Glu249ter und die Splicestellenmutation nur in homozygoter Form zu einer Einschränkung der Sehleistung. Die reduzierte Menge an intaktem Rhodopsin bei der heterozygoten Form führt nicht zum Auftreten der Krankheitssymptome, so daß als Pathomechanismus ein Funktionsverlust bzw. –defizit anzunehmen ist. Die Mutationen Gln64ter und Gln344ter zeigen auch schon in heterozygoter Form deutliche Symptome von RP, so daß hier ein Funktionsgewinn (gain of function) mit schädigender Wirkung angenommen werden muß. Hierbei wird eine Interferenz mit der Scheibchenmembran bzw. ein gestörter intrazellulärer Transport für die schädigende Wirkung verantwortlich gemacht [63,125,159,182].

Insgesamt kann festgestellt werden, daß die von Mutationen betroffenen Codons im Rhodopsin-Molekül zu den hoch konservierten Codons im Vergleich der Arten gehören. So sind 35% der mutationstragenden Codons im Tierreich hoch konserviert im Gegensatz zu durchschnittlich 19%, was die Bedeutung dieser Codons unterstreicht [63,122]. Als Pathomechanismus muß eine Zellschädigung durch Fehlfunktion oder falsche Akkumulation angenommen werden, da die reduzierte Synthese alleine keinen pathogenen Effekt hat.

1.2.5 Klassifikation der Rhodopsin-Mutationen

Eine Klassifikation der Rhodopsin-Mutationen ist theoretisch nach assoziiertem Phänotyp oder nach biochemischen Konsequenzen möglich.

Die Veränderungen des Rhodopsin-Gens gehen wie bei allen weiteren für Retinitis pigmentosa verantwortlichen Genen mit einer sehr großen Phänotypenvielfalt einher. Daher lassen sie sich nicht pauschal einem einzelnen Typus der RP-Klassifikation nach Massof und Finkelstein zuordnen.

Bei den einzelnen Mutationen zeigt sich eine gewisse Konstanz des klinischen Erscheinungsbildes, und besonders innerhalb der betroffenen Familien findet sich die klinische Symptomatik des Indexpatienten häufig auch bei den weiteren Erkrankten [63].

Innerhalb des Rhodopsin-Gens lassen sich Mutationen der verschiedenen Abschnitte, z.B. in Relation zur Plasmamembran, nicht einheitlich mit der Typeneinteilung nach Massof und Finkelstein korrelieren. Vielmehr wird in einigen Fällen die gleiche Mutation verschiedenen assoziierten Phänotypen nach Massof und Finkelstein zugeordnet [63].

Somit sind Phänotyp und Mutation nicht sicher zuordenbar, und eine Klassifikation der Rhodopsin-Mutationen nach Phänotyp erscheint nicht sinnvoll. Es bleibt daher als genaueste und nicht zu verallgemeinernde Angabe die Benennung der Einzelmutation.

Gemeinsame Eigenschaften der Mutationen eines Genabschnittes wurden hingegen auf zellulärer und biochemischer Ebene gefunden. Ein Rhodopsin-spezifischer Klassifikationsansatz geht auf Untersuchungen direkt am Protein zurück. Dabei werden die mutanten Rhodopsin-Moleküle in vitro auf die produzierte Quantität, das Elektrophoreseverhalten (Zeichen der Glykosylierung und Dimerisierung), die Komplexbildung mit 11-cis-Retinal als Ausdruck der korrekten Faltstruktur und ihre subzelluläre Lokalisation untersucht. Es zeigen sich dabei drei unterscheidbare Gruppen: Gruppe I wird in normaler Menge synthetisiert, hat ein normales Elektrophoreseverhalten, zeigt normale Komplexbildung mit Retinal und ist in der intrazellulären Lokalisation nicht von Wildtyp-Rhodopsin zu unterscheiden. Gruppe II wird dagegen in deutlich reduzierter Quantität produziert, zeigt eine andere Verteilung in der Elektrophorese und eine reduzierte bis aufgehobene Retinalbindungsfähigkeit. Unterschieden werden Typ IIa mit Kumulation im Endoplasmatischen Retikulum und Typ IIb mit Verteilung auf Endoplasmatisches Retikulum und Plasmamembran [183].

Untersuchungen am menschlichen Rhodopsin-Gen zeigen für die untersuchten 34 Mutationen eine Verteilung von 85% in Gruppe II gegen 15% in Gruppe I. Dabei häufen sich die Gruppe II-Mutationen in den extrazellulären und transmembranen Anteilen des Moleküls. Die Mutationen in den transmembranen Anteilen gehen typischerweise mit einer Ladungsveränderung oder dem Hinzukommen bzw. Verlust eines Prolins oder beidem einher. Die Mutationen der Gruppe I sind dagegen vor allem am Carboxy-Ende und in der ersten transmembranen Schleife lokalisiert. Diese Veränderungen der transmembranen Schleife sind hierbei weder mit Ladungsveränderung noch mit Prolinveränderung verbunden [181].

Parallel wurde eine ähnliche Klassifikation von Doi et al. [38] in Studien mit künstlich herbeigeführten Basenaustauschen und Deletionen an bovinem Rhodopsin entwickelt, die ebenfalls in drei Gruppen einteilt, welche mit den obigen in Übereinstimmung zu bringen sind: Typ I entspricht in korrekter Faltstruktur und Retinalbindungsfähigkeit dem Wildtyp, Typ II zeigt eine defekte Faltstruktur des Proteins, eine Kumulation im Endoplasmatischen Retikulum und eine aufgehobene Retinalbindungsfähigkeit. Typ III hat demgegenüber zwar

eine defekte Faltstruktur, jedoch eine teilweise erhaltene Bindungsfähigkeit [38]. Auch in dieser Studie ist nur ein sehr geringer Teil der untersuchten Mutationen zum Typ I gehörig. Es handelt sich hierbei um Einzelbasenaustausche in Codons 191-194 und kleinere Deletionen im Bereich der Codons 193-202 (i_2), die offenbar die Rhodopsinfunktion nur gering beeinflussen und auch einen geringen Konservierungsgrad zwischen den Arten aufweisen. Der weitaus größere Teil der intradiscalen Veränderungen beeinflusst nachhaltig die Faltstruktur und die Retinalbindungsfähigkeit [38].

Die Untersuchungen der Zuordnung weiterer Mutationen verschiedener Bereiche zu den Typen an Mutationen zeigten bis auf wenige Ausnahmen eine große Übereinstimmung bei der Zuordnung von Typ I zum Carboxy-Ende und 1. transmembraner Schleife und Typ II und III zu den extrazellulären und transmembranen Anteilen. Die Tendenz bei den Mutationen der Typen II und III zu Veränderungen an Ladung und Prolinpräsenz war hier ebenfalls nachweisbar [105].

Es ergeben sich gewisse Unterschiede in vergleichenden Studien einzelner Mutationen im humanen und bovinen Rhodopsin-Gen, bei denen das bovine Rhodopsin noch zur Bindung des Retinal befähigt ist, das humane jedoch keine Bindungsfähigkeit zeigt, was für eine größere Stabilität des bovinen Rhodopsin-Gens spricht. Dieses kann eine Möglichkeit zur Untersuchung instabiler humaner Rhodopsinmutanten darstellen [181].

1.2.6 Aktuell bekannte Mutationen

Als erste Mutation im Rhodopsin-Gen wurde 1990 von Dryja et al. die Mutation Pro23His beschrieben [47]. In der Folge wurden weitere Mutationen in verschiedenen Bereichen des Rhodopsin-Gens beschrieben, so daß aktuell etwa 90 Mutationen bekannt sind. Da diese Mutationen häufig nur in einer Familie vorkommen, ist anzunehmen, daß noch viele weitere Mutationen gefunden werden [122]. Da bereits publizierte Mutationen bei erneutem Auftreten meist nicht erneut veröffentlicht werden, kann die Frequenz des Auftretens einzelner Mutationen nicht konkret bestimmt werden. Als einzige häufig auftretende Mutation ist daher nur die Pro23His-Mutation mit einem Anteil von 50% der in den USA gefundenen Rhodopsinmutationen bekannt [27].

Neben den krankheitsauslösenden Mutationen sind im Rhodopsin-Gen noch 14 Polymorphismen beschrieben, die teilweise mit Aminosäurentausch einhergehen, jedoch immer ohne pathologische Konsequenz bleiben. Ein Effekt auf den Schweregrad der Erkrankung bei gleicher Mutation durch verschiedene Polymorphismen konnte nicht nachgewiesen werden [180].

Eine Auflistung der aktuell bekannten Mutationen und Polymorphismen findet sich in Tab. 2 und 3 im Anhang (S. A13 und A15).

1.3 Peripherin / rds

1.3.1 Kartierung, Isolierung und Sequenzierung des Gens

Retinal degeneration slow (rds) wurde erstmalig 1978 als eine H-2-gekoppelte Mutation bei Mäusen mit den Symptomen einer abnormalen Entwicklung von Stäbchen und Zapfen und dem anschließenden langsamen Untergang der Photorezeptoren beschrieben. Das dazugehörige rds-Gen wurde isoliert und auf dem murinen Chromosom 17 lokalisiert [192]. 1989 erfolgte die Identifikation der mRNA-Sequenz des murinen rds-Gens, kodierend für 346 Aminosäuren [187].

Die Identität des rds-Gens mit dem zuvor beschriebenen bovinen Peripherin-Gen [129] konnte 1990 nachgewiesen werden [34]. Seitdem gibt es die kombinierte Bezeichnung Peripherin/rds, um das in den Photorezeptoren vorkommende Peripherin von einem weiteren menschlichen Protein gleichen Namens abzugrenzen und den Zusammenhang zum murinen rds-Syndrom zu zeigen [36]. Die cDNA-Sequenz des bovinen Peripherin-Gens wurde ebenfalls 1990 aufgeklärt [35].

Wegen der Analogien der Symptome der rds-Mäuse zur menschlichen Retinitis pigmentosa untersuchten Travis et al. (1991) das menschliche Peripherin/rds-Gen. Dabei wurde es auf Chromosom 6p12 lokalisiert und sequenziert, zur Sequenz siehe Anhang S. A16 [188]. In dieselbe Region auf Chromosom 6p wurde ein Genlocus (RP6) für autosomal dominante RP kartiert [51].

Im selben Jahr wurden die ersten mit Retinitis pigmentosa im Zusammenhang stehenden Mutationen im Peripherin/rds-Gen gefunden [53,101]. Ebenso wurde in einer irischen Familie mit RP6-Lokus gezeigt, daß Marker aus dem Peripherin/rds-Gen in der Lokalisation mit RP6 auf 6p übereinstimmen und somit das Peripherin/rds-Gen dem zuvor gefundenen Genlocus RP6 sehr wahrscheinlich entspricht [97].

Bei nachfolgenden Untersuchungen an Patienten mit Retinitis pigmentosa zeigte sich, daß ca. 3% der Patienten mit adRP Mutationen im Peripherin-Gen aufweisen [45,107]. In einer Studie, die in der Patientenauswahl die Kriterien nach Peripherin-typischen Veränderungen wählte, konnten bei 10,6% der Untersuchten Mutationen des Peripherin-Gens gefunden werden [111].

1.3.2 Struktur und Physiologie

Das Peripherin-Gen besteht aus 3 Exons von 581, 247 und 213 Bp Länge, die durch 2 Introns getrennt werden [101,188]. Die Längen der Exons sowie die an sie angrenzenden Bereiche sind über die Artgrenzen hinweg relativ einheitlich, es bestehen jedoch signifikante Unterschiede bei den Intronlängen [121]. Die kodierende DNA-Sequenz ist zu 76,5% homolog zwischen humanem und murinem Peripherin/rds-Gen [188].

Das Peripherin-Molekül besteht aus 346 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von ca. 39.000 Da [35,188]. Es bildet weniger als 5% des in Photorezeptoren vorhandenen Proteins [35]. In der Primärstruktur finden sich vier hydrophobe Abschnitte mit 23-26 Aminosäuren Länge, passend zu Membrandurchgängen (M1-M4). Weiterführende Untersuchungen erweisen Peripherin als integrales Membranprotein, bei dem Carboxy- und Amino-Ende extradiscal liegen. Dadurch kommt es zu einer extradiscalen (e_1) und zwei intradiscalen Schleifen (i_1 und i_2). Dabei ist die zweite intradiscale Schleife mit 141 deutlich länger als die erste mit 21 Aminosäuren. Eine schematische Abbildung (Abb. 7) zeigt die Aminosäurenkette in Relation zur Scheibchenmembran [107].

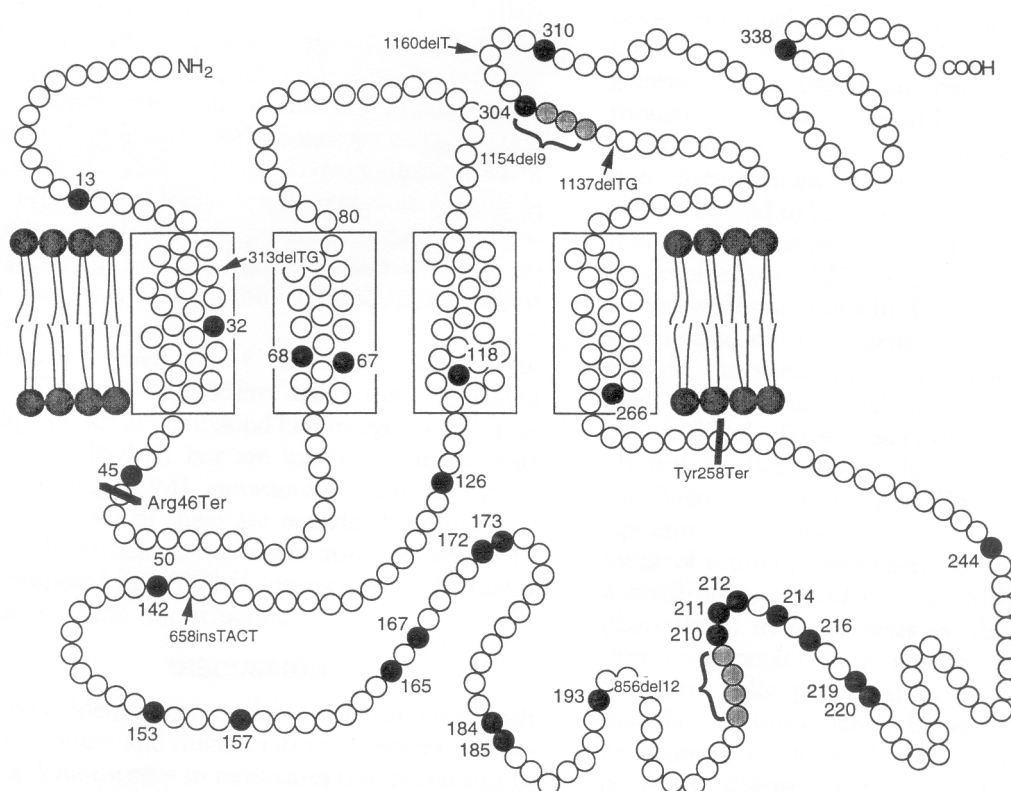


Abb. 7: Schematische Darstellung der Aminosäurenkette des Peripherin-Moleküls in Relation zur Scheibchenmembran, markiert sind einige der bekannten Mutationen [107]

Im humanen Peripherin-Gen finden sich zwei mögliche Glykosylierungsstellen an Position 53 (i_1) und 229 (i_2) [188], von denen wahrscheinlich nur die zweite tatsächlich glykosyliert ist [nach 199].

Die Übereinstimmung der Primärstruktur zwischen humanem, murinem, bovinem und Ratten-Peripherin liegt bei 85%. Am höchsten konserviert ist die Sequenz in der zweiten intradiscalen Schleife (i_2) mit 92% [188].

Die Lokalisation von Peripherin beschränkt sich fast ausschließlich auf die Außensegmente der Photorezeptoren (Stäbchen und Zapfen) [9,129,190]. Geringe Mengen sind auch in

den Innensegmenten der Photorezeptoren nachweisbar, was mit der dort stattfindenden Proteinsynthese zu erklären ist [190]. In den Außensegmenten stellt es sich als membrangebundenes Protein in den Membranen der Scheibchen dar. Etliche Studien lokalisieren es noch genauer an den Umschlagfalten der Scheibchen, was auch durch die dort sehr viel geringere Dichte an Rhodopsin bestätigt wird [9,35,129,131]. Eine einzelne Studie lokalisiert das Peripherin-Molekül gleichmäßig verteilt über die Scheibchen ohne Akkumulation an den Rändern. Als Erklärung für die unterschiedlichen Befunde wird die Maskierung bestimmter Peripherin-Epitope an den lamellaren Flächen der Scheibchen angeboten, so daß die in den anderen Studien benutzten Antikörper nur an den Falten binden können [190].

In elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Regeneration von Scheibchen an der Basis der Außensegmente (s.a. 1.1.6) zeigt sich, daß Peripherin nur an den vollständigen Falten in Nähe des Ciliums nachweisbar ist und in der vom Cilium abgewandten Seite in dem Maße erscheint, wie die Scheibchen geschlossen werden. Daraus folgt, daß die Entstehung der Scheibchenflächen und ihre Verbindung zu geschlossenen Scheibchen zwei getrennte Vorgänge sind, und es sich bei der zunehmenden Anreicherung von Peripherin um eine spezifische Synthese oder einen spezifischen Transportweg für die Umschlagfalte der Scheibchen handelt [9,137,173].

In der Scheibchenmembran liegt Peripherin als durch Disulfidbrücken verknüpftes Dimer vor und bildet entweder Homotetramere oder Heterotetramere mit dem ebenfalls dimeren Rom-1-Protein [13,69,71,129].

Rom-1 ist mit 351 Aminosäuren Länge und 37.3 kd Molekulargewicht Peripherin in der Proteinstruktur sehr ähnlich. Die Aminosäuresequenz ist zu 35% mit Peripherin identisch (49% mit konservierten Veränderungen), auf Nukleotidebene erreicht die Identität 55% [13]. Besonders hoch konserviert sind vier Bereiche zwischen Peripherin und Rom-1: Zwei Abschnitte in der großen intradiscalen Schleife i_2 , von denen der größere auch unter den Peripherin-Genen der verschiedenen Spezies konserviert ist, und die Übergänge zwischen Amino- und Carboxy-Ende und der jeweils anschließenden transmembranen Schleife [13]. Die Intron/Exon-Struktur ist mit unterschiedlicher Intronlänge, jedoch gleicher Lokalisation der Übergänge fast identisch. All dieses spricht für die Zugehörigkeit von Peripherin und Rom-1 zu einer Proteinfamilie, die sich durch eine Duplikation aus einem gemeinsamen Vorfahren entwickelte [13,14]. Unterschiede der Proteine bestehen in der unterschiedlichen Ladung der beiden Enden mit signifikant verschiedenen isoelektrischen Punkten und im Fehlen der Glykosylierungsstellen bei Rom-1 [13,14]. Damit ist auch nur zwischen Peripherin-Molekülen eine stabile Verbindung über die Kohlenhydratketten denkbar. Die Bindung zwischen Peripherin und Rom-1 erfolgt nicht-kovalent [13], evtl. unter Beteiligung

der Ladungsdifferenz zwischen den Proteinen [14]. Dabei bildet sich ein stabiler Komplex aus je einem Dimer Peripherin und Rom-1. Die Proteine scheinen bei Abwesenheit des anderen Bindungspartners auch zur Bildung von stabilen Homotetrameren in der Lage zu sein [69,71].

Wie Peripherin ist Rom-1 an den Falten der Scheibchen lokalisiert, konnte anfangs jedoch nur in Stäbchen, nicht in Zapfen nachgewiesen werden [13]. Später zeigte sich, daß Rom-1 oder ein nahe verwandtes Protein auch in Zapfen vorkommt und auch dort mit Peripherin analoge Komplexe bildet [131]. Die Peripherin/Rom-1-Komplexe stellen zusammen etwa 4% der Proteinmasse der Scheibchenmembran dar und sind damit nach Rhodopsin (90%) das am häufigsten vorkommende Protein [69].

Die Interaktion zwischen Peripherin und Rom-1 wird dadurch bestätigt, daß es kombinierte Gendefekte in beiden Genen gibt, die zur Ausbildung von Retinitis pigmentosa führen. Die Defekte treten dabei jeweils heterozygot auf und sind einzeln nicht krankheitsauslösend [99]. Die Untersuchung der Quartärstruktur zeigt, daß die hierbei beteiligte Leu185Pro-Mutation im Peripherin-Gen die Bildung von Homotetrameren in Abwesenheit von Rom-1 unmöglich macht, es jedoch bei Anwesenheit von Wildtyp-Rom-1 zur Bildung von funktionell unauffälligen Heterotetrameren kommt. Die in diesem Zusammenhang gefundenen Nullmutationen im Rom-1-Gen mit einem Verlust des Genprodukts führen dann zur Ausbildung des Krankheitsbildes im Fall der digenischen Vererbung. Bei einem reinen Rom-1-Defekt wird als krankheitsverhindernder Mechanismus die Bildung von funktionellen Peripherin-Homotetrameren vermutet [70]. Allerdings wird auch von adRP-Patienten mit Rom-1-Nullmutationen berichtet, für die kein begleitender Peripherin-Defekt nachgewiesen werden konnte. Es handelt sich hierbei jedoch um kleine Stammbäume, so daß nicht klar ist, ob die Veränderungen krankheitsauslösend sind, ob es sich wirklich um eine monogene Erkrankung handelt oder ob gegebenenfalls eine Kombination mit einem anderen Gendefekt vorliegt [12].

Die Funktion des Peripherin-Moleküls ist aus der Struktur im einzelnen nicht ableitbar. Eine direkte Beteiligung am Sehvorgang ist unwahrscheinlich, da rds-Mäuse eine Aktivierung auch nachgeordneter Netzhautzellen und damit eine funktionierende Sehkaskade zeigen. Auch die physiologische Abnahme der intrazellulären cGMP-Spiegel nach Photoinduktion bei rds/rds-Mäusen spricht dagegen [nach 190].

Mit sehr großer Wahrscheinlichkeit ist das Peripherin/rds-Protein an der Bildung und Aufrechterhaltung der Scheibchenstruktur beteiligt [34,35,129,199]. Dieses wird zum einen durch seine Lokalisation nahegelegt und zum anderen durch die Tatsache bestätigt, daß es bei rds-Mäusen nicht zur Ausbildung von flachen Scheibchen kommt, sondern sich Opsin-enthaltende Vesikel bilden [9,137]. Auch die Studie, die von der gleichmäßigen

Verteilung von Peripherin über das gesamte Scheibchen ausgeht, postuliert als Funktion des Peripherin-Moleküls eine Beteiligung an der Aufrechterhaltung der thermodynamisch ungünstigen scharfen Falten an den Rändern der Scheibchen. Hier werden Interaktionen zwischen gegenüberliegenden membrangebundenen Peripherin-Molekülen über den intradiscalen Spalt von 20 Å als stabilisierendes Element angenommen [190]. In in-vitro-Studien konnte ein Zusammenhang zwischen intakter Disulfidbrückenbildungsfähigkeit und der Ausbildung von flachen Scheibchen gezeigt werden. Die durch die Disulfidbrücken stabilisierte Dimerisierung der Peripherin-Moleküle erscheint damit als wesentlich für die Funktion des Proteins [199].

Alternativ ist eine Beteiligung an der Verankerung der Scheibchen am Cytoskelett des Photorezeptorenaußensegments bzw. an der Verbindung zwischen den Scheibchen oder zwischen Scheibchen und Plasmamembran denkbar [34,35].

1.3.3 Ansätze zur Pathophysiologie

Es muß unterschieden werden zwischen den direkten Folgen von Mutationen auf Struktur und Funktion des Proteins und den pathophysiologischen Zusammenhängen des Zelluntergangs, die an anderer Stelle ausführlicher behandelt werden, s. 1.1.6.

Über die Pathophysiologie der Peripherin/rds-Veränderungen ist sehr viel weniger bekannt als beim Rhodopsin-Gen. Aus den gefundenen Mutationen in Tiermodellen sowie beim Menschen ergeben sich Rückschlüsse auf mögliche Schädigungsmechanismen und Funktionen der betroffenen Abschnitte.

Unterschieden werden verschiedene Bereiche des Peripherin-Gens: Vier transmembrane Anteile, die intra- und extradiscalen Schleifen (i_1 , i_2 und e_2) und die extradiscal gelegenen Amino- und Carboxy-Enden. Den extradiscalen Bereichen wird eine mögliche Bindung mit den intrazellulären Strukturen des Cytoskeletts zugeschrieben und damit dem Peripherin-Molekül eine Bedeutung für die Ordnung und Organisation innerhalb des Außensegmentes. Das Carboxy-Ende ist stark geladen, was für die Interaktion eine Bedeutung haben kann [35].

Im Zusammenhang mit den transmembranen Abschnitten wird insgesamt wenig über mögliche Pathomechanismen berichtet. Bei den gefundenen Mutationen fällt bei insgesamt relativ mildem Verlauf die große phänotypische Variabilität innerhalb der Familien auf, die eine evtl. Assoziation mit einem zweiten Defekt eines anderen Genes möglich erscheinen läßt [107]. Der hohe Konservierungsgrad zum Beispiel des Codons 118, für das eine pathogene Deletion beschrieben ist, unterstreicht die Bedeutung der transmembranen Abschnitte, evtl. im Zusammenhang der Membranintegrität oder Stabilität des Proteins [53]. Unter den intradiscalen Schleifen fällt die zweite (i_2) durch den höchsten Konservierungsgrad in der gesamten Peripherinsequenz auf [188]. Dies unterstreicht die

Bedeutung dieses Abschnittes. In den intradiscalen Schleifen befinden sich darüber hinaus die beiden potentiellen Glykosylierungsstellen, von denen jedoch nur diejenige in i_2 konserviert ist [188,190]. Durch die mögliche Deglykosylierung in vitro wird die Glykosylierung an mindestens einer der Kandidatenstellen bestätigt [35]. Die Bedeutung der Glykosylierung für die Funktion des Peripherin-Moleküls wird dadurch unterstrichen, daß es in Experimenten mit Zugabe von die Glykosylierung hemmendem Tunicamycin nicht zur Ausbildung von flachen Scheibchen kommt [61].

Der zweiten intradiscalen Schleife i_2 wird die Bindung mit Rom-1 bzw. weiteren Peripherin-Molekülen und damit eine wichtige Funktion für die dreidimensionale Struktur der Scheibchen zugeschrieben [107,111].

Bei der rds-Maus wurde als Ursache für den Peripherindefekt eine Insertion von 9.2 kb repetitiver Sequenzen in Exon 2 festgestellt [121,187]. Dadurch kommt es zu einem Stop-Codon nach 35 Aminosäuren der Insertion und ggf. zu einem Protein, dem ein Teil der i_2 -Schleife und die vierte transmembrane Schleife sowie das Carboxy-Ende fehlen. Es wurde gezeigt, daß die komplett transkribierte RNA nur in dem Innensegment bzw. dem Zellkern nachweisbar ist und nicht in das Außensegment transportiert wird. Damit entspricht die murine rds-Mutation einem Nullallel und als Pathomechanismus ist in erster Linie eine Haploinsuffizienz anzunehmen [121]. Dieses erklärt auch den deutlich milderen Verlauf bei der heterozygoten rds/+ -Maus, welcher dem Verlauf bei menschlicher RP am nächsten kommt [81]. Außerdem konnte gezeigt werden, daß die Expression von Wildtyp-Peripherin bei der rds/rds-Maus zu einer Reversibilität der klinischen und histopathologischen Veränderungen führt [189].

Somit ergibt sich für die Gruppe der ebenfalls als Nullallele anzusehenden Stopmutationen im humanen Peripherin-Gen als Pathomechanismus am ehesten eine Haploinsuffizienz im heterozygoten Status [107,121]. Diese Annahme wird dadurch bestätigt, daß die bekannten Nonsense-Mutationen im humanen Peripherin-Gen mit einem der rds-Maus ähnlichen Phänotyp einhergehen [107].

Für die anderen Peripherinmutationen (Deletionen, Insertionen und Aminosäureaustausche ohne Veränderungen des Leserahmens) kommt dieser Mechanismus jedoch nicht in Frage. Hier muß von einem komplett translatierten Protein ausgegangen werden, welches neben einem Funktionsverlust, z.B. durch Fehlfaltung, noch eine zusätzliche aktive Schädigung (z.B. durch Akkumulation), genannt Funktionsgewinn, am Photorezeptor hervorruft, die von einer ausgeprägteren klinischen Symptomatik begleitet wird, siehe auch 1.3.4. [107].

Die Veränderungen des Peripherin/rds-Gens bleiben nicht ohne Einfluß auf die anderen intrazellulären Vorgänge der Photorezeptoren. Untersuchungen an der rds-Maus haben ergeben, daß bei fehlender Synthese von Peripherin/rds die Synthese von Opsin anfangs

auf normalem Niveau stattfindet. Dabei wird ein Teil des Opsins in die Plasmamembran der Photorezeptoren integriert. Der größere Teil wird an die Spitze des verbindenden Ciliums transportiert und von dort membrangebunden abgestoßen, woraufhin es zur Phagozytose im Retinalen Pigmentepithel kommt. Die Expression von Opsin-mRNA ist noch bis in späte Stadien der Photorezeptordegeneration nachweisbar, jedoch wird schon früher die Synthese von Opsin eingestellt, ohne daß dieses durch den Verlust der für die Translation zuständigen Organellen zu erklären ist [137].

Interessant ist darüber hinaus die Frage, welcher Mechanismus letztlich zum beobachteten Untergang der Photorezeptoren führt. Einige Vermutungen gehen hierbei in ähnliche Richtungen wie bei Veränderungen im Rhodopsin-Gen, wo vermutet wird, daß aberrante Stoffwechselwege und die unphysiologische Akkumulation von defekten Genprodukten zum Zelluntergang führen [190].

Speziell zur Degeneration von Photorezeptoren bei Veränderungen im Peripherin-Gen wird die Bedeutung von Peripherin für die Entwicklung der Außensegmente in Betracht gezogen. Denkbar ist eine Schädigung der Innensegmente durch Sauerstofftoxizität. Die Außensegmente sind unter physiologischen Bedingungen einem Sauerstoffpartialdruck von 120 mm Hg ausgesetzt, während im Bereich der Innensegmente normalerweise nur noch ein Sauerstoffpartialdruck von 30 mm Hg vorherrscht. Wenn durch Verlust der Außensegmente die Diffusionsstrecke deutlich reduziert wird, werden auch die Innensegmente einem deutlich höheren Sauerstoffgehalt ausgesetzt. Ebenfalls ist ein Verlust an Außensegment-abhängigen trophischen Faktoren ein möglicher Schädigungsmechanismus [190]. Beide Faktoren könnten auch auslösende Faktoren des programmierten Zelltodes sein [198]. An rds-Mäusen wurde nachgewiesen, daß der physiologisch stattfindende programmierte Zelltod nicht regulär nach der 2. Lebenswoche sistiert, sondern als Mechanismus weiterbesteht und so für den Untergang der Photorezeptoren verantwortlich ist. Letztlich nicht kausal geklärt ist die konkrete Verknüpfung zwischen den Peripherin-Mutationen und der Auslösung des programmierten Zelltodes [30, s.a. 1.1.6].

1.3.4 Charakteristika der Peripherin-Mutationen

Mutationen im Peripherin/rds-Gen wurden bei autosomal dominanter und digenischer Retinitis pigmentosa sowie z.B. bei Retinitis punctata albescens, Pattern Dystrophy, Makuladystrophie, Vitelliformer Makuladystrophie, Cone-Rod-Dystrophy, Zentraler Areolarer Chorioideadystrophie, Butterfly Dystrophy und Bulls-Eye-Dystrophy nachgewiesen [8,107]. Neben der damit ausgeprägten interfamiliären Variabilität fällt speziell bei Peripherin eine relativ ausgeprägte intrafamiliäre Variabilität auf [8].

Wie bei Rhodopsin finden sich viele Peripherin-Mutationen nur in einzelnen Stammbäumen, so daß ein breites Spektrum an Mutationen angenommen werden muß [111]. Auffällig im Vergleich zum Rhodopsin-Gen ist eine andere Verteilung auf die verschiedenen Arten von Mutationen. Etwa ein Drittel der gefundenen Mutationen im Peripherin-Gen stellen Nonsense-Substitutionen und Verschiebungen im Leserahmen mit konsekutivem vorzeitigem Stopcodon dar, welche damit Nullallele repräsentieren können. Bei Rhodopsin sind die Mutationen hingegen in großer Mehrheit Missense-Mutationen [111]. Während für einige heterozygote Nullmutationen im Rhodopsin-Gen, z.B. Glu249Stop, keine krankmachende Wirkung nachgewiesen werden konnte, und diese damit allenfalls als Auslöser für rezessive RP in Frage kommen, zeigen sowohl homo- als auch heterozygote rds-Mäuse unterschiedliche Abstufungen einer RP-Symptomatik [125], und auch beim Menschen sind sämtliche heterozygoten Peripherin-Nullmutationen pathogen [102].

Die Mutationen sind grundsätzlich über alle Genabschnitte verteilt, wobei mehr als die Hälfte der bisher gefundenen Mutationen in der 2. Intradiscalen Schleife (i_2) kumuliert. Besonders auffällig ist diese Häufung bei den Missense-Mutationen [107,111]. Auffällig ist ebenfalls das Fehlen von pathogenen Missense-Mutationen in Exon 3. Die Sequenz ist in diesem Bereich möglicherweise weniger anfällig oder kritisch für Mutationen. Hierzu paßt die Häufung von Polymorphismen im dritten Exon. Die drei Polymorphismen Glu304Gln, Lys310Arg und Gly338Asp kommen zusammengekommen in ca. 50% der gesunden Population vor [107].

Sequenzveränderungen im Peripherin-Gen wurden mit der Auslösung von seniler Makuladegeneration (ARMD) in Verbindung gebracht. Anlaß dazu war die Feststellung einer Assoziation von Peripherin/rds-Mutationen und Makuladystrophie [196]. Ein tatsächlicher kausaler Zusammenhang war jedoch nicht zu erhärten [100,168,175].

1.3.5 Klassifikationen der Peripherin-Mutationen

Die Peripherin-Mutationen lassen sich klinisch in drei Gruppen einteilen: Die erste Gruppe (I) tritt unter dem typischen Bild der autosomal dominanten Retinitis pigmentosa mit Befall der peripheren Netzhaut, Nachtblindheit, eingeschränktem Gesichtsfeld und abnormaler Pigmentierung in Erscheinung.

Die zweite Gruppe (II) zeigt einen schweren Verlauf mit besonders ausgeprägtem Befall der zentralen Retina, was zu den klinischen Diagnosen Makula- und Bulls-Eye-Dystrophie und Zentrale Areolare Chorioidea Dystrophie (CACD) führt.

Die dritte Gruppe (III) fällt mit einer abnormalen Akkumulation extrazellulären Materials im retinalen Pigmentepithel in der Makularegion bei häufig nur minimaler Rezeptordysfunktion auf. Der Phänotyp entspricht damit am ehesten dem der rds-Maus. Auch in diesem Fall ist der Erbgang dominant, jedoch sind die Symptome milder, der Symptombeginn später und

es kommt nur zu einem langsamen Fortschreiten der Erkrankung. Die klinischen Diagnosen hierbei sind pattern-type dystrophy, butterfly dystrophy, Retinitis punctata albescens und Vitelliforme Makuladystrophie.

Bei Peripherin läßt sich ein gewisser Zusammenhang zwischen Lokalisation und Art der Mutation einerseits und der ausgelösten Erkrankung andererseits herstellen. Die Mutationen der Gruppe I befinden sich fast ausschließlich in der großen intradiscalen Schleife i_2 , dort mit Häufung in den Codons 210-216. Es handelt sich größtenteils um Missense-Mutationen sowie vier Deletionen (zwei Einzelaminosäuren- und zwei größere Deletionen).

Die Mutationen der Gruppe II sind sämtlich Einzelaminosäurenaustausche oder – deletionen und ebenfalls in der großen i_2 -Schleife lokalisiert. Die spezielle Klinik mit vorwiegend zentralem Netzhautbefall legt die Vermutung unterschiedlicher physiologischer Verhältnisse in zentralen und peripheren Retinaanteilen oder eine unterschiedliche Bedeutung für Zapfen und Stäbchen nahe.

Die Gruppe-III-Mutationen bestehen aus Missense- Mutationen in der i_2 -Schleife und sämtlichen bekannten Nonsense-Mutationen. Damit kommen diese Mutationen den Veränderungen der rds-Maus am nächsten, für die eine instabile Translation mit einem funktionellen Null-Allel festgestellt wurde [107].

1.3.6 Aktuell bekannte Peripherin-Mutationen

Als erste Peripherin-Mutationen wurden 1991 fast zeitgleich zwei Deletionen (Cys118del, Pro119del) und zwei Missense-Mutationen (Pro216Leu, Leu185Pro) beschrieben [53,101].

Die weitere Forschung ergab bisher insgesamt 70 (Stand 1998) Mutationen [107,112].

Sehr zahlreich sind darüber hinaus die Polymorphismen im Peripherin-Gen, mit besonderer Häufung in Exon 3 [111].

Die Polymorphismen im Peripherin-Gen wurden mit der senilen Makuladegeneration in Verbindung gebracht, konnten jedoch nicht als Ursache hierfür gesichert werden [168].

Tabellen (Tab. 4 und 5) mit den bekannten Mutationen und Polymorphismen im Peripherin-Gen befinden sich im Anhang auf den S. A20 und A22 [107,112].

1.4 Therapeutische Ansätze

Es gibt bislang keine kausale Therapie der Retinitis pigmentosa. Jedoch wird schon seit langem mit verschiedenen Methoden versucht, den Krankheitsverlauf positiv zu beeinflussen.

Konventionelle Ansätze arbeiten mit speziellen Diäten oder Supplementierungen von Vitaminen und Spurenelementen [22,98]. Besonders untersucht sind für Retinitis pigmentosa in diesem Zusammenhang die Vitamine A und E, unter der Vorstellung, daß die Gabe von Vitamin A bei reduzierter Vitamin-A-Speicherungsfähigkeit der geschädigten Netzhaut die bestehenden Vorräte an Retinol erhöht und Vitamin E als Antioxidans membranprotektiv an den Außensegmenten wirkt [22,157]. Für die Therapie mit Vitamin A gibt es Studien, die einen positiven Effekt auf den Amplitudenverlust im ERG nachweisen [22], jedoch auch Kritiker, die den tatsächlichen Nutzen für den Patienten nicht gegeben sehen [124]. Die Therapie mit höherdosiertem Vitamin E scheint eher kontraindiziert zu sein, evtl. durch die hierbei gesenkten Retinolspiegel im Plasma [22].

Experimenteller sind Ansätze, die mit Hilfe von trophischen Faktoren wie bFGF (basic fibroblast growth factor), acidic fibroblast growth factor (aFGF), beide teilweise in Kombination mit Heparin, brain-derived neurotrophic factor, ciliary neurotrophic factor (CNTF), Interleukin 1 β (IL-1 β), Neurotrophin 3, insulin-like growth factor II (IGF-II) und Tumornekrosefaktor α (TNF- α) [115] die Schädigung von Photorezeptoren verhindern sollen. Der genaue Schutzmechanismus ist jedoch auch hierbei nicht verstanden. Dabei könnten diese Faktoren entweder direkt in das Auge injiziert werden oder von transfizierten Zellen dort synthetisiert werden [15,117,118]. Durch die Transfektion retinaler Zellen mittels Adenoviren läßt sich ein Wirkspiegel der trophischen Substanzen über längere Zeit aufrechterhalten [29], was sonst nur durch wiederholte Injektion möglich ist [33]. Nur durch die kontinuierliche Anwesenheit von beispielsweise CNTF kommt es zu einer Schutzwirkung auf die Photorezeptoren [29,33].

Bemerkenswert ist, daß in allen Studien mit subretinaler Injektion auch die Injektion der Trägerlösung bzw. die reine Verletzung durch einen Anstich ohne Injektion zu einer beschränkten Rettung von Photorezeptoren führte [49,115]. Daher ist anzunehmen, daß in der Netzhaut selbst produzierte Faktoren das Überleben der Photorezeptoren verbessern, und somit die Injektion von verschiedenen trophischen Faktoren ein vielversprechender Ansatz ist. An einem in-vitro-Modell mit einer Ko-Kultur von Photorezeptoren konnte gezeigt werden, daß von gesunden Netzhautzellen ausgehende Faktoren das Überleben der transgenen Photorezeptoren mit Rhodopsindefekt signifikant verbessern [177].

Daneben werden Ansätze verfolgt, die über die Transplantation von gesunden Zellen die Funktion der defekten ersetzen. Hierbei konnte gezeigt werden, daß im Tiermodell transplantierte Photorezeptoren in die Netzhaut integriert werden und es bei

Transplantation embryonaler Photorezeptoren auch zu einem Langzeitüberleben ohne Abstoßungsreaktion kommt. Nicht möglich war bisher der Nachweis der Ausbildung funktionsfähiger neuraler Verbindungen der transplantierten Photorezeptoren mit den Bipolaren- oder Ganglienzellen [118].

Hinweise auf therapeutischen Nutzen von Netzhautzelltransplantaten wurden dafür bei der Transplantation von Zellen des Retinalen Pigmentepithels (RPE) gefunden, welche die in diesem Tiermodell ausgefallene Phagozytosefunktion des RPE zumindest teilweise ersetzen und damit zu einer Verlangsamung der Progredienz des Funktionsverlustes der Photorezeptoren führte [73]. Auch wenn bei der humanen Retinitis pigmentosa die defekten Gene meist in den Photorezeptoren exprimiert werden, ist eine protektive Wirkung durch Beeinflussung der umliegenden RPE-Zellen denkbar. Außerdem liegt hier eventuell ein therapeutischer Ansatz für verwandte Netzhautdegenerationen wie der senilen Makuladegeneration (ARMD) [118].

Elektrophysiologisch orientierte Therapieansätze zielen darauf ab, die fehlende Stimulation des visuellen Cortex wegen untergehender Photorezeptoren durch eine elektrische Stimulation der Netzhautzellen oder des visuellen Cortex zu ersetzen. Die Verarbeitung der visuellen Daten in elektrische Signale wird bei fortschreitender Computertechnik weniger zum Problem als die mechanisch/biologische Kopplung. Diese kann entweder an der Netzhaut oder am visuellen Cortex ansetzen, hat aber in jedem Fall das Risiko der Infektion und der Narbenbildung mit nachfolgender Funktionsminderung [118].

Als kausaler Therapieansatz wird an einer Gentherapie der genetisch bedingten Netzhauterkrankungen gearbeitet. Es stehen hierfür inzwischen virale Vektoren zur Verfügung, über die DNA spezifisch in Netzhautzellen eingebracht werden kann [15,117]. Jedoch wurde in verschiedenen Tiermodellen festgestellt, daß nicht in jedem Fall die einfache Zugabe eines weiteren Wildtypgens eine Heilung darstellt.

So konnte an der rds-Maus festgestellt werden, daß durch zusätzliche Expression des Wildtyp-Gens eine vollständige Rückbildung der klinischen Symptomatik und des histologischen Befundes zu erreichen ist. Dies ist am ehesten durch die Kompensation der hier durch Nullallele entstehenden Geninsuffizienz zu erklären, zumal die Entwicklung normaler Photorezeptoren mit dem Ausmaß der Expression des Wildtyppallels korreliert [2,189]. Umgekehrt entwickeln transgene Mäuse mit der Expression zweier Wildtyp-Allele Rhodopsin und eines mutierten Rhodopsin-Allels eine Photorezeptordegeneration. Somit besteht hierbei der Pathomechanismus in einem Funktionsgewinn des mutierten Allels, so daß die einfache Zugabe von Wildtyppallelen nicht ausreicht [45].

Im Falle der dominanten Retinitis pigmentosa, wo ebenfalls von einem dominant-negativen Effekt der Mutationen ausgegangen wird, sind als Optionen in der Gentherapie eine

Antisense-, Antigen- oder Ribozymtherapie denkbar, durch die der negative Effekt der Mutation ausgeglichen bzw. verhindert werden könnte [117]. Die Effektivität solcher Ansätze wurde bereits an anderen Genen untersucht, und es zeigte sich, daß die Expression von Genen verändert und fast vollständig supprimiert werden kann [41,110,116,145,149,185]. Derzeit stehen für solche Experimente als sichere Vektoren vor allem Adenoviren zur Verfügung, die den Nachteil einer zeitlich begrenzten Genexpression haben, da das Genom nicht in die DNA der Wirtszelle integriert wird. Als Alternative hierzu wird an Lentiviren als Vektoren gearbeitet, die durch Reverse Transkriptase in der Lage sind, genetisches Material dauerhaft im Genom der Wirtszelle zu verankern [6,128]. Da es sich bei den Lentiviren um Abkömmlinge der HI-Viren handelt, stehen hier noch Sicherheitsbedenken vor der Anwendung in klinischen Studien [6], auch wenn die grundsätzliche Eignung zur Transfektion von Photorezeptoren bereits im Tiermodell erwiesen ist [128].

Insgesamt zeigen die Mutationen jedoch eine große Bandbreite, die eine sehr spezifische Therapie mit dem abgestimmten Transgen erfordern würde, so daß bei dem derzeitigen Aufwand für die Generierung solcher Gene dies als therapeutischer Ansatz sicher noch nicht realistisch ist [117].

Um diesem Problem auszuweichen, gibt es in der Gentherapie noch einen Ansatz, der durch Genexpression, beispielsweise von bcl-2, die Apoptose verhindert oder reduziert und so an der gemeinsamen pathophysiologischen Endstrecke der verschiedenen Gendefekte ansetzt. Hierbei konnte für die Expression von bcl-2 ein protektiver Effekt auf Netzhautzellen von Mäusen mit Defekten im Phosphodiesterase- β - sowie im rds-Gen nachgewiesen werden [16,138].

Zusammenfassend bleibt in der derzeitigen Therapie der Retinitis pigmentosa im wesentlichen eine beratende Funktion des behandelnden Arztes, einmal im Hinblick auf die Prognose des einzelnen Patienten, wo die molekulargenetische Forschung hoffentlich weitere Präzision ermöglichen wird, und zum zweiten im Hinblick auf die bei einer genetischen Erkrankung erforderliche Beratung in Fragen der Vererblichkeit.

Eine Beratung des Patienten ist ebenfalls wichtig, um den Patienten vor unwissenschaftlichen Therapieansätzen zu schützen, die neben einer nicht nachweisbaren Wirksamkeit das Risiko von Folgeschäden haben, welche eine spätere Therapiemöglichkeit verhindern können [195]. Als Beispiel sei die sogenannte Kuba-Therapie genannt, die mit elektrischer Stimulation, Transfusion von Ozon-angereichertem Eigenblut und Augenchirurgie den Krankheitsverlauf stoppen oder sogar rückgängig machen will. Die wissenschaftliche Auswertung dieser Therapie zeigt keinen Vorteil für die Patienten und möglicherweise sogar eine Verschlechterung durch die Therapie [20].

Therapeutisch kann eine Supplementierung mit Vitamin A versucht werden, für die eine gewisse Wirksamkeit [22] sowie Therapiesicherheit [171] nachgewiesen wurden. Ebenso wird von Augenärzten ein UV-Schutz durch abdunkelnde Gläser empfohlen [201]. Alle anderen Therapieformen befinden sich noch im experimentellen Stadium und sind allenfalls im Rahmen von Therapiestudien zu sehen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, in pro-analyse-Qualität

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt
KCl	Merck, Darmstadt
MgCl ₂	Merck, Darmstadt
Gelatine	Merck, Darmstadt
ultra-Pure-Agarose	Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA
MetaPhor-Agarose	Biozym, Hameln
Seakem-Agarose GTG	Biozym, Oldendorf
Ethidiumbromid, 10 mg/ml Fertiglösung (1%)	Serva, Heidelberg
Borsäure	Merck, Darmstadt
Ethylendinitrilotetraessigsäure (Titriplex III oder EDTA)	Merck, Darmstadt
Stammlösung Rotiphorese Gel 30 (30% Acrylamid mit 0,8% Bisacrylamid)	Roth, Karlsruhe
Glycerin, wasserfrei	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamid (Temed)	Sigma Chemical Comp., St. Louis, Mo., USA
Formamid, dehydriert	Sigma, USA
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Xylencyanol	Serva, Heidelberg
Ficoll 400	Pharmacia, Freiburg
Ethanol, 96% DAB 10	Apotheke, UKE
Methanol, reinst	Apotheke, UKE
Salpetersäure 65%	Merck, Darmstadt
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Formaldehyd, 37%	Merck, Darmstadt
Essigsäure, 100%	Merck, Darmstadt
Paraffinöl	Apotheke, UKE
Chloroform	Apotheke, UKE
Isopropanolol	Apotheke, UKE

Aqua destillata	wurde über eine Filteranlage des UKE hergestellt; für PCR-Ansätze wurde destilliertes Wasser (für Injektionszwecke) aus der Apotheke des UKE verwendet
Sequenase-Reaktionspuffer (200mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM MgCl ₂ , 250 mM NaCl)	United States Biochemical, Cleveland, Ohio, USA
Dithiothreitol (DTT) 0,1M	United States Biochemical, USA
Sequenase-Stopplösung (95% Formamid, 20 mM EDTA, 0,05% Bromphenolblau, 0,05% Xylencyanol)	United States Biochemical, USA
Denaturierendes Acrylamid-Gel (Gel-Mix® 6)	Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA
Puffer H1 (JETQUICK DNA Clean Up Spin Kit)	Genomed, Bad Oeynhausen
Puffer H2 (JETQUICK DNA Clean Up Spin Kit)	Genomed, Bad Oeynhausen
Terminator Ready Reaction Mix (dNTPs, ddNTPs, Taq-Polymerase, Puffer)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Kaliumacetat 3M, pH 5,6	Apotheke, UKE
Template Suppression Reagent (TSR)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

2.1.2 Nucleotide (Desoxynucleotide und Didesoxynukleotide)

Desoxyadenosin-5'-triphosphat (dATP)	Pharmacia, Freiburg
Desoxycytosin-5'-triphosphat (dCTP)	Pharmacia, Freiburg
Desoxyguanosin-5'-triphosphat (dGTP)	Pharmacia, Freiburg
Desoxythymidin-5'-triphosphat (dTTP)	Pharmacia, Freiburg
³⁵ S-Desoxyadenosin-5'-triphosphat (³⁵ S-dATP)	United States Biochemical, USA
Labeling-Mix (dCTP, dGTP, dTTP)	United States Biochemical, USA
Didesoxyadenosin-5'-triphosphat (ddATP)-Term.-Mix	United States Biochemical, USA
Didesoxycytosin-5'-triphosphat (ddCTP)-Term.-Mix	United States Biochemical, USA
Didesoxyguanosin-5'-triphosphat (ddGTP)-Term.-Mix	United States Biochemical, USA
Didesoxythymidin-5'-triphosphat (ddTTP)-Term.-Mix	United States Biochemical, USA

2.1.3 Enzyme

Taq-Polymerase (5 U/μl)	Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA
-------------------------	-------------------------------------

T7-Bakteriophagen-DNA-Polymerase
(Sequenase Version 2.0)

United States Biochemical, USA

Restriktionsendonukleasen

Tsp509 I

New England Biolabs, Inc., USA

Aci I

New England Biolabs, Inc., USA

Bfa I

New England Biolabs, Inc., USA

BssS I

New England Biolabs, Inc., USA

BstX I

New England Biolabs, Inc., USA

2.1.4 DNA-Molekulargewichts-Marker

pBR 322, Msp I-verdaut

Boehringer, Mannheim

(Fragmente von 622, 527, 404, 309,
242, 238, 217, 201, 190, 180, 160,
147, 123, 110, 90, 76 und 67 Bp)

2.1.5 Geräte

Thermocycler

DNA Thermal Cycler 48

Perkin-Elmer, Wellesley, MA,
USA

Omnigene Temperature Cycler

Hybaid, England

Gene Amp 9600 Thermocycler

Perkin-Elmer, Wellesley, MA,
USA

Gelkammern

Elektrophorese-Einrichtung für Polyacrylamidgel
(incl. Glasplatten, Kämme, Spacer) Modell S2

Gibco BRL, Gaithersburg, MD,
USA

Elektrophorese-Einrichtung für Agarosegele
(incl. Gelschlitten, Kämme)

Sigma-Aldrich, St. Louis, MO,
USA

Spannungsquelle

Electrophoresis Power Supply ST 305

Gibco BRL, Gaithersburg, MD,
USA

UV-Tischleuchte

UV-Kontaktlampe Chroma 43, 320 nm (Mittelwelle)

Zentrifuge

Tischzentrifuge 5415C

Eppendorf, Hamburg

Mischer

Reax 2000 Schüttler

Heidolph, Schwabach

Magnetthermorührer

2.1.6 Sonstige Materialien

0,5ml-PCR-Caps	Eppendorf, Hamburg
1,5 ml-Caps	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Scotch Electrical Tape	3M, USA
Glasschalen 35cm x 45,7cm x 2,5cm (feuerfest)	Schott, Mainz
Frischhaltefolie	
Silikon-Spray	
Plastikfolie zum Einschweißen	

2.2 Patientenkollektiv

Untersucht wurden DNA-Proben von 19 nicht blutsverwandten Patienten aus Dänemark sowie 26 nicht blutsverwandten Patienten aus dem Kollektiv des Instituts für Humangenetik in Hamburg/Eppendorf.

Die dänischen Patienten wurden über die Statens Ijenklinik (Prof. Dr. T. Rosenberg) vermittelt. Bei ihnen war klinisch die Diagnose einer Retinitis pigmentosa gestellt worden. Aus den Familienanamnesen ergab sich ein autosomal dominanter Erbgang. Bei diesen Patienten wurden die Gene für Rhodopsin und Peripherin/rds untersucht.

Die Patienten des Instituts für Humangenetik in Hamburg waren von verschiedenen Augenärzten bzw. Augenkliniken mit den Diagnosen adRP, Stargardt's disease, Astigmatismus sowie V.a. Peripherin-Mutation zugewiesen worden. Nach genetischer Beratung hatten sie einer Testung zugestimmt. Bei einem Teil dieser Patienten (10/26) wurde nur das Peripherin/rds-Gen untersucht, da bei einigen die klinische Diagnose eine Rhodopsin-Veränderung unwahrscheinlich machte und andere bereits auf Rhodopsin-Veränderungen untersucht waren. Das Screening der anderen 16 Patienten wurde in Teilen von einer anderen Doktorandin durchgeführt, von mir wurden die Exons Rhodopsin R I.1, R I.2, R II sowie Peripherin P I.1 und P I.2 untersucht.

Bei Patienten mit nachgewiesenen Mutationen wurde DNA von Familienangehörigen mituntersucht, insbesondere bei der nicht zuvor beschriebenen Mutation, sowie bei Fragen nach bislang asymptomatischem Trägerstatus.

2.3 DNA-Isolierung

Von den dänischen Patienten wurde von der Statens Ijenklinik fertig präparierte DNA eingesandt. Den Patienten des Instituts für Humangenetik wurde hier venöses Blut abgenommen, von Mitarbeitern des Labors nach Standardmethoden DNA aus Leukozyten isoliert.

Da von den dänischen Patienten nur eine begrenzte Menge an DNA-Stocklösung vorlag, wurde auf eine Konzentrationsmessung verzichtet und in zwei Verdünnungen mit Aqua destillata (insgesamt 1:6) eine geschätzte Konzentration von 100 ng/μl erreicht. Die Ergebnisse der Verdünnung wurden durch vergleichende Auftragung auf Agarose-Gel (s.u.) untersucht.

Bei den Proben des Instituts für Humangenetik wurden die DNA-Konzentrationen photometrisch bestimmt und anschließend eine Verdünnung mit Aqua destillata auf eine Konzentration von 100 ng/μl durchgeführt.

Die verdünnten Arbeitslösungen wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert, während die Stocklösungen bei –20 °C tiefgefroren wurden.

2.4 Polymerase Ketten-Reaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)

2.4.1 Planung der PCR-SSCP-Untersuchung

2.4.1.1 Rhodopsin

Von beiden untersuchten Genen ist die genomische Sequenz bekannt. Das Rhodopsin-Gen besteht aus 5 Exons mit Längen von 360, 169, 165, 239 und 107 Bp (abgekürzt mit R I bis R V), die von vier Introns mit 1783, 1205, 116 und 833 Bp Länge getrennt werden [136].

Da die komplette Sequenz inklusive der nicht-kodierenden Abschnitte bekannt ist, konnte auf Primer im Intronbereich zurückgegriffen werden, die die jeweiligen Exons komplett umfassen und die Splice-Stellen mit abbilden. Bei einer Länge von 360 Bp hätte das erste Exon nach Amplifikation ein DNA-Segment von 558 Bp Länge ergeben, was die Sensitivität der SSCP-Untersuchung reduziert hätte. Daher wurde das erste Exon geteilt amplifiziert, so daß zwei Exonteile (R I.1 und R I.2) entstanden. Die dazugehörigen innerhalb des Exons gelegenen Primer wurden so gewählt, daß die beiden Anteile einander überlappen und eine lückenlose Abbildung des Exons ermöglichen. Bei Fragmentlängen von maximal 349 Bp inkl. Primer konnten die Exons II - V jeweils als Ganzes amplifiziert werden. Es ergeben sich nach Amplifikation rechnerisch Fragmentlängen von:

Exon R I.1: 281 Basenpaaren

Exon R I.2 : 327 Basenpaaren

Exon R II: 290 Basenpaaren

Exon R III: 273 Basenpaaren

Exon R IV: 349 Basenpaaren

Exon R V: 242 Basenpaaren

2.4.1.2 Peripherin/rds

Das Peripherin/rds-Gen besteht demgegenüber aus 3 Exons mit 581, 247 und 213 Bp Länge, welche von 2 Introns unbekannter Länge unterbrochen werden [101,188]. Da auch hier die an die Exons angrenzenden Intronanteile bekannt sind, konnten Primer im Intronbereich gewählt werden, die die gesamten Exonbereiche einschließlich der Splice-Stellen umfassen. Hier wurde ebenfalls das erste Exon bei einer Länge von mind. 620 Bp nach Amplifikation inklusive Primer in zwei Teilen amplifiziert (P I.1 und P I.2). Exon P II und P III ergaben in der Amplifikation deutlich geringere Längen, so daß sie in einem Stück amplifiziert werden konnten. Die Fragmente haben damit Längen von:

Exon P I.1: 325 Bp

Exon P I.2: 404 Bp

Exon P II: 312 Bp

Exon P III: 295 Bp

2.4.2 Prinzip der PCR

Die Polymerase Chain Reaction ist ein Verfahren zur selektiven in-vitro-Vermehrung (Amplifikation) bestimmter DNA-Abschnitte. Mit Hilfe von Primern wird aus genomischer DNA ein Abschnitt definiert, der durch Polymerasen kopiert wird. Durch wiederholte selektive Amplifikation entsteht eine große Menge des definierten Abschnitts [132,163], die vielfältige weitere Untersuchungen erlaubt.

Einen wesentlichen Fortschritt für die Nutzung brachte die Einführung der thermostabilen Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* [162], die den Vorgang wesentlich vereinfachte und so zur umfangreichen Nutzung der PCR-Methode beitrug.

Die Reagenzien im PCR-Ansatz sind genomische DNA, zwei Primer (ein 5'- und ein 3'-Primer), die vier Desoxynukleotid-Triphosphate (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) sowie das Enzym Taq-DNA-Polymerase in wäßriger Lösung. Die Amplifikation geschieht in 30 - 40 Temperaturzyklen, die bei definierten Temperaturen bestimmte Abläufe optimal ablaufen lassen.

Im ersten Schritt wird über eine Erhitzung eine Denaturierung der Doppelstrang-DNA mit Aufteilung in Einzelstränge erreicht. An die entstandenen Einzelstränge binden sich nach Abkühlung die Primer an die spezifischen Bereiche des Sense- und Antisense-Stranges (zweiter Schritt, Hybridisierung, Annealing). In einem dritten Schritt synthetisiert die Taq-DNA-Polymerase ausgehend von den Primern aus den Desoxynukleotiden neue Komplementärstränge. Diese neuentstandenen Doppelstränge werden im nächsten Denaturierungsschritt wieder getrennt. Sie bilden neben der genomischen DNA die Matrize für den nächsten Zyklus und so die Grundlage für die prozentuale Spezifizierung und

exponentielle Zunahme des spezifischen DNA-Segments. Eine schematische Abbildung (Abb. 8) zur Veranschaulichung findet sich auf S. A23 des Anhangs.

Dieser Zyklus wird 30 - 40 mal durchlaufen und erreicht so eine Amplifikation des spezifischen Segmentes um den Faktor 10^6 [162].

2.4.3 Materialien

Die benötigten Materialien sind unter 2.1 tabellarisch zusammengefasst. Im einzelnen zu erwähnen sind:

2.4.3.1 Primer

Primer sind Oligonukleotide mit vorgegebener Sequenz, die passend zu dem gewünschten Abschnitt des Komplementärstrangs in vitro synthetisiert werden. Dabei ist darauf zu achten, daß sie eine für den entsprechenden Genabschnitt spezifische Komplementärsequenz enthalten.

Die für die PCR verwendeten Primer haben in der Regel eine Länge von 20 - 25 Nukleotiden und sind spezifisch für den Sense- bzw. Antisense-Strang. Da die Taq-Polymerasen in 5'→3'-Richtung arbeitet, werden die Primer jeweils komplementär zu Sequenzen am 3'-Ende des gewünschten Genabschnitts gewählt.

Bei der Auswahl der Primer ist ein relativ ausgewogenes Verhältnis von GC zu AT zu beachten: Da die G-C-Bindung über drei gegenüber zwei Wasserstoffbrücken bei der A-T-Bindung verläuft, stellt sie die stabilere Verbindung dar. Dies hat Auswirkungen auf die Schmelzpunkte der Primer: GC-reiche Primer haben einen höheren Schmelzpunkt als AT-reiche. Daher liegt die Annealing-Temperatur höher und die Spezifität der Bindung ist gesteigert. Umgekehrt ist die Dissoziation der Primer im Denaturierungsschritt erschwert, und ein zu hoher GC-Anteil kann zu einer unspezifischen Bindung an GC-reiche DNA-Sequenzen führen.

Die Amplifikation erfolgte mit den folgenden Primern:

Rhodopsin

Exon R I.1:	F (AG1)	(5'-AGCTCAGGCCTTCGCAGCAT-3') und
	R (MK1)	(5'-CTTCGACGCGTGCGGAGAGT-3')
Exon R I.2:	F (MK2)	(5'-CCTCACGCTCTACGTCACCG-3') und
	R (AG2)	(5'-GTTACAATAGGTTTCGGGAG-3')
Exon R II:	F (2F)	(5'-GAGTGCACCCTCCTTAGGCA-3') und
	R (2R)	(5'-CATCCCAGGAGGTCAGTCCT-3')
Exon R III:	F (3/4 F)	(5'-CTGTTCCCAAGTCCCTCACA-3') und
	R (MK3R)	(5'-CCAGGTCGGGGGTCGTACGT-3')

Exon R IV:	F (MK4F)	(5'-GCCATGGTCTGGACCCGGGT-3') und
	R (3/4 R)	(5'-TTCCTGTTCGATGAGGGTCC-3')
Exon R V:	F (V F)	(5'-TCACTAACGTGCCAGTTCCA-3') und
	R (VIII)	(5'-GGGGATGTGGAAGGGGGTTCG-3')
Peripherin		
Exon P I.1:	F	(5'-AGCTGTGCTGTGGGAAGCAA-3') und
	R(6)	(5'-TTCCATCTGGCATACTTGGC-3')
Exon P I.2:	F3B	(5'-TGCTATCCTGTGTCTTCAAC-3') und
	RInt I	(5'-TCTGACCCCAGGACTGGAAG-3')
Exon P II:	FInt I	(5'-AAGCCCATCTCCAGCTGTCT-3') und
	RInt II	(5'-TTACCCTCTACCCCCAGCTG-3')
Exon P III:	F(3)	(5'-AGATTGCCTCTAAATCTCCTCT-3') und
	R(3)	(5'-GGAGTGCACTATTTCTCAGT-3')

Die Primer wurden im Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie (Prof. Dr. K. Richter) synthetisiert und auf eine Konzentration von 20 pmol/μl verdünnt.

2.4.3.2 Desoxynukleotide (dNTP)

Als Substrat für die Kettenverlängerung wurden die vier Basen Adenosin, Cytosin, Guanosin und Thymin in der Form als Desoxynukleotide eingesetzt. Diese verfügen an den Zuckerresten mit 2 Hydroxygruppen über zwei Bindungsstellen, die dann jeweils über Phosphat-Gruppen miteinander verbunden werden können.

Die Basen wurden zu einem dNTP-Mix (10 mM) gemischt, der die vier Desoxynukleotide dATP, dCTP, dGTP, dTTP in jeweils 10 mM-Konzentration enthielt.

2.4.3.3 Taq-Polymerase

DNA-Polymerasen sind ubiquitär in replikationsfähigen Zellen vorkommende Enzyme mit der Fähigkeit, Desoxynukleotide komplementär zu einem DNA-Einzelstrang miteinander zu verbinden. Voraussetzung für diese Synthesereaktion ist das Vorhandensein eines zumindest kurzstreckigen Komplementärstranges, der dann von der Polymerase in 5'-3'-Richtung verlängert wird. Diese Funktion wird durch die Primer wahrgenommen.

Als Proteine werden die meisten DNA-Polymerasen bei Temperaturen über 50-60 °C denaturiert und verlieren damit ihre Enzymaktivität. Die hier beschriebene PCR-Methode wurde durch die Verwendung von synthetisch hergestellter DNA-Polymerase thermophiler Bakterien (*Thermus aquaticus*) möglich, die natürlich in heißen Quellen vorkommen. Ihre DNA-Polymerase ist den heißen Umgebungstemperaturen angepasst und hält daher

Temperaturen bis ca. 95 °C ohne Denaturierung und folgenden Aktivitätsverlust stand [162].

2.4.3.4 Cetus Puffer

Cetus Puffer bestimmt ein geeignetes Milieu für die PCR-Reaktion. Er wurde in zehnfacher Konzentration auf Vorrat gemischt und autoklaviert und konnte dann bis zur Benutzung portionsweise tiefgefroren gelagert werden. Zur Herstellung wurden

500 mM KCl

15 mM MgCl₂

0,01% Gelatine und

100 mM Tris-HCl (pH 8,3) ad

Aqua destillata

eingesetzt.

2.4.4 Durchführung der PCR

2.4.4.1 PCR-Ansatz

Für einen 25 µl-PCR-Ansatz wurden in sterilen 0,5 ml-PCR-Caps eingesetzt:

100 ng genomische DNA (1 µl der Arbeitslösung mit 100 ng/µl),

2 Primer je 200 mM (je 0,5µl einer Primer-Verdünnung mit 20pg/µl),

100 µM dNTPs (0,5 µl des dNTP-Mixes),

5 mM Tris-HCl (pH 8.3), 25 mM KCl, 0,75 mM MgCl₂, 0,0005% Gelatine (2,5 µl des oben beschreibenden 10 x Cetus-Puffers),

0,5 U Taq-Polymerase (0,1 µl der GIBCO-BRL-Taq-Polymerase),

Aqua destillata ad 25 µl

Zur Vermeidung von Verdunstung während der Thermocyclen wurde der Ansatz mit 2 Tropfen Paraffinöl überschichtet.

2.4.4.2 PCR-Programm

Als Temperaturen für die verschiedenen Schritte haben sich 94 °C für die Denaturierung, 50-60 °C für die Hybridisierung und 72 °C für die Extension bewährt.

Die Denaturierungstemperatur ergibt sich aus der Hitzestabilität der Taq-DNA-Polymerase und wurde bei 94 °C gewählt [162].

Die günstigste Temperatur für die Hybridisierung (Annealing) der Primer an die Einzelstrang-DNA wurde experimentell für das jeweilige Exon ermittelt. Hierbei führt eine niedrigere Annealingtemperatur zu leichterem Bindung, jedoch auch eher zu unspezifischer Bindung an nicht vollständig korrekte Abschnitte. Eine hohe Annealingtemperatur sichert

weitgehend spezifische PCR-Produkte, führt jedoch auch häufiger zu deutlich reduzierter Amplifikation. Einen Kompromiß stellt die Verwendung verschiedener Annealingtemperaturen dar, wobei zunächst die hohen Annealingtemperaturen für eine Amplifikation und das Überwiegen spezifischen Ausgangsprodukts sorgen und anschließend niedrigere Annealingtemperaturen eine stärkere Expansion des Produktes bewirken (Touch-Down-PCR) [39].

Die Extensionstemperatur liegt mit 72 °C im Bereich des Arbeitsoptimums der Taq-Polymerase [162].

Für jedes Exon wurden die optimalen Bedingungen durch Probe-PCR und Testung der Ergebnisse auf Agarose-Gel (s. 2.6) ermittelt. Für sämtliche Exons von Peripherin (P I.1, P I.2, P II, und P III) ergaben sich einheitlich gute Ergebnisse bei Standardbedingungen:

Initiale Denaturierung:	94 °C	5 Minuten
Extensionszyklen:	Denat.	94 °C
	Annealing	60 °C
	Extension	72 °C
		2 Minuten (+ 3 sec.)
Letzter Extensionsschritt	72 °C	10 Minuten

Es wurden standardmäßig 30 Zyklen gefahren, wobei jeweils die Extensionszeit um 3 Sekunden verlängert wurde, um einen evtl. Wirkungsverlust der Taq-Polymerase zu kompensieren.

Bei Rhodopsin wurden zunächst die Standardbedingungen des Labors angewendet:

Initiale Denaturierung	94 °C	5 Minuten
30 Extensionszyklen	Denat.	94 °C
	Annealing	60 °C
	Extension	72 °C
		30 Sekunden (+ 2 sec.)
Letzter Extensionsschritt	72 °C	10 Minuten

Da dieser Standard anfangs bei einigen, später bei einer zunehmenden Anzahl von Proben unbefriedigende Ergebnisse lieferte, wurde in erneuten Versuchsreihen ein Touch-Down-Programm ermittelt, das bei Annealingtemperaturen zwischen 60 und 63 °C bessere Ergebnisse brachte:

Initiale Denaturierung		94,5 °C	3 Minuten
2 Extensionszyklen	Denat.	94,5 °C	20 Sekunden
	Annealing	63 °C	20 Sekunden
	Extension	72 °C	40 Sekunden (+ 2 Sek)
3 Extensionszyklen	Denat.	94,5 °C	20 Sekunden
	Annealing	62 °C	20 Sekunden
	Extension	72 °C	40 Sekunden (+ 2 Sek)
30 Extensionszyklen	Denat.	94,5 °C	20 Sekunden
	Annealing	61 °C	20 Sekunden
	Extension	72 °C	40 Sekunden (+ 2 Sek)
Letzter Extensionsschritt		72 °C	10 Minuten

Für die weitere Verarbeitung des PCR-Produktes wurde die Paraffinschicht belassen und die benötigten Mengen PCR-Produkt unter Durchstechung der Schicht abpipettiert.

2.4.5 Kontrolle der PCR-Amplifikation auf Agarose-Gel

2.4.5.1 Material

Als Elektrophoresepuffer wurde für Agarose-Gele und SSCP-Gele ein Gemisch aus Tris, Borsäure und EDTA in zunächst 10facher Konzentration hergestellt, das für die Anwendung als Puffer oder in der Herstellung der Gele dann auf 1x Konzentration verdünnt wurde.

10x TBE (Vorratslösung, Angaben pro Liter) enthält: 108 g Tris-Base, 55 g Borsäure, 7,4 g EDTA (pH 8,3), Aqua dest. ad 1 l. Die Substanzen wurden auf dem Magnetrührer vollständig gelöst. Die Vorratslösung wurde jeweils für ca. 4 Wochen angesetzt, da sie in der hohen Konzentration leicht ausfällt. Der mit Aqua dest. verdünnte 1x TBE-Puffer enthält dann folgende Konzentrationen: 90 mM Tris-Borat, 4 mM EDTA (pH 8,3).

Die Proben wurden vor der Elektrophorese mit einem Ficoll-Probenpuffer, bestehend aus 15% Ficoll, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol in 1x TBE, gemischt.

2.4.5.2 Herstellung eines 1% Agarose-Gels

1,3 g Agarose (MetaPhor-Agarose) wurden in 130 ml 1x TBE gelöst und in der Mikrowelle aufgeköcht. Während des Abkühlvorgangs wurde bei etwa 60 °C 1 µg Ethidiumbromid/ml Gel zugegeben. Bei 50 °C wurde die Gelmasse in den Gelschlitten einer Hoefer-Kammer gegossen und es wurden Kämme eingesetzt. Diese ergaben nach Erkalten und Verfestigung Geltaschen, in die das Untersuchungsmaterial pipettiert werden konnte.

2.4.5.3 Durchführung der Elektrophorese

5 µl des zu untersuchenden PCR-Produktes wurden auf Mikrotiterplatten mit je 3 µl Ficollpuffer gemischt.

Das Gel wurde waagrecht in die Gelkammer eingesetzt und 1x TBE-Puffer bis zur vollständigen Bedeckung aufgefüllt. Anschließend wurde das Gemisch aus PCR-Produkt und Ficollpuffer in die Geltaschen pipettiert. Zum Vergleich der Konzentrationen und zur Bestimmung der Fragmentlängen wurde als Marker enzymverdaute DNA (pBR 322, Msp I-verdaut) bekannter Konzentration mit definierten Längen der Einzelfragmente (siehe 2.1.4), ebenfalls mit Ficoll-Puffer gemischt, aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 100 V über 1 h in horizontaler Richtung.

Das im Gel verarbeitete Ethidiumbromid verbindet sich mit der DNA und fluoresziert unter UV-Licht. Damit läßt sich das Elektrophoreseergebnis auf einer UV-Tischleuchte beurteilen und mittels Photographie oder Videoausdruck dokumentieren. Es wurde dabei auf die Schärfe der Banden als Ausdruck der Spezifität und auf die Intensität der Banden als Ausdruck der erreichten Amplifikation geachtet. Im Vergleich zum verwendeten Marker, pBR 322, konnte die Länge der Fragmente und die erreichte Konzentration des PCR-Produktes abgeschätzt werden. Bei schwachem, aber spezifischen PCR-Produkt wurde dieses teilweise durch den Einsatz von mehr Produkt in der anschließenden SSCP-Untersuchung ausgeglichen.

2.5 Single Strand Conformation Polymorphism-Analyse (SSCP)

2.5.1 Prinzip

Bei der Single Strand Conformation Polymorphism-Analyse werden Fragmente doppelsträngiger DNA in Einzelstränge aufgetrennt und im Rahmen einer nichtdenaturierenden Gelelektrophorese untersucht. Dabei nehmen die DNA-Einzelstränge eine Sekundärstruktur an, die neben der Fragmentlänge über ihr Laufverhalten auf dem Gel (Mobility) entscheidet. Diese Sekundärstruktur wird beeinflußt durch die Basenabfolge der DNA-Sequenz. Somit wirken sich Veränderungen dieser Abfolge, z.B. auch bereits Einzelbasenaustausche, in einem verschiedenen Elektrophoreseverhalten (Mobility Shift) aus und ermöglichen die Erkennung einer Veränderung der Basensequenz. Da spezifische Veränderungen der Basensequenz mit typischen Veränderungen des Laufverhaltens einhergehen, lassen sich aus typischen Laufmustern Vermutungen über die zugrundeliegende Veränderung ableiten [76]. Zur Veranschaulichung siehe Abbildung 9 im Anhang auf Seite A24.

Diese Methode wurde erstmalig 1989 von Orita und Mitarbeitern beschrieben als diagnostische Ergänzung zur zuvor etablierten PCR-Methode oder zur Untersuchung

größerer, in Zelllinien amplifizierter DNA-Fragmente nach enzymatischer Verdauung [142,143]. Dabei erfolgte die Darstellung der DNA-Stränge im Gel mittels radioaktiver Markierung. Im Jahr 1991 wurde die Methode durch die Einführung der DNA-Silberfärbung deutlich vereinfacht [1,31].

Im gleichen Jahr wurde ein Zugewinn an Sensitivität bei der Untersuchung auch der Heteroduplices beschrieben. Hierbei handelt es sich um Zusammenlagerungen normaler und aberranter DNA-Einzelstrangfragmente. Diese können durch die andere dreidimensionale Struktur ein anderes Laufverhalten als die Homoduplex-Stränge der normalen und mutierten DNA zeigen und damit eine Doppelbande im Bereich der doppelsträngigen DNA auf dem Gel bilden [108,197].

Die Konformation der Einzelstränge im Gel hängt außer von der Basensequenz auch noch vom Gleichgewicht zwischen den schwachen lokal stabilisierenden Kräften und der umgebenden thermischen Energie ab [143]. Die Ergebnisse der Elektrophorese und das Auftrennungsverhalten werden daher noch von verschiedenen Faktoren mitbestimmt:

1. Ionenstärke, beeinflusst durch die TBE-Konzentration im Elektrophoresesystem
2. Temperatur, beeinflusst durch die Raumtemperatur sowie die Spannung und Stromstärke, die eine Erwärmung des Gels hervorrufen
3. Glycerol, beeinflusst durch seine leicht reduzierenden Eigenschaften das Elektrophoreseverhalten [142]

Bei meinen Untersuchungen habe ich den TBE-Puffer zunächst 1x konzentriert verwendet. Bei Schwierigkeiten mit der Schärfe von Banden erfolgte ein Versuch mit 0,5 x TBE [172], wodurch gute Ergebnisse erzielt wurden, so daß diese Konzentration weiterverwendet wurde. Es wurden alle Proben und Exons ohne Glycerol und mit 10 bzw. 5% Glycerol (entsprechend der TBE-Konzentration) zur Nutzung der Unterschiede verschiedener Bedingungen untersucht. Die Untersuchungen erfolgten einheitlich bei Raumtemperatur.

2.5.2 Durchführung der SSCP-Analyse

2.5.2.1 Material

Die Einzelmaterialien sind in der Materialliste 2.1 aufgeführt, es soll hier nur kurz die Zusammensetzung der daraus hergestellten Puffer bzw. Gele zusammengefasst werden.

Formamid-Probenpuffer, nicht-denaturierend: 95% deionisiertes Formamid, 20 mM EDTA (pH 7,5 eingestellt mit Essigsäure), 0,05% Bromphenolblau, 0,05% Xylencyanol.

Elektrophoresepuffer: 1x TBE (siehe 2.4.5.1)

10% APS: 1 g Ammoniumpersulfat (APS) mit 9 ml Aqua dest. Ansatz für jeweils 2 Wochen

6% Polyacrylamid-Gel (1x TBE, 0,8 mm Dicke): 6% Polyacrylamid, 1x TBE, (90 mM Tris-Borat, pH 8,3, 4 mM EDTA), pro 150 ml Gelansatz 1 ml 10% APS und 35 µl Temed.

Die entsprechende Konzentration des Polyacrylamid wurde durch die Verdünnung von Rotiphorese 30 Gel (30% Acrylamid-Stammlösung mit 0,8% Bisacrylamid, entsprechend einem Verhältnis von Acrylamid/Bisacrylamid von 37,5:1) erzielt. 1x TBE wurde aus 10 x TBE durch Verdünnung mit Aqua dest. hergestellt. Für die 0,5x TBE-Gele wurde entsprechend eine andere Verdünnung des TBE gewählt.

Zur Herstellung der Gele mit 5 bzw. 10 % Glycerol wurde entsprechend pro 150 ml Gelansatz 7,5 bzw 15 ml Glycerol zugegeben und der Anteil an Aqua dest. bei der Verdünnung des TBE reduziert.

2.5.2.2 Herstellung der Gele

Die Gelelektrophorese wurde in senkrechten Elektrophoresekammern der Firma Gibco BRL (S2) durchgeführt. Hierfür wurde das PAA-Gel zwischen 2 Glasplatten der Größen 33 x 42 x 0,4 cm und 33 x 40 x 0,4 cm gegossen. An der späteren Oberkante bildete die größere Platte die Vorderseite der oberen Pufferkammer und ermöglichte durch Füllung der Kammer bis über den Rand der kleineren Platte den Kontakt des Puffers mit dem Gel.

Vor dem Gießen des Gels wurden die Platten mit 70% Ethanol und Aqua dest. gereinigt. Die angestrebte Dicke von 0,8 mm wurde durch seitlich zwischengelegte Abstandhalter (Spacer) erreicht, über denen Klammern zur Fixierung angebracht wurden. Die spätere untere Öffnung wurde anfangs mit Scotch Electrical Tape abgeklebt, im Verlauf zeigte sich, daß bei vollständig wagerechter Lagerung der Glasplatten die Kapillarkräfte ausreichen, um das gleichmäßige Vollsaugen des Zwischenraumes und den Halt des Gels zu gewährleisten. Die Glasplatten wurden so gelagert, daß die größere Platte unten lag.

Die Gelmixtur wurde mit Ausnahme des Temed und des APS mit Hilfe eines Magnetrührers gemischt. Mit der Zugabe der fehlenden Substanzen begann der Polymerisationsvorgang, so daß das Gelgemisch in den folgenden 5 bis 10 Minuten verarbeitet werden mußte. Das flüssige Gel wurde langsam auf die untere vorstehende Glasplatte gegossen und sog sich durch Kapillarkräfte zwischen die Platten. Eventuell auftretende Luftblasen wurden mit Hilfe eines dünneren Spacers (0,4 mm) entfernt. Zur Bildung der Geltaschen wurde an der asymmetrischen Seite ein Kamm mit 32 Zähnen und einer Dicke von 0,8 mm eingesetzt. Anschließend wurde mittels Klammern auch an dieser Stelle ein Kontakt zwischen Platten und Spacer und damit eine definierte Gelstärke von 0,8 mm erreicht.

Der Polymerisationsvorgang war nach 1,5 bis 2 Stunden abgeschlossen, so daß die Klammern und der Kamm entfernt werden konnten. Die seitlichen Spacer wurden belassen, die entstandene Gelkammer mitsamt den Glasplatten in die Elektrophoresekammer eingespannt. Die Ränder der oberen Pufferkammer mit den

Glasplatten wurden mittels Agarosegel abgedichtet, um einen Übertritt des oberen Puffers zu vermeiden. Anschließend wurden die Pufferkammern mit 1x bzw. 0,5x TBE gefüllt. Mittels einer großlumigen Pipette wurden die Taschen des Gels von Resten nicht vollständig polymerisierten Gels gereinigt.

2.5.2.3 Nichtdenaturierende Gelelektrophorese

Für die Auftrennung in Einzelstränge wurden 7-15 µl PCR-Produkt mit 7 µl Formamid-Probenpuffer gemischt, in sterilen Caps für 5 Minuten bei 95% denaturiert und bis zum Auftragen auf das Polyacrylamidgel auf Eis gekühlt, um eine erneute Aggregation der Einzelstränge zu vermeiden. Neben den Proben wurde jeweils ein Längenmarker (pBR 322, Msp I-verdaut) aufgetragen, um später die Korrektheit der amplifizierten Fragmentlängen nochmals überprüfen zu können.

Unter Anlegen einer Spannung von 25 Volt wurde bei 8-35 Watt über 6-19 Stunden eine elektrophoretische Auftrennung bei einer Laufrichtung von oben nach unten über eine Strecke von ca. 25-35 cm erreicht. Anhand der Farbstoffe im Formamid-Probenpuffer konnte das Fortschreiten der Elektrophorese beobachtet werden. Da das Xylencyanol in der Gelelektrophorese auf 6% PAA-Gel eine Laufgeschwindigkeit im Bereich eines Doppelstrangfragmentes von ca. 230 Bp zeigt [139], konnte hieraus die Laufgeschwindigkeit der Doppelstrangfragmente der amplifizierten Exons abgeschätzt werden. Diese sind in der Elektrophorese nativ nicht sichtbar. Die Einzelstränge zeigen aufgrund der Beeinflussung des Laufverhaltens über ihre 3-D-Konformation eine langsamere Migration als die Doppelstränge und laufen dementsprechend deutlich langsamer als die sichtbaren Banden der Farbstoffe. Es wurde angestrebt, die Xylencyanolbande möglichst vollständig über das Gel laufen zu lassen, um eine maximale Auftrennung der Banden der zu untersuchenden Fragmente zu erzielen.

Es wurde dann die Elektrophorese beendet, die Gelkammer der Glasplatten mit dem Gel aus der Elektrophoresevorrichtung entnommen und die kleinere Glasplatte vorsichtig abgehoben. Anschließend konnten die Spacer entfernt werden. Das Gel wurde nach vorsichtiger Lösung der Ränder in die vorbereitete Glasschale mit der 10%-Ethanollösung für die Silberfärbung überführt.

2.5.3 Silberfärbung

2.5.3.1 Prinzip

Wie bereits oben beschrieben, wurde die Silberfärbung als Alternative zur Radioaktivitätsmarkierung entwickelt. Dabei macht man sich die Eigenschaft des Silbernitrates zunutze, sich an die Einzelstrang- und Doppelstrang-DNA anzulagern. In einem zweiten Schritt wird dann das Silbernitrat zu elementarem Silber reduziert, wodurch die Banden sichtbar werden. Unter Sichtkontrolle wird dieser Vorgang solange fortgesetzt, bis das an DNA angelagerte Silbernitrat in einem ausreichenden Maß reduziert und sichtbar ist. Bevor die Hintergrundfärbung zu intensiv wird, erfolgt ein Fixierungsschritt, mit dem die weitere Reduktion gestoppt wird.

Eine alternative Färbung der DNA-Einzelstränge mittels Ethidiumbromid, wie bei der Kontrolle der PCR-Produkte beschrieben, ist kaum möglich, da die Fluoreszenz des Ethidiumbromid an Einzelstrang-DNA um den Faktor 5-10 geringer ist als an Doppelstrang-DNA [139]. Somit wäre eine sehr große DNA-Menge erforderlich, bei der dann wiederum die Auftrennung in Einzelstränge an Grenzen stößt, da es nach Hitzedenaturierung trotz sofortiger Eiskühlung zu einer Rekombination des größten Teils der Einzelstränge käme [167].

2.5.3.2 Färbungsprotokoll

Die Färbung der SSCP-Gele erfolgte einheitlich nach dem Protokoll von Budowle et al. [26]:

1. Fixierung der DNA: 5 Minuten in 10% Ethanol
2. Oxidierung: 3 Minuten in 1% Salpetersäure
3. Wässerung: 2-3 mal für 30-60 sec. in Aqua dest.
4. Silberfärbung: 20 Minuten in 0,012 M Silbernitratlösung
5. Wässerung: 2-3 mal für 30-60 sec. in Aqua dest. Hierbei soll das nicht gebundene Silbernitrat möglichst vollständig entfernt werden.
6. Entwicklung (Reduzierung): Nach Sicht in einer Lösung mit 0,28 M Natriumcarbonat und 0,019% Formalin (29,6 g NaCO_3 und 540 μl Formalin pro l). Die Lösung muß meist einmal zwischendurch gewechselt werden, wenn sich Präzipitate aus molekularem Silber bildeten, um ein Festsetzen der Präzipitate auf dem Gel zu verhindern. Beim Erreichen der gewünschten Intensität der Anfärbung wird dieser Prozeß durch den nächsten Schritt beendet.
7. Fixierung (Stopplösung): 5 Minuten in 10% Essigsäure.
8. Wässerung: 2-3 mal für 30-60 sec. in Aqua dest.

Damit ist der Färbeprozess abgeschlossen und das Gel kann getrocknet oder in Plastikfolie eingeschweißt werden, womit eine gewisse Lagerungsfähigkeit erreicht wird und die Auswertung und Fotographierbarkeit erhalten bleiben. Im Verlauf zeigt sich ein leichtes Abblässen der Farbtintensität.

2.5.3.3 Praktische Durchführung der Silberfärbung

Die Färbung erfolgte in flachen Glasschalen, die während des gesamten Vorgangs auf einem Laborschüttler bewegt wurden, um ein Festkleben der sehr rissigen Gele zu verhindern und einen gleichmäßigen Kontakt des Gels mit den Reagenzien sicherzustellen. Zum Austausch der Lösungen wurde die Schale jeweils leicht gekippt und die Lösung mittels einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Nach Anfärbung der Banden wurde das Gel in eine endgültige Größe gebracht und in Folie verschweißt. Die Dokumentation erfolgte durch Photographie auf dem Lichtschirm, die eingeschweißten Gele wurden archiviert.

Die Silbernitratlösung sowie der Entwickler wurden gesondert für die Entsorgung gesammelt.

2.6 Sequenzierung

Es wurden im Verlauf der Arbeit zwei verschiedene Verfahren zur Sequenzierung der in SSCP-Analysen auffälligen Proben angewandt. Anfangs wurde nach der von Sanger et al. 1977 beschriebenen manuellen Methode einer asymmetrischen PCR mit definierten Kettenabbrüchen und Nachweis über radioaktive Markierung gearbeitet [165]. Später ging ich zu einer Form der automatischen Sequenzierung (Cycle Sequencing) über, die zunächst nach Vorarbeiten in unserem Labor noch im Pette-Institut durchgeführt wurde, später direkt im Institut für Humangenetik möglich war.

Mit beiden Methoden kann die genaue DNA-Sequenz von Genabschnitten einschließlich heterozygoter Veränderungen bestimmt werden.

2.6.1 Prinzip der manuellen Sequenzierung

Die enzymatische Sequenzierung nach Sanger beruht primär auf einem ähnlichen Prinzip wie der einzelne PCR-Zyklus. Mit Hilfe eines Primers und einer DNA-Polymerase wird ein Komplementär-DNA-Strang synthetisiert. Als Vorlage dient dabei zuvor synthetisierte Einzelstrang-DNA des zu untersuchenden Fragmentes. An Bausteinen werden neben den 4 Desoxynukleotiden (dNTPs) ein kleiner Anteil eines Didesoxynukleotids (z.B. ddATP) eingesetzt, das mit dem entsprechenden Desoxynukleotid um den Einbau konkurriert. Bei Einbau des ddNTP kommt es durch die fehlende 3'-Hydroxyl-Gruppe an der Einbaustelle zum Kettenabbruch, der über die Länge der synthetisierten Kette die Position des eingebauten ddNTP definiert.

Die genaue Längenbestimmung erfolgt durch die Auftragung auf ein hochprozentiges, denaturierendes PAA-Gel. Die Sichtbarmachung erfolgt dabei sehr präzise durch radioaktive Markierung eines Desoxynukleotids und anschließende autoradiographische Abbildung. In einer Gelspur finden sich dann Markierungen, die den Längen bis zum Auftreten eines bestimmten Nukleotids entsprechen. Durch die Auftragung der Reaktionsansätze für die vier Didesoxynukleotide auf benachbarten Gelspuren kann für jede Position der Sequenz das dort vorliegende Nukleotid abgelesen werden [75,165].

2.6.1.1 Material

Das erforderliche Material ist in der allgemeinen Materialliste aufgeführt. Außer den gängigen PCR-Komponenten werden je ein Didesoxynukleotid und radioaktiv markiertes ³⁵S-dATP eingesetzt, als Polymerase wird eine genetisch modifizierte Bakteriophagen T7 DNA-Polymerase verwendet, deren 3'-5'-Exonukleaseaktivität vollständig supprimiert ist. Der TE-Puffer wurde aus 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) und 1 mM EDTA (pH 8,0) ad Aqua dest. hergestellt.

2.6.1.2 Einzelstrang-PCR

Eine wesentliche Vorbereitung für die Sequenzierungsreaktion ist die Herstellung geeigneter Einzelstrang-DNA als Vorlage für die Komplementärstrangbildung. Das Prinzip der Einzelstrang-PCR liegt in einem Mengenverhältnis der eingesetzten Primer von 50:1. So wird zu einem sehr überwiegenden Anteil der vom höher konzentriert eingesetzten Primer definierte Strang amplifiziert. Zu jedem zu untersuchenden Genabschnitt wurden Einzelstrang-PCRs und nachfolgende Sequenzierungen für beide Stränge bzw. Syntheserichtungen durchgeführt. Als Vorlage für die Einzelstrang-PCR wurde gereinigtes PCR-Produkt des zu sequenzierenden Abschnittes verwendet. Es wurden für die Aufreinigung 30 µl des Doppelstrang-PCR-Produkts mit 10 µl Ficoll-Puffer auf ein 2% Agarose-Gel (Seakem) aufgetragen und bei 90 V über 1,5 Stunden aufgetrennt. Es wurde dann der Bereich der spezifischen Bande des Gels herausgeschnitten und die DNA über Nacht in 120-150 µl TE-Lösung aus dem Gel extrahiert. Von der gewonnenen DNA-Lösung wurden 10 µl in dem folgenden Einzelstrang-PCR-Ansatz eingesetzt:

10 µl DNA-Lösung
10 µl Cetus-Puffer
2,5 µl dNTP-Mix
2 µl Primer 1
0,4 µl des 1:10 verdünnten Primer 2
75 µl Aqua dest.
0,5 µl Taq-Polymerase

Die PCR wurde mit den für den Genabschnitt ermittelten günstigsten PCR-Bedingungen (siehe 2.4.4.2), allerdings jeweils über 40 Extensionszyklen, durchgeführt, das PCR-Produkt wie unter 2.4.5 beschrieben getestet.

2.6.1.3 Aufreinigung der Einzelstrang-PCR-Produkte

Das Einzelstrang-PCR-Produkt wurde durch Spülung mit verschiedenen Substanzen gereinigt, ehe es für die Sequenzierungsreaktion weiterverwendet wurde.

Die gesamten 100 µl des Einzelstrangproduktes wurden in sterile Eppendorf 1,5 ml Caps überführt und 200 µl eines 24:1 Gemisches Chloroform/Isopropanolol zugegeben. Das Gemisch wurde 2 Minuten bei 1000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Dabei blieb das PCR-Produkt in einer oberen Phase über dem Chloroform und wurde abpipettiert in Centricon 100 Filterröhrchen. Nach Zugabe von 400 µl TE wurde das Gemisch über 15 Minuten bei 2500 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen. Es folgte die nochmalige Zugabe von 400 µl TE und anschließende Zentrifugation über 10 Minuten bei 2300 Umdrehungen/Minute. Dieser Vorgang wurde nochmals mit Aqua dest. wiederholt. Dann wurde geprüft, ob ein Überstand von ca. 50 µl im Filter verblieben war, ggf. nachzentrifugiert. Der Überstand wurde durch umgekehrtes Aufsetzen des Filters auf neue sterile Eppendorf-Caps und Zentrifugieren (5 Minuten bei 2000 Umdrehungen/Minute) überführt.

2.6.1.4 Sequenzivorgang

Für die Sequenzierungsreaktion standen fertige Sequenase®-Version 2.0-Kits der Firma United States Biochemical zur Verfügung. Die Durchführung erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers und soll hier nur kurz dargestellt werden. Die Reaktionen wurden in Standard-Laborheizblöcken in einem speziell für die Arbeit mit leicht radioaktiven Stoffen ausgelegten Raum inkl. entsprechender Abschirmung und Möglichkeit zur vorschriftsgemäßen Entsorgung durchgeführt. Das Mischen der Reaktionsansätze erfolgte durch mehrfaches Aufziehen mit der Pipette. Nach Erwärmung erfolgte jeweils eine kurze Zentrifugation zur Rückführung des Produktes.

Annealing

Hierzu wurden in einem Eppendorf-Cap 7 µl des aufgereinigten Einzelstrang-PCR-Produkts mit 1 µl des entsprechenden Primers und 2 µl des Reaktionspuffers aus dem Kit gemischt und für 10 Minuten im vorgeheizten Heizblock auf 65 °C erwärmt. Anschließend erfolgte die langsame Abkühlung auf Raumtemperatur über 10 bis 30 Minuten und der Ansatz wurde bis zur Weiterverwendung auf Eis gelagert.

Labeling

Zu den 10 µl des Annealing-Mixes wurden 1 µl DTT, 2 µl des verdünnten Labeling-Mixes (dCTP, dGTP, dTTP) und 0,5 µl des ³⁵S-markierten dATP hinzugefügt und gemischt. Als letztes wurde zum Start der Reaktion 2 µl der verdünnten Sequenase hinzugefügt und für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Terminationsreaktion

Schon vor dem Beginn der Labelingreaktion wurden 4 entsprechend markierte Caps mit je 2,5 µl von respektive ddATP-, ddCTP-, ddGTP- und ddTTP-Termination-Mix vorbereitet und bei geschlossenem Deckel mind. 1 Minute bei 37 °C erwärmt.

Nach Ablauf der geplanten Labelingreaktionsdauer wurden je 3,5 µl des Labeling-Mixes an die Wände der vier Terminationsreaktionsröhrchen pipettiert, durch Zentrifugation vermischt, die Inkubation bei 37 °C noch genau 5 Minuten fortgesetzt und dann durch Zugabe von 4 µl der Stoplösung nach der gleichen Methode beendet. Nach dem sorgfältigen Durchmischen wurden die Caps bis zur Elektrophorese auf Eis gelagert, teilweise über bis zu 7 Tage bei –20 °C tiefgefroren.

2.6.1.5 Auswertung auf Sequenziergel durch Autoradiographie

Für die denaturierende Gelelektrophorese der Sequenzierprodukte wurde eine fertige Gelmischung der Firma Gibco BRL (Gel-Mix® 6) verwendet. Analog zur Vorbereitung der Gelkammern für die SSCP-Analyse (siehe 2.5.2.2) wurden die Glasplatten mit Ethanol 70% und Aqua dest. gereinigt, anschließend zusätzlich mit Silikonspray bearbeitet, um die Haftung des einreißgefährdeten Gels zu reduzieren. Mittels zweier seitlich angebrachter Spacer von 0,4 mm Dicke wurde ein gleichmäßiger Plattenabstand erreicht, die spätere untere Öffnung wurde mit Klebeband abgedichtet. Der Polymerisationsvorgang in der Gelmischung wurde nach Herstellerangaben durch Zugabe von 0,45 ml 10%-iger Ammoniumpersulfatlösung gestartet, das Gel dann in den folgenden 10 Minuten zwischen die Platten gegossen. Eine weitgehend gleichmäßige Füllung wurde über Kapillarkräfte erreicht, evtl. Luftblasen wurden durch vorsichtiges Beklopfen der Platten entfernt. Anschließend wurden in der oberen Öffnung einseitig glatte Kämme mit 4 mm Dicke zur Formung einer glatten Gelkante angebracht. Vor der Elektrophorese wurden die Kämme umgedreht, so daß die andere, gezackte Seite der Kämme gerade zum Aufsitzen auf der Gelkante kam und so definierte Kammern oberhalb des Gels entstanden.

Die Elektrophorese erfolgte in Analogie zur SSCP-Analyse in Gibco BRL (S2) Gelkammern mit 1x TBE. Ca. eine Stunde vor Beginn der Elektrophorese wurde ein Vorlauf mit Auftragung von SSCP-Puffer in die Gelkammern gestartet, um eine Vorerwärmung des Geles zu gewährleisten und evtl. verzerrende Spuren im Vorfeld zu erkennen und in der anschließenden Elektrophorese zu vermeiden. Hierzu wurde das fertige tiefgekühlte Sequenzierprodukt für 2 Minuten bei 80 °C denaturiert und anschließend 2-3 µl in jede

Geltasche aufgetragen. Es wurden immer die vier basenspezifischen Ansätze auf benachbarten Gelspuren aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 50 W über 1-4 Stunden entsprechend der Fragmentlänge.

Anschließend wurde das Gel in eine Glaswanne überführt und 15 Minuten mit 10%-iger Essigsäure gespült, um den Harnstoff aus dem Gel zu entfernen. Nach Absaugen der Essigsäure wurde das Gel auf Plotting-Papier überführt und oben mit Frischhaltefolie abgedeckt. So wurde es auf einem vorgeheizten Trockner bei 60 °C und Unterdruck über 1 Stunde getrocknet.

Das getrocknete Gel wurde im dunklen Raum mit einem Röntgenfilm in einer Röntgenkassette überlagert und der Röntgenfilm so exponiert. Nach einer Expositionszeit von ca. 24 Stunden erfolgte die automatische Entwicklung des Röntgenbildes in einem konventionellen Entwickler.

Anschließend konnten die Sequenzen direkt auf dem Film abgelesen werden. Die Basensequenz wurde mit der Wildtyp-Sequenz abgeglichen, um Veränderungen zu erkennen. Heterozygote Veränderungen zeigten sich dabei durch das Vorliegen zweier Banden an der gleichen Position.

2.6.2 Prinzip der automatischen Sequenzierung

Beim Cycle Sequencing erfolgt die Synthesereaktion nicht wie beim Sanger-Verfahren einmalig, sondern wie bei der konventionellen PCR in 20-30 Zyklen. Dadurch wird deutlich weniger Ausgangsmaterial für die Reaktion benötigt und durch die starke Amplifikation kann auch doppelsträngige DNA als Matrix eingesetzt werden.

Mit Hilfe eines Primers wird durch die Taq-Polymerase ein DNA-Strang synthetisiert. Dabei werden wie bei der Sanger-Methode mit Hilfe von ddNTP Strangabbrüche erzielt, durch die Nukleotidpositionen definiert werden. Durch die Markierung der ddNTPs mit verschiedenfarbigen Fluoreszenzfarbstoffen kann die gesamte Reaktion in einem Ansatz gefahren werden. Die anschließende Gelelektrophorese läßt sich dann automatisiert photometrisch auswerten, so daß das Endergebnis direkt am Computer angezeigt werden kann [7,75,150].

2.6.2.1 Material

Das Material für die automatische Sequenzierung ist in der Liste 2.1 aufgeführt. Es wurde für die Sequenzierungs-PCR der fertige Reaktions-Mix der Firma ABI Prism verwendet, der mit Taq-Polymerase arbeitet.

2.6.2.2 Vorbereitung/Aufreinigung des PCR-Produktes

Als Matrix für die Sequenzierungs-PCR kann Doppelstrang-PCR-Produkt des betreffenden Genabschnitts verwendet werden. Durch den eingesetzten Primer wird dann die Sequenzierungs-Richtung bestimmt. Es wurde nach den zuvor beschriebenen Ansätzen mit den für die betreffenden Exons optimalen PCR-Bedingungen ein doppelter PCR-Ansatz (50 µl) hergestellt.

Für die Aufreinigung der PCR-Produkte wurde ein Reinigungs-Kit der Firma Genomed verwandt. Das gesamte PCR-Produkt wurde mit 100 µl H1-Puffer in Filtersäulen auf sterile 1,5 ml-Caps überführt. Das Gemisch wurde eine Minute auf maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert. Anschließend wurden 700 µl H2-Puffer zugegeben und erneut bei Maximaldrehzahl zentrifugiert. Der Filter wurde auf ein neues Eppendorf-Cap gesetzt, durch Zugabe von 30 µl Aqua dest. und Zentrifugation wurde das im Filter haftende PCR-Produkt in die neuen Caps überführt.

2.6.2.3 Durchführung der Sequenzierung

Von dem so gereinigten PCR-Produkt wurden 3 µl in dem folgenden Cycle-Sequencing-Ansatz als Matrix eingesetzt:

3 µl gereinigtes PCR-Produkt

4 µl Terminator-Ready-Reaction-Mix

0,8 µl Primer

2,2 µl Aqua dest.

Dieser wurde in speziellen Perkin-Elmer-Caps gemischt, nicht überschichtet und im Perkin-Elmer Gene Amp 9600 Thermocycler nach dem folgenden Protokoll prozessiert:

Denaturierung	96 °C	10 Sekunden	
Annealing	50 °C	5 Sekunden	25 Zyklen
Extension	60 °C	4 Minuten	

Anschließend erfolgte im Thermocycler die Abkühlung auf 4 °C, in der das Produkt bis zur weiteren Verarbeitung gehalten wurde.

2.6.2.4 Aufreinigung des Cycle Sequencing-Produktes

Es folgte eine Aufreinigung, um einen Überschuß an nicht-verarbeiteten Reagenzien zu entfernen. Das gesamte Cycle-Sequencing-Produkt wurde mit 5 µl 3-molarem Kaliumacetat (pH 5,6), 260 µl 95% Ethanol und 40 µl Aqua dest. gemischt, 10 Minuten auf Eis gelagert und anschließend 30 Minuten mit maximaler Drehzahl zentrifugiert. Damit wurde das Produkt gefällt und lagerte sich an der Außenseite der Caps ab. Das Ethanol/Kaliumacetat-Gemisch wurde unter Schonung des teilweise sichtbaren Niederschlags abpipettiert. Der Niederschlag wurde dann nochmals mit 400 µl 70% Ethanol gespült, das nach Mischen und Zentrifugieren wieder vorsichtig abpipettiert wurde.

Verbleibende Ethanolreste an den Wänden des Reaktionsgefäßes wurden mit einem Papiertuch vorsichtig entfernt, der Niederschlag anschließend durch Erwärmung der offenen Caps in einem Heizblock getrocknet.

Der getrocknete Niederschlag wurde mit 20 µl TSR gelöst und in spezielle Caps mit Gummistopfen überführt, die bis zur Durchführung der automatischen Elektrophorese und photometrischen Auswertung im Kühlschrank (7 °C) gelagert werden konnten.

2.6.2.5 Auswertung der automatischen Sequenzierung

Die elektrophoretische Auftrennung und photometrische Auswertung der mit Farbstoff markierten Proben erfolgte vollautomatisch in Sequenziergeräten der Firma ABI Prism. Die Ausgabe erfolgte als Datei mit graphischer Auftragung der an den verschiedenen Positionen gemessenen Basen als verschiedenfarbige Wellen sowie Nukleotidzuordnung durch den Computer. Die ausgegebene Sequenz und die Wellenverläufe wurden dann nochmals mit der Wildtypsequenz verglichen. Heterozygote Veränderungen stellten sich dabei als Doppelwellen der betreffenden Nukleotidfarben dar, die jeweils weniger ausgeprägte Intensität zeigten.

2.7 Restriktionsverdau

2.7.1 Prinzip

Die Bestätigung der gefundenen Veränderungen erfolgte durch Restriktionsverdau der Genabschnitte mit sequenzspezifischen Restriktionsendonukleasen. Die Endonukleasen erkennen spezifische Sequenzabschnitte von 4-8 Bp und schneiden die Doppelstrang-DNA im Bereich oder nahe der Erkennungssequenz. Sie wurden mit Hilfe einer geeigneten Software so ausgewählt, dass durch die Veränderung der Basensequenz eine Schnittstelle hinzukam bzw. verloren ging. Im Vergleich des Verdau der Wildtyp-Sequenz mit dem Verdau der vermuteten Mutation zeigte sich dann bei Bestätigung ein verändertes Bandenmuster in der Gelelektrophorese. Zur Überprüfung der Schnittstelle wurde jeweils ein Längenmarker (pBR322) mit aufgetragen, die Fragmentlängen abgeschätzt und mit den anhand der Sequenz und des Schneidemustes berechneten Fragmentlängen verglichen.

Familienuntersuchungen zur Feststellung der Verbreitung konnten dann anhand der beim Indexfall bekannten Mutation durch PCR, Enzymverdau und elektrophoretische Darstellung ohne vorherige Screeningmaßnahmen oder erneute Sequenzierung erfolgen.

2.7.2 Durchführung

Für den Enzymverdau wurde das reguläre PCR-Produkt des betreffenden Exons verwendet. Es wurde ein Reaktionansatz nach den Vorgaben des Herstellers für optimale Arbeitsbedingungen des Enzyms vorbereitet. Dazu wurde jeweils zum Enzym ein Reaktionspuffer mitgeliefert. Der folgende Ansatz wurde in 1,5 ml-Caps zusammengestellt:

40 µl PCR-Produkt

5 µl 10x Reaktionspuffer (im Set vom Hersteller mitgeliefert)

2 U Restriktionsendonuklease (0,4 µl der gelieferten Konzentration von 5 U/µl)

Aqua dest. ad 50 µl

Nach guter Mischung wurde das Cap in einen auf die optimale Arbeitstemperatur des Enzyms vorgeheizten Wärmeblock gesetzt und der Ansatz über 2 Stunden verdaut. Nach einer Stunde wurde wegen der nachlassenden Enzymaktivität nochmals 1 U der Endonuklease zugegeben. Eine chemische Beendigung des Verdaus war bei nachlassender Enzymaktivität nicht nötig, die anschließende Lagerung bei 4 °C führte darüber hinaus zu einem vollständigen Sistieren der Enzymaktivität.

Das Ergebnis des Verdaus wurde wie unter 2.4.5 beschrieben auf Agarose-Gel getestet. Es wurden der Umfang des Verdaus und die Konzentration der DNA für die nachfolgende gelelektrophoretische Darstellung beurteilt. Diese erfolgte meist auf hochauflösenden MetaPhor-Agarose-Gelen (1x TBE, 1 µg/ml Ethidiumbromid) unter Verwendung des Längenmarkers pBR322 bei 100 V über 2-4 Stunden, gelegentlich wurde ein PAA-Gel (6%, 1x TBE) wie für die SSCP, jedoch ohne vorherige Denaturierung, zur noch besseren Auftrennung eingesetzt. Das Ergebnis der Agarose-Gelelektrophorese wurde photographisch unter Durchleuchtung mit UV-Licht dokumentiert, die eingeschweißten PAA-Gele wurden unter normaler Durchleuchtung photographiert.

3. Ergebnisse

3.1 Gefundene Veränderungen im Rhodopsin-Gen

In den SSCP-Analysen wurden jeweils alle 19 Proben dänischer Patienten gemeinsam aufgetragen und dienten damit gleichzeitig als Referenz für das normale Bandenmuster. Analog wurde mit den 16 Proben aus dem Institut für Humangenetik verfahren. In Exons mit bekanntermaßen vielen verschiedenartigen Laufmustern wurden teilweise Proben mit bekannten Polymorphismen mit aufgetragen, um diese bereits in der SSCP-Analyse zu identifizieren. Jede Probe wurde für jedes Exon unter 2 Gelbedingungen untersucht, mit und ohne Glycerin (siehe 2.5).

Es waren insgesamt 12 Proben auffällig bzw. nicht den bekannten Bandenmustern für die entsprechenden Exons zugehörig. Einige Proben fielen dabei in zwei verschiedenen Exons auf, so daß insgesamt 15 Auffälligkeiten in verschiedenen Exons auftraten. Davon waren 8 eindeutig vom bekannten Bandenmuster verschieden, bei 7 weiteren waren auf einzelnen Gelen sehr diskrete Veränderungen zu sehen, es erfolgte bei fraglicher Bedeutung die Sequenzierung.

Die Sequenzierung der auffälligen Proben erbrachte den Nachweis von 2 Mutationen mit Aminosäurenaustausch sowie 4 Polymorphismen.

3.1.1 Rhodopsin-Mutationen

3.1.1.1 Thr17Met

Aufgrund einer auffälligen Bandendoppelung im Bereich der Einzelstränge des Exons R I.1 (siehe Abb. 10) sowie einer Heteroduplexbildung im Bereich der Doppelstränge unter der anderen Elektrophoresebedingung (nicht abgebildet) wurde die Probe A427 in beiden Richtungen sequenziert.

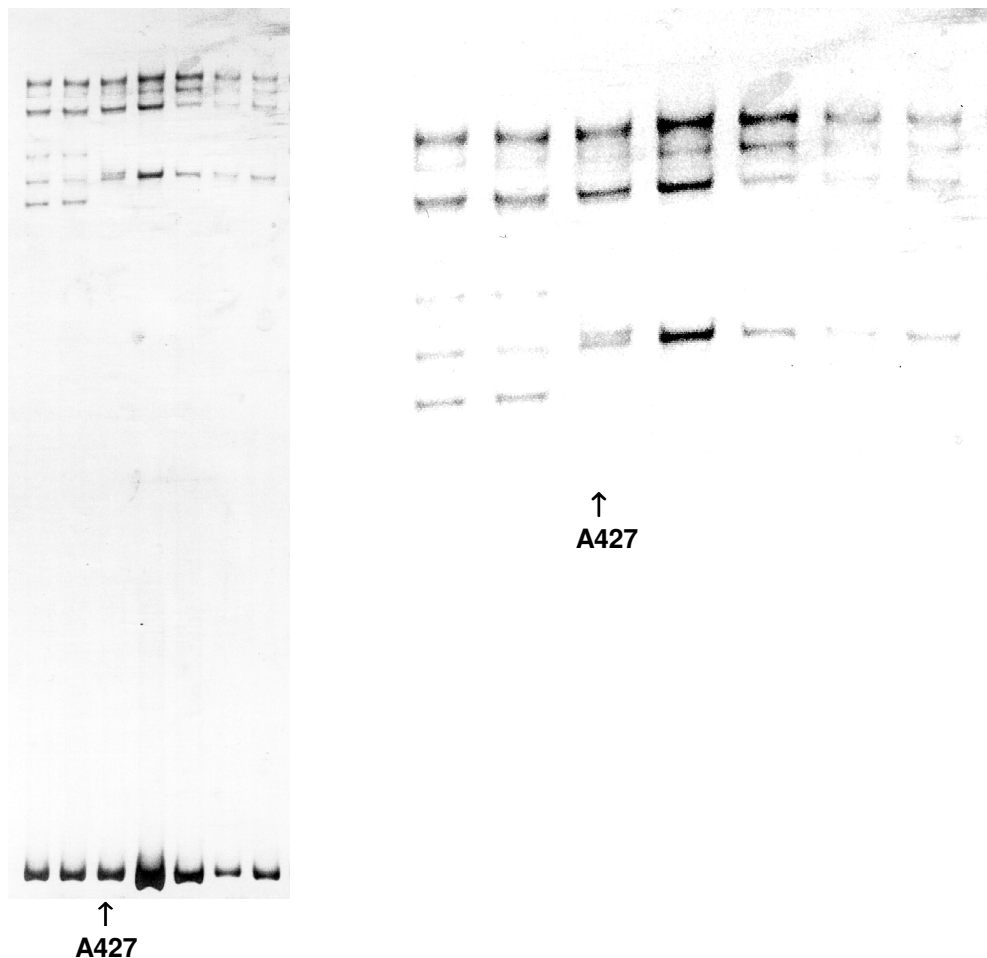


Abb. 10: SSCP-Muster von Exon R I.1; markiert ist die Probe A427, links gesamtes Gel, rechts Vergrößerung der Einzelstränge

Die Sequenzierung zeigte in beiden Strängen übereinstimmend an Basenpaar 344 eine Veränderung mit gleichzeitigem Nachweis von Cytosin und Thymin im F-Strang sowie von Guanin und Adenin im R-Strang, passend zu einer heterozygoten Veränderung (siehe Abbildung 11).

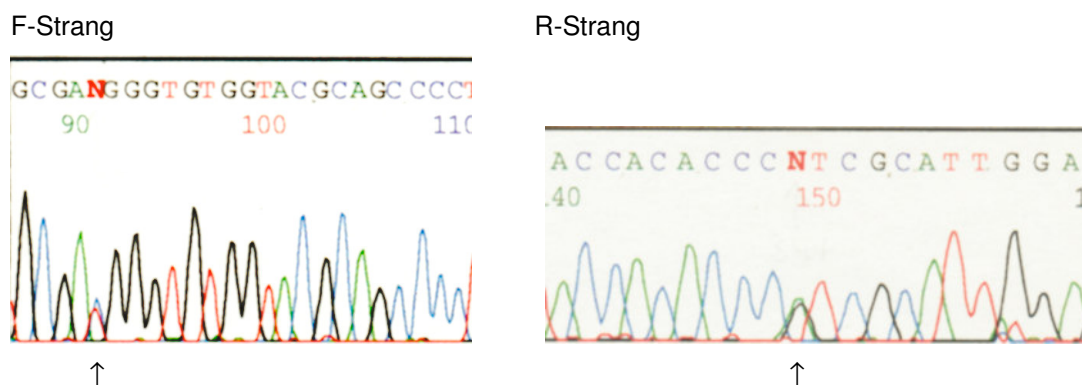


Abb. 11: Darstellung der Basensequenz um g.344, Exon R I.1 für die Probe A427 mit der heterozygoten Mutation g.344C→T mit der Cycle Sequencing Methode; Markierung auf dem veränderten Nukleotid

Diese Veränderung der Basensequenz verändert das 17. Triplet der codierenden Sequenz heterozygot von ACG (Threonin) nach ATG (Methionin) und führt so zum Aminosäureaustausch Thr17Met, eine von Sung et al. 1991 beschriebene Mutation des Rhodopsin-Gens [180].

Zur Bestätigung des Sequenzierungsergebnisses wurde mit Hilfe der Enzymdatenbank DNASIS das Schnittmuster der gespeicherten 390 Enzyme an Wildtyp- und veränderter Sequenz bestimmt und das Enzym BstX I ausgewählt, das mit der Erkennungssequenz 5'-CCANNNNN[^]NTGG-3' (N=beliebige Base, [^]=Schnittstelle) durch die Gen-Veränderung eine neue Schnittstelle erhält, so daß das 281 Bp lange Segment in zwei Teile mit 112 und 169 Bp geschnitten wird. Wegen der Heterozygotie ist beim Enzymverdau für die Probe A427 ein Bandmuster mit abgeschwächter 281 Bp-Bande sowie zwei Banden mit 112 und 169 Bp Länge zu erwarten, für den Wildtyp (Kontrolle) ist auch nach Enzymverdau alleinig eine Bande von 281 Bp Länge zu erwarten.

Da die Probe A427 stellvertretend für die verwandten Proben A428 und A429 untersucht worden war, wurde der Enzymverdau bei den miterkrankten Familienmitgliedern ebenfalls durchgeführt, auf die Darstellung auf SSCP-Gel und die Sequenzierung war bei den anderen Proben verzichtet worden, siehe hierzu auch 2.7.1.

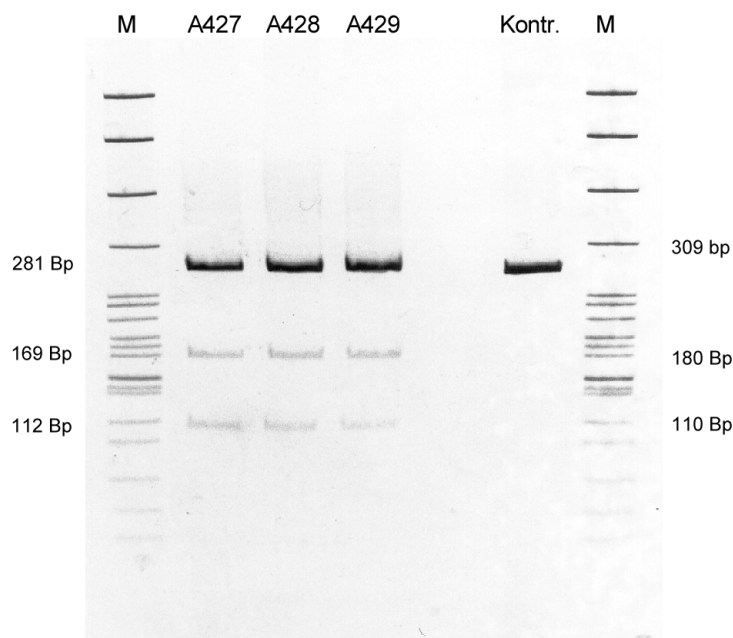


Abb.12: Enzymverdau des Exons R I.1 mit dem Enzym BstX I für die Proben A427, A428 und A429 sowie eine gesunde Kontrolle; links Längenangaben der sichtbaren Banden des verdauten Genproduktes, rechts Längenangaben der wichtigen Marker-Banden; M=Marker pBR322 (siehe 2.1.4), Kontr.= gesunde Kontrolle

Das Ergebnis des Verdaus bestätigt den heterozygoten Basenaustausch bei den betroffenen Mitgliedern der Familie (siehe Abb. 12). Bei bekannter Mutation mit nachgewiesener Pathogenität wurde auf eine Segregationsanalyse verzichtet.

Informationen zum klinischen Untersuchungsbefund konnte ich von zwei der drei Patienten erhalten, von allen konnte ich grobe anamnestische Angaben erhalten. Der Indexpatient A428 habe ab dem 25. Lebensjahr Nachtsehprobleme und eine Blendungsempfindlichkeit bemerkt. Gesichtsfeldausfälle seien erstmalig im Alter von 34 Jahren aufgefallen. Im weiteren Verlauf habe er häufig Kopfschmerzen gehabt, die zu einer regelmäßigen Einnahme von Schmerzmitteln geführt hätten. Er sei zum Zeitpunkt der Untersuchung im Alter von 36 Jahren beim Werkschutz berufstätig gewesen. An augenärztlichen Befunden zeigten sich ein unauffälliger Visus, unauffällige vordere Augenabschnitte und brechende Medien. Fundoskopisch fielen mäßig atrophische Papillen, zentral vereinzelte leichte Pigmentepitheldefekte und in der Netzhautperipherie regionale Pigmentepithelatrophien mit Knochenkörperchenbildung vor allem paravasal in den inferioren seitlichen Anteilen auf. Das Gesichtsfeld zeigte bei wenig beeinträchtigten Außengrenzen ein großes, parazentrales Ringskotom von 10 – ca. 40° bds. Die ERG-Untersuchung erbrachte für skotopische Bedingungen deutlich herabgesetzte Amplituden mit normalen Latenzzeiten. Die Untersuchung unter photopischen Bedingungen zeigte eine Amplitudenreduktion auf 10% der Mittelnorm mit grenzwertig erhöhten Latenzzeiten. Damit zeichnete sich eine vorwiegende Schädigung der Stäbchen bei relativ weniger beeinträchtigter Zapfenfunktion ab. Im zentralen fokalen ERG waren entsprechend die Amplituden nur grenzwertig erniedrigt, es fand sich auch im Bereich des Ringskotoms noch eine erhaltene Restantwort. Patient A429 ist der Vater von A428, bei dem die klinische Symptomatik ab dem Alter von 40 Jahren mit Nachtsehproblemen und verzögerter Hell-Dunkel-Adaptation begonnen hatte. Er war zum Zeitpunkt der Untersuchung im Alter von 62 Jahren noch als Arbeiter berufstätig. Die augenärztliche Untersuchung zeigte einen leicht eingeschränkten Visus von 0,8 bds, vordere Augenabschnitte und brechende Medien waren unauffällig. Fundoskopisch zeigten sich atrophische Papillen, mäßig verengte Netzhautgefäße sowie zentral atrophisches Pigmentepitel mit erhaltenen Inseln. In der Peripherie dominierte dann eine ringförmige Pigmentatrophie mit ausgeprägter Knochenkörperchenbildung und Chorioidea-Atrophie im Bereich der inferioren Netzhaut. Die Perimetrie zeigte eine konzentrische Gesichtsfeldeinengung auf zentrale 5 – 10° mit einer inferioren peripheren Insel zwischen 30° (50°) nasal und 70° temporal. Die ERG-Amplituden waren für die skotopische und photopische Untersuchung auf 25% bzw. 20% der Mittelnorm reduziert, wobei die Latenzen für die skotopische Untersuchung im oberen Normbereich lagen, bei der photopischen verlängert waren. Die ERG-Ableitung in den zentralen 30° zeigte bds. nur noch Restpotentiale, die in der inferioren Hälfte besser erhalten waren.

Patient A427 ist der Onkel von A428 und Bruder von A429. Er berichtete eine Einschränkung der Nachtsehfähigkeit ab dem Alter von 50 Jahren, Gesichtsfeldausfälle habe er mit 55 Jahren bemerkt. Blendungsempfindlichkeit sei nicht aufgetreten, ebenso sei ihm kein Visusverlust aufgefallen. Seit dem Alter von 60 Jahren benötige er eine Lesebrille, vergrößernde Sehhilfen brauche er darüber hinaus nicht. Klinische Untersuchungsbefunde konnte ich leider bei diesem Patienten nicht bekommen.

Die klinischen Befunde aller drei Patienten wurden im Sinne einer sektoriellen Form der RP mit mildem Verlauf interpretiert. In Anbetracht der Betroffenheit von zwei Brüdern sowie dem Sohn des einen kann man den Stammbaum am ehesten unter der Annahme eines autosomal dominanten Erbgangs erklären.

3.1.1.2 Cys187Tyr

In der SSCP-Analyse des Exons R III fiel die Probe #44 durch eine Heteroduplexbildung im Bereich der Doppelstränge auf (siehe Abbildung 13 im Anhang auf S. A25). Es erfolgte daraufhin die manuelle Sequenzierung, die im F-Strang an der Stelle g.3842 das gleichzeitige Auftreten von Guanin und Adenin zeigte, wodurch das Triplet 187 von TGT (Cystein) nach TAT (Tyrosin) verändert wird, was zum heterozygoten Austausch von Cystein nach Tyrosin (Cys187Tyr) führt (siehe Abbildung 14).

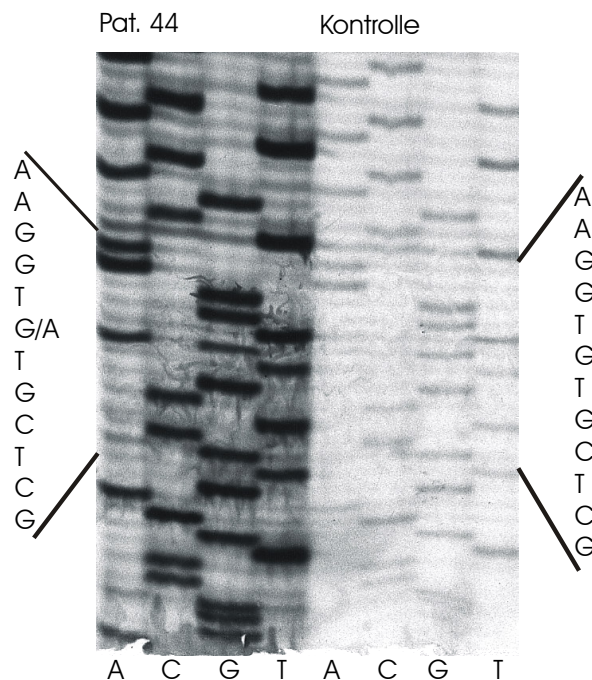


Abb. 14: Autoradiographische Darstellung der Basensequenz um g.3842 Exon R III für Pat. #44 (links) und eine gesunde Kontrolle (rechts) in der Sequenzierung nach Sanger; die Basensequenz des Abschnittes um die Mutation ist am Rand jeweils transkribiert

Diese Veränderung wurde 1993 von Scott et al. beschrieben und ihre Pathogenität bzw. der Zusammenhang mit der Erkrankung in der Familie ist sehr wahrscheinlich. Es erfolgte auch hier die Bestätigung der Mutation durch Enzymverdau. Es wurde das Enzym BssS I ausgewählt, das als Erkennungssequenz 5'-C[^]TCGTG-3' hat und somit die Wildtyp-Sequenz erkennt und bei Position g.3837-38 (entsprechend Position 75-76 des amplifizierten Bereiches) schneidet. Im Verdau der Wildtyp-Sequenz sind daher Banden von 75 und 198 Bp zu erwarten. Durch die Mutation verändert sich die letzte Base der Erkennungssequenz G → A, so daß die Schnittstelle im mutierten Allel heterozygot verloren geht und eine neue Bande mit der Länge des Exons (273 Bp) entsteht (siehe Abbildung 15).

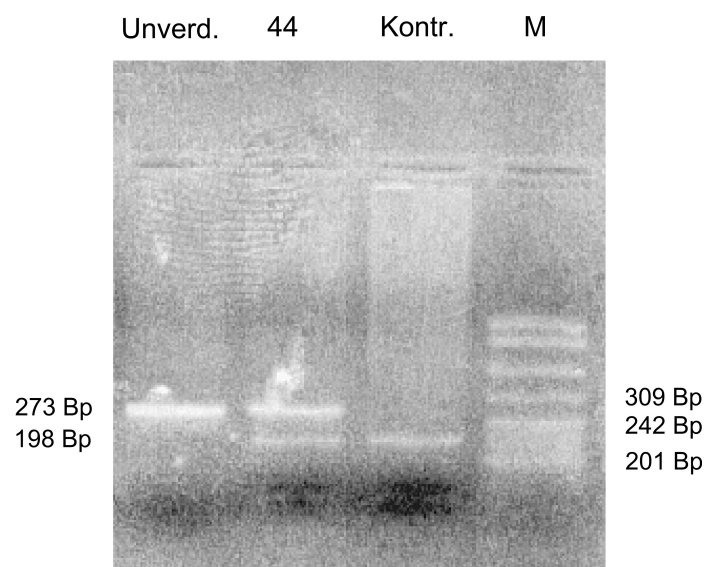


Abb. 15: Enzymverdau von Exon R III mit dem Enzym BssS I; links unverdautes Genprodukt von Probe #44, Verdau von Probe #44 und gesunder Kontrolle, M=Marker pBR 322; am Rand die Fragmentlängen von Genprodukt (links) und Marker (rechts)

Auf eine Segregationanalyse wurde wegen der bekannten Pathogenität verzichtet, weitere Familienangehörige zur Mituntersuchung standen nicht zur Verfügung.

Zum klinischen Verlauf wurde berichtet, daß der Patient bis zum Alter von 20 Jahren keine Sehprobleme gehabt habe, dann erstmalig eine eingeschränkte Nachtsehfähigkeit bemerkte. Im Verlauf hätten die Sehprobleme vor allem bei Drehungen zugenommen, es sei eine zunehmende Lichtscheu aufgetreten. Der Beruf als Bankangestellter sei bis zum 40. Lebensjahr ausgeübt worden. Bei der Untersuchung im Alter von 42 Jahren wurde ein Visus von 0,05 bds. bei unauffälliger Refraktion festgestellt. Das Gesichtsfeld war bei Testung mit dem größten Lichtpunkt auf zentrale 10° bds. eingeschränkt, die

dunkeladaptierte Reizschwelle war um 3 log-Stufen erhöht bei einer monophasisch verlaufenden Adaptation. Das vom rechten Auge abgeleitete ERG war ausgelöscht. Fundoskopisch zeigten sich typische Veränderungen mit Gefäßverengungen, peripheren Hyperpigmentierungen und abgeblähten Sehnerven. Ein Makulaödem wurde vermutet. Zur Familienanamnese wurde berichtet, daß der Vater und Bruder des Indexpatienten ebenfalls an RP erkrankt waren, klinische Untersuchungsbefunde lagen nicht vor.

3.1.2 Rhodopsin-Polymorphismen

Für die Probe #200, die in der SSCP-Untersuchung der Exons R I.1 und R V auffällig gewesen war, konnten Einzelbasenaustausche in der nicht-kodierenden Sequenz nachgewiesen werden. Die heterozygote Transition g.269A/G liegt dabei 26 Bp vor dem Beginn des Exon I, wird aber von dem 64 Bp vor Exonbeginn liegenden Primer mit amplifiziert. Analog liegt die zweite Veränderung g.5321C/A 42 Bp nach dem Ende von Exon V. Beide Veränderungen sind in der Literatur als Polymorphismen beschrieben [44,46] und erklären die Auffälligkeiten in der SSCP-Untersuchung.

Für die Proben #91 und #370, die in der SSCP-Darstellung des Exons R I.2 ein gemeinsames, jedoch von den anderen Proben verschiedenes Bandenmuster mit einer verschobenen und einer zusätzlichen Einzelstrangbande zeigten, wurde als Veränderung ein heterozygoter Austausch g.654C/T nachgewiesen. Dieses Nukleotid stellt jedoch die dritte Stelle des Codons 120 GGC→GGT dar, so daß es bei der Redundanz des genetischen Codes nicht zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz kommt (Gly120Gly). Die Veränderung ist ebenfalls als nicht krankheits-assoziiert vorbeschrieben [44].

Bei den ebenfalls sequenzierten Proben #248 (Exon R I.1), #388 (Exon R I.1), A443 (Exon R I.1), #191 (Exon R II), #369 (Exon R II), #92 (Exon R III), #91 (Exon R IV), #191 (Exon R IV) und #386 (Exon R IV) waren in der Darstellung der gesamten Exonsequenz in beiden Richtungen keine Basenabweichungen festzustellen. Es ist dabei anzumerken, daß bei allen diesen Proben relativ diskrete Veränderungen unter jeweils einer der Elektrophoresebedingungen der SSCP-Analyse zur Sequenzierung geführt hatten. Die noch auffälligsten Veränderungen waren diskrete zusätzliche Einzelstrangbanden der Proben #248 und #388 im Exon R I.1 (siehe Abb. 16 auf Seite A25 im Anhang). Nachdem die Sequenzierung keine Auffälligkeiten hatte nachweisen können, war für alle Proben die SSCP-Darstellung nach erneuter PCR wiederholt worden und hatte unter den gleichen Elektrophoresebedingungen die Veränderungen nicht mehr gezeigt. Die ebenfalls wiederholte zweite Elektrophoresebedingung hatte wiederum keine Auffälligkeiten gezeigt. Bei den tatsächlichen Mutationen und Polymorphismen waren die SSCP-Veränderungen jeweils unter verschiedenen Bedingungen nachweisbar (allerdings unterschiedlich deutlich)

und auch unter den gleichen Bedingungen reproduzierbar gewesen, die einmalig dargestellten Auffälligkeiten sind damit am ehesten als Artefakte zu sehen.

Eine tabellarische Zusammenstellung der von mir gefundenen Mutationen und Polymorphismen findet sich im Anhang auf Seite A26 (Tab. 6).

3.2 Gefundene Veränderungen im Peripherin-Gen

Es wurden, wie für Rhodopsin beschrieben, die Proben der dänischen Patienten für jedes Exon gemeinsam aufgetragen, die 26 Hamburger Patienten wurden in zwei weiteren Arbeitsgängen à 16 und 10 Patienten gemeinsam untersucht. Wiederum wurde jede Probe unter zwei SSCP-Gelbedingungen, mit und ohne Glycerin, analysiert.

Auffällig bzw. keinem bekannten Polymorphismus-Bandenmuster zuzuordnen waren 13 Proben, zwei davon in zwei Exons. Knapp die Hälfte der Auffälligkeiten trat in Exon III auf, das für seine häufigen Polymorphismen bekannt ist und von anderen Arbeitsgruppen daher im Rahmen des Mutationsscreenings immer komplett sequenziert wird [111].

In der Sequenzierung fanden sich 3 Mutationen und insgesamt 17 Polymorphismen, teilweise in Kombination auftretend.

3.2.1 Peripherin-Mutationen

Die gefundenen Peripherin-Mutationen lagen sämtlich in Exon II und dort gruppiert in den Codons 216-218. Bei verschiedenen Mutationen und nicht verwandten Familien (2 dänische und 1 deutsche) ist dieses am ehesten zufallsbedingt. Eine insgesamt Häufung der Mutationen in diesem Bereich ist in der Literatur nicht beschrieben, jedoch bei fehlender Neupublikation bekannter Mutationen auch schlecht abschätzbar, s.a. 1.2.4.

Alle drei Mutationen fielen durch ein ungewöhnliches Bandenmuster in der SSCP-Analyse des Exon P II auf.

3.2.1.1 Pro216Ser

Die Probe 93 fiel durch einen Heteroduplex bei den Doppelsträngen auf (siehe Abbildung 17).

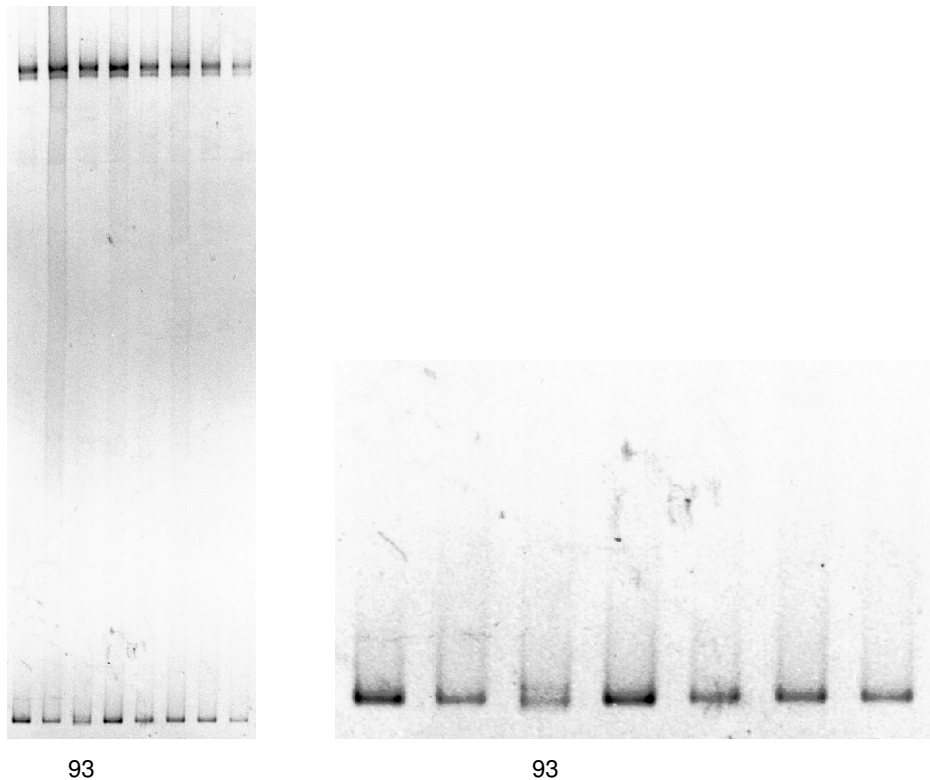


Abb. 17: SSCP-Muster von Exon P II; links gesamtes Gel, rechts Vergrößerung der Doppelstränge, markiert ist die durch einen Heteroduplex auffällige Probe 93

Die daraufhin durchgeführte Sequenzierung zeigte einen heterozygoten Austausch C→T bei Basenpaar c.886 mit entsprechendem Austausch G→A im Gegenstrang (siehe Abbildung 18).

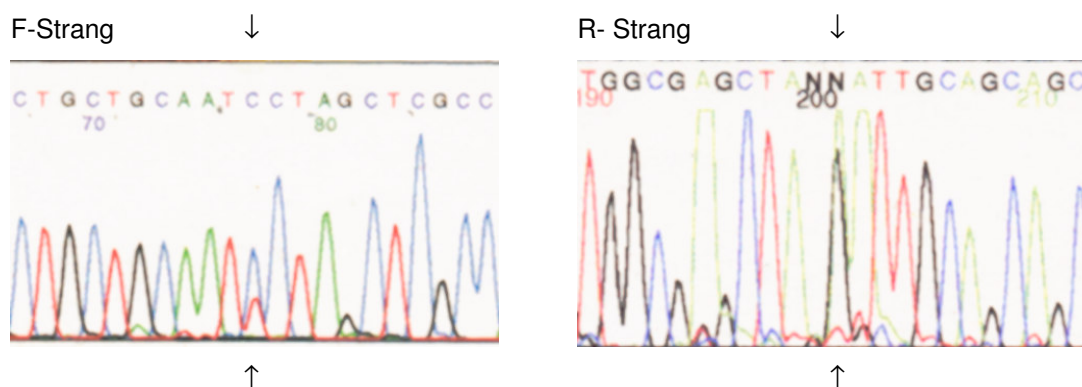


Abb. 18: Darstellung der Basensequenz um c.886, Exon P II für die Probe 93 mit der heterozygoten Mutation c.886C→T mit der Cycle Sequencing Methode; Markierung auf dem veränderten Nukleotid

Daraus resultiert die heterozygote Transition von CCT (Prolin) → TCT (Serin) in Codon 216 und die heterozygote Mutation Pro216Ser, die erstmalig 1993 von Stone et al. beschrieben wurde [176]. Zur Bestätigung wurde ein Enzymverdau mit Tsp509 I durchgeführt, dessen Erkennungssequenz 5'-^AATT-3' zur Veränderung paßt, so daß eine Schnittstelle bei Basenpaar c.882-883 (Basenpaar 94-95 des Exons) entsteht, und bei der heterozygoten

Mutation somit zu einem Bandenmuster mit Banden von 94, 218 und 312 Bp Länge führt. Die Wildtyp-Sequenz hat keine Schnittstelle und stellt sich somit als ganzes Exon mit 312 Bp dar (siehe Abbildung 19).

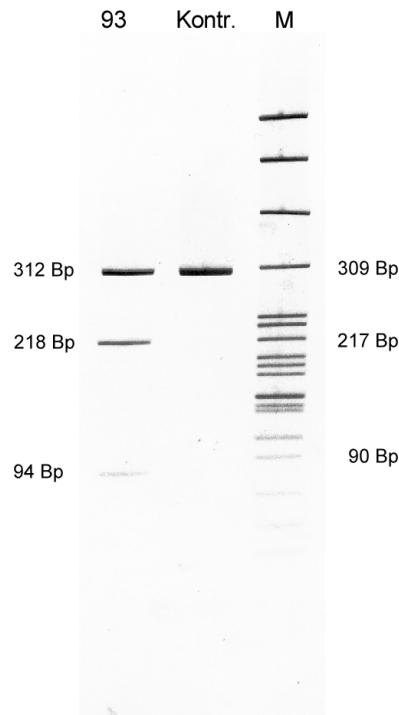


Abb. 19: Enzymverdau des Exons P II für die Probe 93 und eine gesunde Kontrolle; links Längen der Produktbanden, rechts Längen wichtiger Marker-Banden, M= Marker pBR 322

Zur Anamnese wurde berichtet, daß die Patientin im Alter von 41 Jahren erstmalig Sehprobleme in der Dunkelheit sowie eine Lichtempfindlichkeit bemerkt hatte. Bei einer augenärztlichen Untersuchung im Alter von 43 Jahren zur Anpassung einer neuen Brille wurden Augenhintergrundsveränderungen bemerkt, die zur ausführlicheren Diagnostik führten. Es wurde eine normale Sehschärfe sowie ein normales Gesichtsfeld bei großen Lichtpunkten, jedoch runde Skotome im unteren Halbfeld zwischen 10 und 30° bei kleineren Lichtpunkten festgestellt. Fundoskopisch zeigten sich verengte Arteriolen, abgeblaßte, „wachsgelbe“ Papillen und eine parafoveale Atrophie von RPE und Choriocapillaris. Typische Knochenkörperchen fanden sich vor allem in der Äquatorialregion an den Stellen der konfluierenden RPE-Atrophie.

Die Dunkeladaptation verlief zweiphasig mit einer Erhöhung der Schwelle um 1 log-Stufe nach 20 Minuten. Im dunkeladaptierten ERG mit schwachen Ganzfeld-Blitzen war die ERG-Antwort ausgelöscht, mit mittlerem Standardblitz ließ sich eine gemischte Stäbchen-Zapfen-Antwort mit ca. 50% Reduktion in der Amplitude auslösen. Die dunkeladaptierte Antwort auf Flackerlicht, selektiv die Zapfenfunktion untersuchend, zeigte eine Reduktion

der Amplitude auf ca. 15% des unteren Normwertes mit einer signifikant verlängerten impliziten Latenz.

Zur Familienanamnese wurde berichtet, daß die Patientin in der vierten Generation einer Familie mit erblicher Netzhautdegeneration stehe, unter anderem seien auch ihre Mutter und ihr Großvater mütterlicherseits betroffen.

Familienangehörige zur genetischen Mituntersuchung standen jedoch nicht zur Verfügung.

3.2.1.2 Pro216Leu

Die Probe "e" zeigte ebenfalls isoliert einen Heteroduplex in der SSCP-Analyse. In der Sequenzierung war im Basenpaar c.887 der heterozygote Austausch C→T nachweisbar.

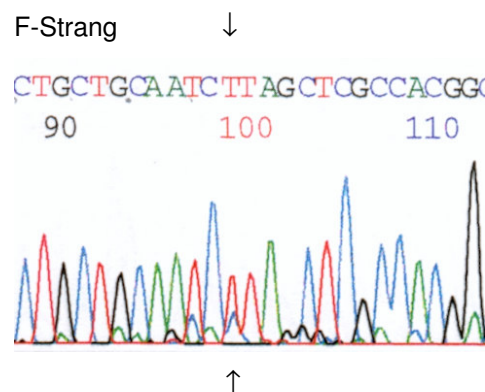


Abb. 20: Darstellung der Basensequenz um c.887, Exon P II, für die Probe "e" mit der heterozygoten Mutation c.887C→T mit der Cycle Sequencing Methode; Markierung auf dem veränderten Nukleotid

Das Triplet 216 verändert sich dadurch von CCT (Prolin) → CTT (Leucin), woraus die heterozygote Mutation Pro216Leu resultiert. Es wurde der Enzymverdau mit dem Enzym Bfa I durchgeführt, das mit seiner Erkennungssequenz 5'-C[^]TAG-3' eine Schnittstelle im Wildtyp-Exon bei Basenpaar c.887-888 (entsprechend 99-100 des amplifizierten Bereiches) hat. Der Basenaustausch führt zur Veränderung der ersten Base der Erkennungssequenz, so daß die Schnittstelle verloren geht und außer den Wildtyp-Banden von 99 und 213 Bp auch noch eine Bande mit der Länge des Exons (312 Bp) zu erwarten ist.

Bei der zum Zeitpunkt der Untersuchung 14 jährigen Tochter ("eT") bestanden ebenfalls Symptome im Sinne einer Retinitis pigmentosa. Die augenärztliche Diagnostik hatte den hochgradigen Verdacht auf das Vorliegen einer Retinitis pigmentosa ergeben. Nach ausführlicher Beratung und Aufklärung wurde bei der Tochter ebenfalls ein Enzymverdau des Exons P II durchgeführt (siehe Abbildung 21).

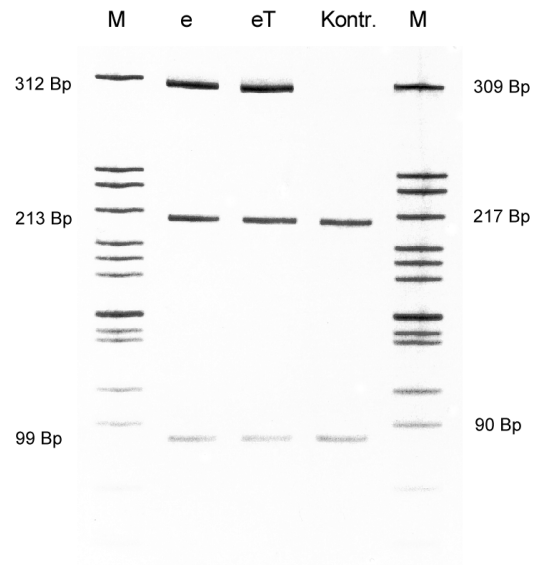


Abb. 21: Enzymverdau des Exons P II für die Proben "e", "eT" und eine gesunde Kontrolle; M= Marker pBR 322, links Längen der verdauten Exonbanden, rechts Längen der wichtigsten Marker-Banden

Der Enzymverdau bestätigt für die Patientin und ihre Tochter das Vorliegen der Mutation Pro216Leu, deren Pathogenität vorbeschrieben ist [101], so daß sie als ursächlich für die klinische Symptomatik anzusehen ist.

Zur Klinik der Indexpatientin ergibt sich anamnestisch, daß sie seit der Kindheit auf dem rechten Auge sehr schlecht gesehen habe, die Sehleistung des linken Auges habe seit der Kindheit kontinuierlich nachgelassen. Im Alter von 26 Jahren hatte sie wegen der Seheinschränkung ihren Beruf aufgeben müssen, lesen habe sie bis zum Alter von 30 Jahren können. Augenärztliche Untersuchungen hatten im Alter von 25 Jahren ein typisches fundoskopisches Bild sowie ausgelöschte ERG-Antworten gezeigt, so daß die Diagnose einer Retinitis pigmentosa gestellt wurde.

Die Verlaufskontrolle im Alter von 30 Jahren hatte fundoskopisch rechts eine farbbarme Papille, einen temporal pigmentierten Konus sowie peripher feinkörnige Pigmentierungen, eine Engstellung der Gefäße mit Pigmentablagerung und links weniger ausgeprägte Veränderungen mit einer randscharfen, vitalen Papille, einem ebenfalls pigmentierten Konus und einer Engstellung der Arterien sowie peripher feinkörnigen Veränderungen gezeigt. Das Gesichtsfeld war rechts bei starken Lichtsignalen konzentrisch auf ca. 30°, links bei etwas schwächerem Signal auf 30° nasal und 45° temporal eingeeengt. Der Visus betrug rechts 1/15, links 0,8 bis 1,0. In der erneuten Kontrolle im Alter von 34 Jahren war bei subjektiv deutlicher Progredienz auf dem rechten Auge nur noch das Erkennen von Lichtschein möglich, das Gesichtsfeld des linken Auges war konzentrisch auf 5° eingeschränkt. Fundoskopisch zeigte sich eine geringere Progredienz mit einer jetzt stumpfen Makula rechts und einer extremen Engstellung der Gefäße rechts bei unver-

änderten Befunden der linken Seite. Auf weitere ERG-Untersuchungen war wegen des ausgelöschten ERGs im Alter von 25 Jahren verzichtet worden.

Bei der Tochter ("eT") war es ebenfalls seit dem Kindesalter zu einer Einschränkung der Sehfähigkeit gekommen. Es waren im Alter von 10 Jahren subnormale ERG-Potentiale bis max. 160 μ V bei relativer Engstellung der Gefäße und peripheren unregelmäßigen Pigmentierungen festgestellt worden. Das Gesichtsfeld war nicht eingeschränkt. Bei den Kontrollen im Alter von 11 und 13 Jahren waren weiterhin subnormale ERG-Potentiale nachweisbar, die fundoskopischen Veränderungen zeigten sich hingegen progredient.

Zur weiteren Familienanamnese wird berichtet, daß der Vater der Indexpatientin seit Jahrzehnten ein erheblich eingeschränktes Sehvermögen gehabt habe, der Großvater väterlicherseits sei blind gewesen. Der jüngste Bruder von insgesamt 5 Geschwistern der Indexpatientin habe ebenfalls Symptome der RP gehabt, jedoch eine deutlich schnellere Progredienz, was zu seinem Suizid im Alter von 25 Jahren geführt habe. Die weiteren Familienmitglieder seien gesund, eine Konsanguinität bestehe nicht.

3.2.1.3 Ser218Pro

Die Probe #248 zeigte in der SSCP Analyse des Exons P II sowohl eine zusätzliche Bande im Bereich der Einzelstränge als auch einen Heteroduplex bei den Doppelsträngen (siehe Abbildung 22).

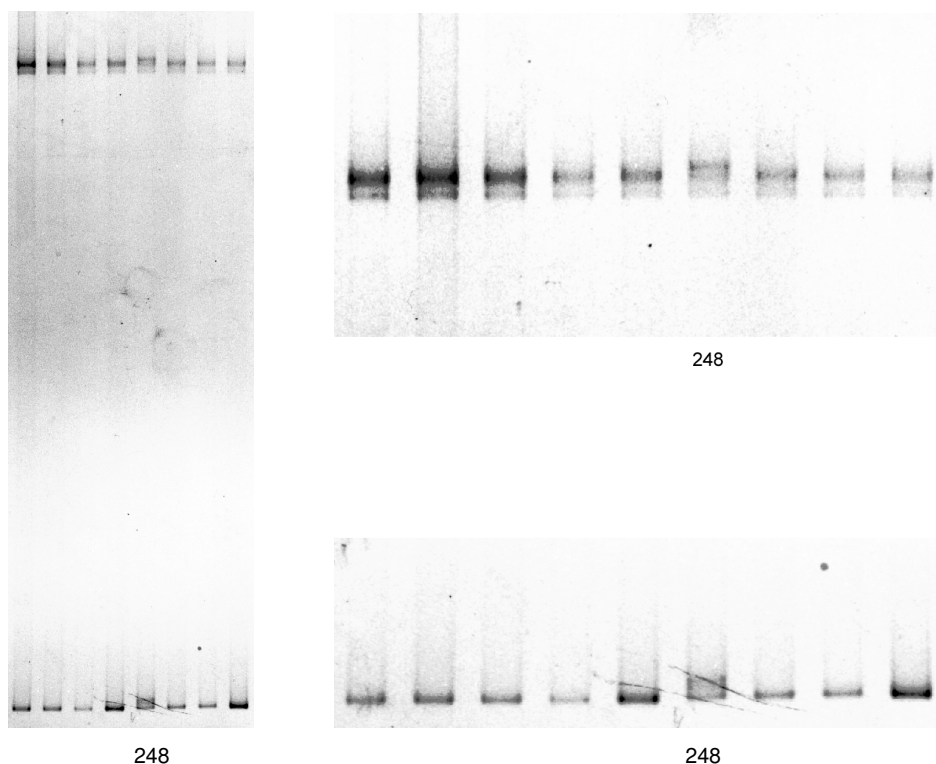


Abb. 22: SSCP-Muster von Exon P II; markiert ist die Probe #248, daneben Kontrollen, links gesamtes Gel, rechts Vergrößerung der Einzelstränge und Doppelstränge; die schrägen dunklen Striche im Bereich der Doppelstränge entsprechen Rissen im SSCP-Gel und sind Artefakte

Die daraufhin durchgeführte Sequenzierung zeigte als Ursache hierfür einen heterozygoten Austausch T → C bei Basenpaar 892 mit entsprechendem A → G im Gegenstrang (siehe Abbildung 23).

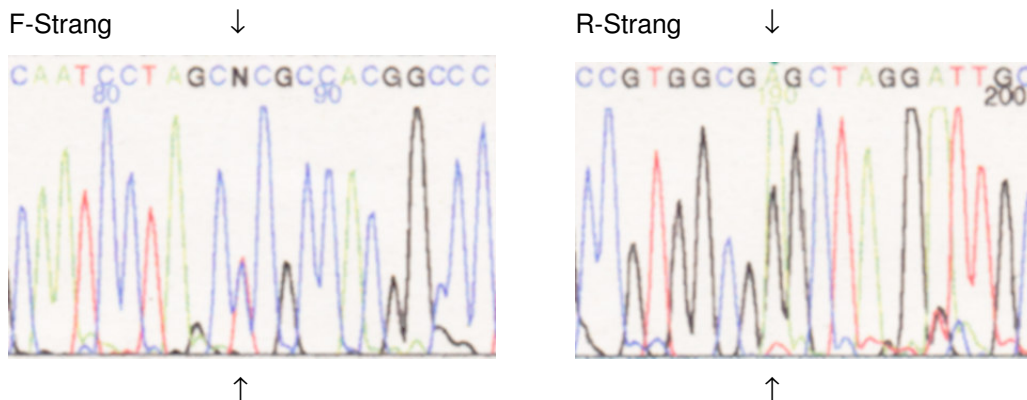


Abb. 23: Darstellung der Basensequenz um c.892, Exon P II, für die Probe 248 mit der heterozygoten Mutation c.892T→C mit der Cycle Sequencing Methode; Markierung auf dem veränderten Nukleotid

Da dieses Basenpaar das erste eines Triplets ist, kommt es hierdurch zum Austausch TCG (Serin) nach CCG (Prolin) mit der heterozygoten Mutation Ser218Pro.

Zur Bestätigung des Ergebnisses der Sequenzierung wurde ein Enzymverdau mit dem Enzym Aci I (Erkennungssequenz 5'-C[^]CGC-3' bzw. 5'-G[^]CGG-3') durchgeführt, das im Wildtyp-Exon P II eine Schnittstelle bei Basenpaar 846-847 (Basenpaar 58-59 des amplifizierten Abschnitts) hat, so daß der Enzymverdau Banden von 58 und 254 Basenpaaren erwarten läßt. Durch die Mutation entsteht eine zusätzliche Schnittstelle bei Basenpaar 892-893 (Basenpaar 104-105 des amplifizierten Abschnitts), so daß das 254 Bp lange Segment in zwei Segmente von 46 und 208 geteilt wird, und somit Banden von 254, 208, 58 und 46 Bp zu erwarten wären. Es wurde in diesem Fall eine Familienuntersuchung durchgeführt, um bei der bislang unbekannten Mutation den Zusammenhang zur Erkrankung zu sichern, sowie um den bislang asymptomatischen, aber möglichen Trägerstatus der Enkelin des Indexpatienten zu klären. Bekannt waren eine Retinitis pigmentosa beim Indexpatienten (#248) sowie dem älteren Sohn (#248 S1). Der Krankheitsstatus des zweiten Sohnes (#248 S2) war nicht bekannt. Die mituntersuchte 18jährige Tochter von #248 S1 (#248 E1) hatte zum Zeitpunkt der Untersuchung keine Augensymptome, der zweite Sohn #248 S2 hatte keine Kinder. Bei der jungen Frau #248 E1 handelte es sich somit um eine präsymptomatische Testung bei familiärer Erkrankung. Sie hatte zuvor eine Beratung über die Konsequenzen einer genetischen Testung erhalten, die Untersuchung wurde nach Aufklärung auf eigenen Wunsch und mit ihrem Einverständnis durchgeführt.

Der Enzymverdau bestätigt das Vorliegen der Mutation beim Indexpatienten #248 sowie seinen beiden Söhnen #248 S1 und #248 S2, die Enkelin #248 E1 zeigte das Bandenmuster der gesunden Kontrolle.

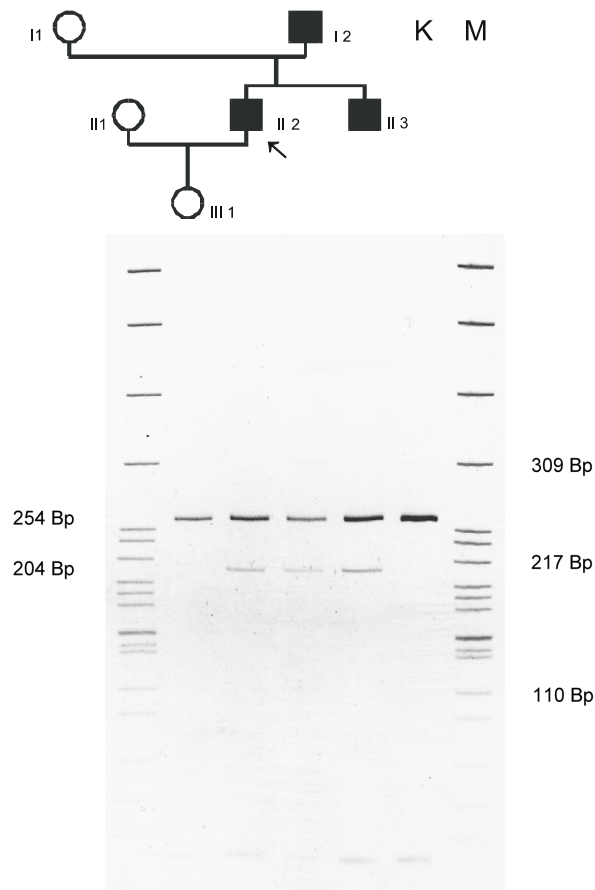


Abb. 24: Enzymverdau mit dem Enzym Aci I des Exons P II für die Proben #248, #248 S1, #248 S2, #248 E1 sowie eine gesunde Kontrolle; oben Stammbaum der Familie, markiert ist der Indexpatient (Pfeil), ausgefüllte Zeichen entsprechen klinisch betroffenen Patienten; in der Elektrophorese links Bandenlängen des verdauten Produkts, rechts wichtige Markerlängen; (#248= I 2; #248 S1= II 2; #248 S2= II 3; #248 E1= III 1; K= Kontrolle; M= Marker pBR322)

Zur Bestätigung der Pathogenität erfolgte die augenärztliche Untersuchung des bislang im Krankheitsstatus unklaren zweiten Sohnes #248 S2. Da auch bei ihm die Diagnose einer RP gestellt wurde, ist von der krankheitsverursachenden Wirkung der Veränderung auszugehen. Zusätzlich wurden 20 gesunde Kontrollen im Enzymverdau untersucht und zeigten ebenfalls das Bandenmuster der einen gesunden Kontrolle der Familienuntersuchung.

Zur Anamnese und Klinik der betroffenen Familienmitglieder wurde berichtet, daß der Indexpatient #248 im Kindesalter geschielt habe, wegen einer Exotropie im Alter von 22 Jahren operiert worden sei, jedoch eine Amblyopie links festgestellt wurde. Ab dem Alter

von 67 Jahren habe er eine Einschränkung des Sehvermögens bemerkt sowie Schwierigkeiten bei der Orientierung, vor allem im Dunkeln. Bei der augenärztlichen Untersuchung im Alter von 71 Jahren war die Sehschärfe mit links 0,4 und rechts 0,3 deutlich eingeschränkt, der Augenhintergrund zeigte typische Veränderungen mit verengten Arteriolen und einer scharf demarkierten parazentralen RPE-Atrophie, die eine kleine zentrale Insel aussparte. In der Netzhautperipherie waren multiple irreguläre bis filiforme Hyperpigmentierungen darstellbar. Die Gesichtsfeldperimetrie zeigte ein dichtes perizentrales Ringskotom (1 bis ca. 30° Isopter) um ein kleines preserviertes zentrales Areal. Die äußeren Netzhautbereiche zeigten nur leichte Einschränkungen. Die Dunkeladaptation erfolgte mit einem zweiphasischen Verlauf mit eingeschränktem Zapfensegment und mittelgradig erhöhter Reizschwelle der Stäbchen nach 20 Minuten. Hell- und dunkeladaptierte ERGs waren nach internationalen Standards erloschen.

Der betroffene Sohn #248 S1 stellte erstmalig im Alter von 38 Jahren eine subjektive Seheinschränkung und Sehschwierigkeiten im Dunkel fest. Bei der augenärztlichen Untersuchung klagte er über Fokussierungsprobleme, Ausfälle im seitlichen Gesichtsfeld, eine Lichtempfindlichkeit und eine leichte Nachtblindheit. Visus und Refraktion waren unauffällig, die Perimetrie zeigte eine leichte konzentrische GF-Einschränkung ohne Skotome. Die zweiphasisch verlaufende Dunkeladaptation mit einer nur leicht beeinträchtigten Zapfenphase und einer verzögerten Stäbchenphase zeigte eine Erhöhung der Reizschwelle um 1 log-Stufe. Das ERG des rechten Auges wies stark reduzierte Amplituden mit kaum nachweisbarer Stäbchenantwort nach, die Zapfenantworten und die gemischten Antworten waren um 90% reduziert. Fundoskopisch waren nur geringe Veränderungen mit leichter Gefäßverengung, leichter Sehnervenatrophie und einem erhöhten Fundusreflex nachweisbar. Eine RPE-Atrophie war nicht nachweisbar, Hyperpigmentierung fand sich nur an einer Stelle der unteren temporalen Peripherie des rechten Auges. Die Verlaufsuntersuchung im Alter von 48 Jahren zeigte eine deutliche Progredienz der Befunde mit einer Einschränkung der Gesichtsfelder auf zentrale 5-20° und einem Visusverlust auf 0,8 nach Korrektur. Fundoskopisch waren jetzt eine deutliche Gefäßverengung, eine deutliche Sehnervenatrophie, eine diffuse RPE-Atrophie im Äquatorialbereich und einzelne Hyperpigmentierungen zu sehen. Als Ausdruck des Makulabefalls fanden sich dort einige gelbliche Punkte. Insgesamt zeigte sich damit das Bild einer atypischen Stäbchen-Zapfen-Dystrophie mit spätem Beginn, jedoch schnellem Fortschreiten im 5. Lebensjahrzehnt.

Der zweite Sohn #248 S2 hatte im Alter von 35 Jahren eine leichte Photophobie entwickelt, mit 43 Jahren hatte er eine eingeschränkte Nachtsicht festgestellt. Er zeigte bei der Untersuchung im Alter von 44 Jahren eine normale Sehschärfe und eine nur leichte Einschränkung des Gesichtsfeldes für kleine Objekte. Fundoskopisch wurden eine leichte

Gefäßverengung und abnormale Reflexe von der posterioren Retina beschrieben. Das RPE war intakt und es fanden sich keine Hyperpigmentierungen oder Knochenkörperchenbildungen. Die Dunkeladaptation verlief verzögert und zeigte eine um eine log-Stufe erhöhte Reizschwelle nach 25 Minuten. Das ERG zeigte subnormale skotopische b-Wellen, reduzierte Oszillationspotentiale und verlängerte implizite Latenzzeiten der Zapfen. Damit ergab sich insgesamt das Bild einer milden Stäbchen-Zapfen-Dystrophie. Von der die Mutation nicht tragenden Enkelin #248 E1 (Tochter von #248 S1) lagen keine klinischen Untersuchungsbefunde vor, sie gab jedoch an, keine Augenprobleme zu haben. Ophthalmologische Veränderungen wären bei dem späten Krankheitsbeginn in der Familie jedoch ohnehin noch nicht zu erwarten gewesen.

3.2.2 Peripherin-Polymorphismen

Es traten bei 9 der 11 weiteren auffälligen Proben Polymorphismen in den Exons P I und P III, teilweise in Kombination, auf. Bei insgesamt 3 Proben (#370, #388, "c") blieb ein Basenaustausch in Exon P I (558C/T) ohne Konsequenz, da sich lediglich die dritte Stelle von Codon 106 (GTC→GTT) veränderte und es nicht zum Aminosäureaustausch kam (Val106Val) [52]. Bei den Proben #191, #275, "c", "e" und "i" fand sich der bekannte Polymorphismus Glu304Gln, bei dem der fehlende Zusammenhang mit der Erkrankung 1992 von Jordan et al. beschrieben wurde [95]. In den Proben #191, #275, #429, "c", "e" und "i" ließ sich der bekannte Polymorphismus Gly338Asp nachweisen, der ebenfalls ohne Zusammenhang mit der Erkrankung beschrieben ist [95]. Dreimalig war zudem eine Veränderung im nicht-translatierten Bereich am 3'-Ende nachweisbar, die Proben #92, #191 und "e" zeigten die Veränderung c.1294 C/T. Diese liegt 16 Basenpaare nach dem Ende von Exon PIII und ist als Polymorphismus vorbeschrieben [56].

In der Sequenzierung der Proben "h" (P I.2) und A445 (P I.2) war keine Sequenzabweichung nachweisbar, allerdings handelte es sich bei der Probe "h" um eine diskrete Veränderung im Sinne eines angedeuteten Heteroduplex, die unter anderen Gelbedingungen nicht auffiel und somit am ehesten einem Artefakt entspricht. Die Probe A445 war ebenfalls wegen sehr fraglicher Auffälligkeiten sequenziert worden, so daß die nicht nachweisbare Veränderung eher Ausdruck der großzügigen Sequenzierung ist.

Eine tabellarische Zusammenstellung der von mir gefundenen Mutationen und Polymorphismen findet sich im Anhang auf Seite A26.

4. Diskussion

4.1 Abschätzung der Sensitivität des Screenings

Ich habe für das Screening nach Sequenzabweichungen die SSCP-Untersuchung gewählt, da diese ein etabliertes und bei vertretbarem Aufwand hinreichend sensitives Verfahren darstellt [82,127]. Es wurden dabei die Doppelstrang-Banden jeweils mit dargestellt, um so eine Beurteilung auf mögliche Heteroduplices zu ermöglichen [197].

Detaillierte Untersuchungen zur Sensitivität der alleinigen SSCP-Einzelstrang-Analyse beschreiben ein Längenoptimum der zu untersuchenden PCR-Fragmente im Bereich von 150-200 Bp, für die Sensitivitäten im Bereich von 70-97% angegeben werden. Eine deutliche Abnahme hin zu größeren PCR-Fragmenten wird z.B. mit einer Sensitivität von 58% bei 420 Bp und 3% bei 600 Bp angegeben [170]. Für die Heteroduplexanalyse alleine wurden ebenfalls gute Sensitivitäten im Bereich von 90% beschrieben [108,197]. Es wurde jedoch festgestellt, daß eine Kombination der Methoden in der Beobachtung die günstigste Lösung darstellt, da sich einzelne Mutationen in den verschiedenen Techniken unterschiedlich deutlich zeigen [197]. Die Sensitivität der gekoppelten Untersuchung wird mit 75-98% bei einer optimalen Fragmentlänge von 200 bis 400 Basenpaaren angegeben [151].

Für Untersuchungen im Rhodopsin- und Peripherin-Gen sind Fragmentlängen von bis zu 404 Bp üblich [111,196], in anderen Genen wie CFTR werden teilweise Fragmente bis 570 Bp toleriert [151]. Die von mir verwendeten Fragmentlängen von 242 bis 404 Bp liegen damit im Bereich der internationalen Standards.

Verschiedene Studien konnten auch einen Zusammenhang zwischen Sensitivität und bestimmten Elektrophoresebedingungen zeigen. In Abhängigkeit von Acrylamidkonzentration, Ausmaß der Quervernetzung (eingestellt durch das Verhältnis Acrylamid : Bisacrylamid), Ionenkonzentration, Temperatur und evtl. Glycerinzusatz wurden unterschiedliche Sensitivitäten festgestellt. Kontrovers blieb dabei, ob der daraus zu ziehende Schluß die Ermittlung der für das einzelne Exon optimalen Elektrophoresebedingungen [151,170] oder die systematische Anwendung mehrerer SSCP-Bedingungen sei [127,143,172]. Als allgemein günstige Gelbedingungen wurden Gele mit relativ hohem Acrylamidgehalt (10%) bei niedriger Quervernetzung (Mischungsverhältnis Acrylamid 50:1 Bisacrylamid) mit Zusatz von 10% Glycerin beschrieben [151]. Andere Gruppen arbeiteten regelmäßig mit 6%-Acrylamidgelen in einem Verhältnis von 37,5:1 Acrylamid:Bisacrylamid, beschrieben jedoch auch den positiven Effekt von Glycerin [170].

In Anlehnung an Vorerfahrungen im Institut für Humangenetik habe ich mit 6%-Acrylamid-Gelen (Acrylamid:Bisacrylamid 37,5:1) gearbeitet und jeweils zwei Gelbedingungen ohne und mit 10% Glycerin untersucht. Bei Schwierigkeiten mit der Schärfe der Banden wurde im Verlauf die TBE-Konzentration von 1-fach auf 0,5-fach reduziert [nach 172].

Alternativen in der Diagnostik hätten im wesentlichen in der Verwendung von Denaturierungs-Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE) sowie der direkten Sequenzierung bestanden. Die DGGE hätte dabei durch die Notwendigkeit der Herstellung geeigneter Primer sowie anderer Elektrophoresevorrichtungen einen erheblichen apparativen Mehraufwand dargestellt, der Anstieg in der Sensitivität ist hingegen nicht so bedeutend [170].

Gegen die direkte Sequenzierung sprach der deutlich größere Aufwand bei der Durchführung und Auswertung, sehr ausgeprägt bei der manuellen, aber auch noch bei der automatischen Sequenzierung (siehe 2.6). Die Sensitivität liegt dafür theoretisch nahe 100%, ist jedoch zur Suche nach heterozygoten Veränderungen problematisch, da diese in der Sequenzierung sehr viel weniger deutlich zutage treten als homozygote Basenaustausche. Es besteht daher auch hier ein Risiko des Übersehens von Veränderungen. Diese Methode wird eher in der Diagnostik einzelner Patienten herangezogen, da sich dann der Aufwand der Sequenzierung im Vergleich zu den für die SSCP nötigen vergleichenden Untersuchungen Gesunder relativiert.

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, daß die Sensitivität im Bereich der angegebenen 75-98% der gekoppelten Untersuchung von SSCP und Doppelstrangheteroduplices liegt. Damit kann davon ausgegangen werden, daß mit einiger Wahrscheinlichkeit die Mutationen im untersuchten Patientenkollektiv nicht restlos gefunden wurden. Den zusätzlichen Schwierigkeiten durch die hohe Anzahl an Polymorphismen in Exon P III, die die SSCP-Auswertung erschweren, habe ich versucht, durch großzügige Sequenzierung zu begegnen, die entsprechend viele Polymorphismen in diesem Bereich nachwies.

Eine Detektionsrate von 100% ist jedoch mit keiner Screeningmethode zu erreichen, und die Zahl der von mir gefundenen Auffälligkeiten entspricht insgesamt etwa der statistischen Erwartung. Nach den Angaben in der Literatur haben ca. 16% der europäischen adRP-Patienten ihre Mutation im Rhodopsin-Gen [27, siehe auch 1.2.1]. Es war daher bei den komplett untersuchten 19 dänischen und teilweise untersuchten 16 deutschen Patienten mit 4-6 Rhodopsin-Mutationen zu rechnen. Tatsächlich gefunden wurden 2 Mutationen, was unterhalb der statistischen Erwartung liegt, jedoch in Anbetracht der relativ kleinen Zahl untersuchter Patienten nicht statistisch relevant ist.

Peripherin-Mutationen haben einen Anteil von ca. 3% an den adRP-Fällen [45,107]. Es war somit bei 29 vollständig untersuchten und 16 teilweise untersuchten Patienten mit 1-2 Peripherin-Mutationen zu rechnen. Die Anzahl von 3 gefundenen Mutationen liegt etwas höher, jedoch ebenfalls im statistisch zu erwartenden Bereich.

4.2 Genotyp-Phänotyp-Relation

4.2.1 Rhodopsin

4.2.1.1 Rho Thr17Met

Die Erstbeschreiber [180] machen für diese Mutation keine klinischen Angaben, so daß der Vergleich mit einer anderen beschriebenen Familie gezogen werden muß [59]. Es wird dort für den 51-jährigen Indexpatienten eine zuerst in der zweiten Hälfte der 4. Dekade bemerkte Einschränkung der Nachtsehfähigkeit und des seitlichen Gesichtsfeldes beschrieben. Die Diagnose RP wurde im Alter von 41 Jahren gestellt; der Patient zeigte im Alter von 51 Jahren eine unbeeinträchtigte Sehschärfe (20/20) bds. nach Korrektur sowie eine unauffällige Untersuchung der vorderen Augenabschnitte und weitgehend auch der brechenden Medien. Die Fundoskopie zeigte vorwiegend an der unteren Netzhauthälfte stattfindende Pigmentverschiebungen mit Hypopigmentierungen und Knochenkörperchenbildung zwischen der Gefäßarkade und der mittleren Peripherie. Die Gefäße der unteren Netzhauthälfte waren verengt, die der oberen dagegen normal weit, die Sehnervenpapille von unauffälligem Aussehen. Das Gesichtsfeld zeigte ein Ringskotom mit vorwiegender Ausbreitung auf der oberen Hälfte sowie eine periphere GF-Einschränkung, ebenfalls verstärkt in der oberen Hälfte. Das ERG zeigte eine Reduktion der Zapfen-b-Wellen-Amplitude um 30-44% unterhalb des unteren Normwertes und der Stäbchen-b-Wellen-Amplitude um 50-60% unterhalb des unteren Normwertes bei einer grenzwertig hohen bzw. normalen impliziten b-Wellen-Latenz. Die Dunkeladaptation verlief verzögert und erreichte letztlich eine um 1,6 log-Stufen erhöhte Reizschwelle.

Die weiteren untersuchten Familienmitglieder im Alter von 15, 33 und 57 Jahren zeigten ein von der Art her ähnliches Schädigungsmuster in unterschiedlicher Ausprägung. Gemeinsam waren die uneingeschränkte Sehschärfe, die unauffällige Untersuchung der vorderen Augenabschnitte und brechenden Medien sowie die Prädisposition für einen Befall der unteren und nasalen Netzhauthälfte mit konsekutiver Einschränkung vorwiegend des oberen, temporalen Gesichtsfeldes. Gemeinsam war auch die Beobachtung eines langsamen Fortschreitens der Symptome sowie die Einschränkung der Dunkeladaptation. Die ERG-Ergebnisse zeigten eine zunehmende Einschränkung mit dem Alter, von einer isolierten Stäbchen-Schädigung bei der 15-jährigen über intermediäre Befunde bei der 33-jährigen hin zu den Befunden des Indexpatienten, die im wesentlichen mit denen des 57-jährigen übereinstimmten. Diese fielen jedoch zusätzlich durch eine Verlängerung der impliziten b-Wellen-Latenzzeiten bei Stäbchen und Zapfen auf, die sonst nicht gefunden wurde.

Unterschiede gab es auch beim Manifestationsalter: Während der Indexpatient diese mit Ende 30 bemerkte, lag der subjektive Erkrankungsbeginn der 33-jährigen in der Teenagerzeit, in der die 15-jährige keine Einschränkung verspürte. Der 57-jährige bemerkte erste

Veränderungen im Alter von 53 Jahren. Auch der GF-Verlust war trotz der Tendenz zu einheitlichen Prädilektionsstellen nicht ganz vergleichbar. So zeigte der Indexpatient als einziger das beschriebene Ringskotom, während die anderen Betroffenen unterschiedlich ausgeprägte periphere, vorwiegend oben temporal gelegene Einschränkungen der Wahrnehmung kleinerer Lichtpunkte zeigten [59].

Die beschriebenen Befunde passen zu denen der von mir untersuchten Patienten. Insbesondere der sektorielle Befall mit unterschiedlich ausgeprägter peripherer GF-Einschränkung und einem Ringskotom scheint ein gemeinsames Charakteristikum, auch in anderen Fallberichten, zu sein. Der variable subjektive Erkrankungsbeginn zwischen Mitte 20 und 50 Jahren entspricht den Angaben in der Literatur, ebenso der insgesamt milde Krankheitsverlauf. Die beschriebenen ERG-Veränderungen mit einer Reduktion der Zapfen- und Stäbchenamplituden bei grenzwertigen bzw. vor allem im höheren Lebensalter verlängerten Latenzen zeigen beim Vergleich der etwa gleichaltrigen Patienten eine recht gute Übereinstimmung.

Die Erkrankung infolge der Mutation Rho Thr17Met scheint damit einer relativ gleichmäßigen Entwicklung zu folgen, so daß für die Betroffenen vorsichtige Prognosen zum individuellen Verlauf abgeleitet werden können.

4.2.1.2 Rho Cys187Tyr

Diese Mutation ist in einer Familie mit Betroffenen in 4 Generationen berichtet, die Kosegregation mit der Erkrankung konnte über 3 Generationen gezeigt werden [154]. Der Indexpatient wurde erstmalig im Alter von 7 Jahren wegen eines Strabismus divergens untersucht, der Fundus war dabei bereits auffällig hell und Chorioidea-Gefäße sichtbar, die Veränderungen wurden jedoch trotz der positiven Familienanamnese für RP nicht in diesem Sinne gedeutet. Bis zum Alter von 10 Jahren hatte sich eine Einschränkung der Nachtsehfähigkeit eingestellt, der Fundus zeigte eine deutliche Verengung der Gefäße und Hypopigmentierungen der Netzhaut mit deutlich durchscheinenden Chorioidea-Gefäßen, jedoch keine knochenkörperchenartigen Hyperpigmentierungen. Eine GF-Untersuchung im Alter von 12 Jahren zeigte eine Einschränkung auf zentrale 20° bei kleinen Lichtpunkten. Die Sehschärfe war bis zum Alter von 18 Jahren mit 20/25 annähernd normal gewesen, bei der Untersuchung mit 21 Jahren fiel erstmals eine Einschränkung auf 20/30 auf. Das Gesichtsfeld hatte in dieser Zeit nicht abgenommen, es traten jedoch jetzt eine „wächserne Blässe“ der Papille und eine irreguläre Struktur des RPE an der Makula sowie ein granuläres Muster in der Peripherie hinzu. Knochenkörperchenbildung wurde ebenfalls erstmalig im Alter von 21 Jahren beobachtet. Weitere Untersuchungen im Alter von 35 Jahren zeigten einen jetzt deutlich eingeschränkten Visus (20/60) und eine GF-Einschränkung auf 25° rechts und 10° links mit den größten Lichtpunkten. Der Fundus

zeigte das Vollbild der RP-Veränderungen mit „wächsern blasser“ Papille, ubiquitär verengten Gefäßen, einer feinen Granulierung des RPE an der Makula und einer diffusen RPE-Atrophie mit weißlichen Flecken der Netzhaut, jedoch weiterhin nur sehr gering ausgeprägten Hyperpigmentierungen. Die Reizschwelle in der Dunkeladaptation war links um 4,4 log-Stufen, rechts um mehr als 5,5 log-Stufen erhöht, das ERG nach konventionellen Methoden erloschen. Eine letzte Untersuchung im Alter von 39 Jahren erbrachte keine weitere Verschlechterung der Sehschärfe, trotz neu aufgetretener leichter posteriorer Kataraktbildung. Das GF war weiter auf 12° rechts und 7° links zurückgegangen.

Damit lag der Indexpatient im Schnitt seiner Familie, deren Erkrankungsverlauf gekennzeichnet ist durch eine früh einsetzende Nachtblindheit meist schon mit 5 Jahren, und einen schweren Verlauf mit ausgelöschtem ERG im jungen Erwachsenenalter (kein nachweisbares Stäbchen-ERG ab 22 Jahren), deutlichen, ab dem Kindesalter bestehenden und mit dem Alter progredienten, konzentrischen GF-Einschränkungen, stark erhöhter dunkeladaptierter Reizschwelle und einer ebenfalls mit dem Alter progredienten Abnahme der Sehschärfe durch eine Mitbeteiligung der Makula. Aus dem beschriebenen Rahmen fiel lediglich der Verlauf bei einem Familienmitglied heraus, der sich an Nachtsehfähigkeit im Kindesalter erinnern konnte, als einziger bis zum 42. Lebensjahr Auto gefahren war und bei der Untersuchung im Alter von 44 Jahren noch nachweisbare ERG-Wellen für Zapfen aufwies, wenn auch ebenfalls um mehr als 95% unter die Norm reduziert, und auch eine bessere Sehschärfe, ein deutlich größeres GF (besser als bei halb so alten Verwandten), sowie eine Restfunktion der Stäbchen in der Dunkeladaptation zeigte. Die Fundoskopie zeigte jedoch auch hier die typischen Veränderungen mit Gefäßverengungen, einer abgeblähten Papille und peripheren Granulierungen des RPE, wieder mit der familientypischen gering ausgeprägten Hyperpigmentierung [154].

Im Vergleich zu der beschriebenen Familie zeigt der von mir untersuchte Patient #44 einen für die beschriebene Mutation offenbar relativ typischen Verlauf. Das Einsetzen von Nachtblindheit und GF-Einschränkung liegen mit 20 Jahren eher etwas später als in der oben beschriebenen Familie, die später erhobenen Untersuchungsbefunde des Gesichtsfeldes, der Dunkeladaptation und der ERG-Auslöschung (siehe 3.1.1.2) passen zu denen des Indexpatienten im vergleichbaren Alter. Ebenfalls vergleichbar ist die Affektion der Makula mit einem deutlich eingeschränkten Visus im Alter von 40 Jahren. Dieses spricht für eine relative phänotypische Konstanz dieser Mutation.

Vergleich der mit Thr17Met und Cys187Tyr assoziierten Phänotypen

Im Vergleich der zwei von mir gefundenen Mutationen zeigt sich ein deutlich schwererer Verlauf bei der Mutation Cys187Tyr. Die beiden Mutationsorte sind nicht direkt vergleichbar, da sie sehr unterschiedliche Lokalisation und Funktionen haben. Es handelt

sich jedoch in beiden Fällen um wichtige Aminosäuren mit bekannter Funktion, deren Bedeutung durch die hohe Konservierung im Vergleich der Arten bestätigt wird. Auf die pathophysiologischen Überlegungen, die aus der Funktion der betroffenen Aminosäuren resultieren, wird später eingegangen (siehe 4.3.1).

Vergleicht man die Untersuchungsergebnisse mit einer Studie, die eine Korrelation zwischen Codonnummer, Lokalisation der Aminosäure zur Plasmamembran und klinischen Schweregrad herstellt und einen leichteren Verlauf bei Mutationen im intradiskalen Bereich sowie mit kleinerer Codonnummer feststellt [164], so läßt sich die zweite Aussage für die beiden im intradiskalen Bereich liegenden Mutationen bestätigen. Die These der Studie leitete sich ursprünglich aus dem Vergleich der in den USA häufigen Mutationen Pro23His und Pro347Leu her und brachte unter Einbeziehung dieser Mutationen (50% der untersuchten Patienten) hochsignifikante Zusammenhänge der Lokalisation und Codonnummer mit allen untersuchten Parametern (Sehschärfe, GF, dunkeladaptierte Reizschwelle und ERG). Unter Ausschluß der Mutationen Pro23His und Pro347Leu fielen die Zusammenhänge für Sehschärfe und GF unter das Signifikanzniveau. Im direkten Vergleich der von mir gefundenen Mutationen mit einem deutlichen Unterschied in der Codonnummer sind sicher alle Parameter signifikant verschieden, interessant ist jedoch der Vergleich mit beschriebenen benachbarten Mutationen.

Thr17Met ist relativ dicht bei Pro23His gelegen und zeigt wie diese und die weiteren in diesem Bereich beschriebenen Mutationen (Asn15Ser, Pro23Leu, Pro23Ala) einen relativ milden Verlauf mit später einsetzender Symptomatik und relativ langem Erhalt von Sehfähigkeit [5,21,114,140,174,179] im Vergleich der Rhodopsin-Mutationen und der adRP-Fälle überhaupt. Beschrieben ist in diesem Zusammenhang auch wiederholt ein eher sektorieller Befall der Netzhaut [83,114,174,179], so wie in der von mir molekulargenetisch untersuchten Familie, der jedoch von einer anderen Gruppe nicht bestätigt wird [21].

Cys187Tyr ist von vielen verschiedenen Mutationen auf engstem Raum umgeben: Gly182Ser, Ser186Pro, Ser186Trp, Gly188Arg, Gly188Glu, Asp190Gly, Asp190Asn und Asp190Tyr. Für 5 dieser Mutationen sind die klinischen Befunde publiziert (Gly182Ser [59], Ser186Pro [191], Gly188Arg [153], Asp190Tyr und Asp190Asn [60]). Es fallen dabei deutliche Unterschiede auf, denn die Mutationen der direkt benachbarten Codons 186 und 188 zeigen einen mittleren bis schweren Verlauf, ähnlich dem der Codon-187-Mutation, während die Mutationen an den weiter entfernten Codons 182 und 190 einen deutlich milderen Verlauf mit besser erhaltener Sehschärfe, geringeren fundoskopischen Befunden (tw. im Sinne einer sektoriellen RP), geringeren GF-Einschränkungen und noch im hohen Alter nachweisbaren ERG-Wellen, zumindest der Zapfenfunktion, zeigen.

Es scheint hierbei somit außer der Lage der Aminosäure und der Codonnummer noch weitere Einflußfaktoren zu geben, die den im Vergleich zu den sonstigen intradiskalen

Mutationen schwereren Verlauf speziell der Veränderungen des Codons 187 und seiner direkten Nachbarn bedingen (siehe 4.3.1). Der Schweregrad entspricht eher dem der Patienten mit extradiscalen Mutationen wie Pro347Leu [23], die nach den Ergebnissen der oben zitierten Studie [164] sehr viel schwerer betroffen sein müssten. Diese Diskrepanz stellt den postulierten festen Zusammenhang in Frage, spricht aber durch die Durchbrechung des sicher bestehenden Trends für die besondere Bedeutung der Codons 186-188 im Rhodopsin-Gen.

4.2.2 Peripherin

4.2.2.1 Peri Pro216Ser

Die bei der betroffenen dänischen Patientin beschriebene Symptomatik entspricht weitgehend der von in der Literatur beschriebenen Patienten [58]. Es wird dort für die Mutation eine zwischen 20 und ca. 45 Jahren einsetzende Einschränkung der Nachtsehfähigkeit und subjektiv im gleichen Zeitraum auffallende periphere GF-Einschränkung beschrieben. Die Untersuchungen zeigten an verschiedenen Patienten eine unauffällige Darstellung der vorderen Augenabschnitte, teilweise eingeschränkt durch eine hintere Kataraktbildung ab dem Alter von 50 Jahren. Die Sehschärfe war meist erst ab dem Alter von 40 Jahren leicht (ca. 20/30-40) und später mehr (bis 20/400) eingeschränkt. Die ERG-Ableitung zeigte bereits bei sehr jungen Patienten in den ersten zwei Dekaden diskret reduzierte Potentiale (20-40% unter der Norm für Stäbchen und Zapfen), die im Verlauf weiter zunahmen (70-85% unter der Norm mit 30-40 Jahren) bis hin zu ausgelöschten ERG-Signalen jenseits von 50 Jahren. Das fundoskopische Bild war geprägt von einer ausgeprägteren Hypopigmentierung, begleitet von Choroidea-Atrophie, mit nur wenigen knochenkörperchenartigen Pigmentansammlungen, die besonders in der Nähe der Gefäßarkaden und im posterioren Netzhautanteil auftraten. Weiterhin waren die Netzhautgefäße verengt, es fanden sich relativ häufig Veränderungen im Bereich der Foveae, und vor allem mit zunehmendem Alter eine abgeblaßte Papille.

Die Gesichtsfeldeinschränkungen waren zumeist nicht symmetrisch konzentrisch, sondern zeigten ein größeres erhaltenes GF in den jeweiligen nasalen Anteilen, so daß eine birnenartige Form entstand. Eine andere typische Erscheinung war ein unvollständiges Ringskotom in den perizentralen Anteilen. Die Dunkeladaptationsreizschwelle war nur leicht im Bereich von 1-3,5 log-Stufen erhöht. Insgesamt handelte es sich um einen vergleichsweise milden Verlauf mit späterem Beginn der schweren Veränderungen, die zudem noch relativ lokalisiert auftraten [58].

Die hier untersuchte dänische Patientin zeigt einen subjektiven Beschwerdebeginn eher im späteren Abschnitt des angegebenen Intervalls, auch wurden keine GF-Einschränkungen beobachtet. Die Augenhintergrundveränderungen sind insgesamt vergleichbar,

gemeinsame Veränderungen sind die Atrophie der Chorioidea, die posterioren Hyperpigmentierungen und die Ablassung der Papille, der (fakultative) Befall der Fovea war bei der Patientin nicht nachzuweisen. Die nur mit kleineren Lichtpunkten nachweisbaren GF-Einschränkungen entsprechen ungefähr denen der beschriebenen gleichaltrigen Patienten. Die ERG-Veränderungen entsprechen mit einer ausgelöschten Antwort auf schwache dunkeladaptierte Signale und Einschränkungen der Stäbchen- und Zapfenfunktion im Bereich von 50-85% ebenfalls den beschriebenen Einschränkungen gleichaltriger Betroffener [58]. Die klinischen Befunde scheinen damit altersbezogen vergleichbar zu sein.

4.2.2.2 Peri Pro216Leu

Für diese Mutation werden von den Erstbeschreibern [101] keine konkreten anamnestischen oder klinischen Angaben gemacht, der betroffene Patient wird als Teil eines Kollektivs mit adRP beschrieben, es wird von einem „frühen Stadium“ der RP berichtet. Dargestellt wird der pathologische ERG-Befund mit einer Reduktion der b-Wellenamplitude der Zapfen und der Stäbchen auf ca. 50% der unteren Normwerte und einer verlängerten b-Wellen-Latenz im Alter von ca. 30 Jahren [101]. Ausführlichere Beschreibungen anderer betroffener Patienten liegen in der Literatur nicht vor.

In den vergleichbaren Angaben zeigt die hier untersuchte Patientin einen deutlich schwereren Verlauf. Es wurden Sehschwierigkeiten seit der Kindheit mit der Unmöglichkeit der Berufsausübung mit Mitte 20 und ausgelöschten ERG-Antworten mit 25 Jahren berichtet. Die von Kajiwara et al. [101] für den 29-jährigen Patienten berichteten ERG-Potentiale entsprechen dabei wohl am ehesten denen der Tochter der Indexpatientin („eT“) im Alter zwischen 10 und 14 Jahren, so daß auch hier sowie bei dem Bruder der Indexpatientin, der anamnestisch noch schwerer als sie betroffen war, ein deutlich schwererer Verlauf vorliegt. Es zeigt sich somit eine ausgeprägte Variabilität des klinischen Verlaufs beim interfamiliären Vergleich, während die Symptomatik innerhalb der beschriebenen Familie eher homogen ausgeprägt ist.

4.2.2.3 Peri Ser218Pro

Diese Mutation ist bislang nicht in der Literatur beschrieben, so daß kein Vergleich mit Phänotypen in anderen Familien möglich ist. Der Vergleich innerhalb der Familie zeigt als Gemeinsamkeit den relativ milden Verlauf mit später klinischer Erstmanifestation. Der sehr späte subjektive Erkrankungsbeginn des Indexpatienten (#248) mit 67 Jahren erscheint in Anbetracht der 4 Jahre später sehr stark eingeschränkten Sehfunktion etwas unsicher, so daß hier eine Kontinuität zur Klinik des älteren Sohnes (#248 S1) gut vorstellbar ist. Der nur leicht betroffene jüngere Sohn (#248 S2) war zum Zeitpunkt der Untersuchung noch

etwas jünger (44 Jahre), so daß bei einer beschriebenen schnellen Progredienz der Klinik beim älteren Sohn im 5. Lebensjahrzehnt auch hier eine geringe Schwankung möglich ist. Andererseits ist in Anbetracht der bei Vater (#248) und älterem Sohn (#248 S1) beobachteten Progredienz auch ein Verlauf der Erkrankung als zunächst milde erste Phase mit anschließend unterschiedlich früh beginnender akzelerierter zweiter Phase ab dem ersten Bemerken von Symptomen denkbar. Aussagen darüber, ob die bekannten drei Verläufe damit einem einheitlichen Schema folgen oder einer stärkeren Variabilität unterworfen sind, sind letztlich erst nach längerer Verlaufsbeobachtung möglich.

Im Vergleich mit den anderen von mir gefundenen Mutationen in der näheren Umgebung zeigt sich relativ zu Peri Pro216Leu ein deutlich milderer Verlauf, die Einzelkasuistik der Patientin mit der Mutation Peri Pro216Ser erscheint vergleichbar.

In der Einordnung der drei Mutationen in die weiteren beschriebenen Veränderungen benachbarter Aminosäuren (Pro210Ser [109], Pro20Arg [72,147], Phe211Leu [48], Ser212Gly [54], Ser212Thr [56], Cys213Arg [147], Cys214Ser [161], Pro219del [101], Pro219Arg [147] und Arg220Trp [148]) zeigt sich, daß die Mutationen dieser Region insgesamt mit einem eher milden Verlauf von RP, einem späten Beginn und einer relativ langsamen Progredienz, einhergehen. Verschieden ist dabei die Verteilung der betroffenen Netzhautareale, meist ist RP-typisch vorwiegend die Netzhautperipherie betroffen, einzelne Mutationen zeigen jedoch fakultativ eine Makuladegeneration (Pro210 Arg, Pro219Arg).

Die trotz des relativ milden Verlaufs der Erkrankung bestehende Bedeutung des Abschnitts wird durch die Konservierung der Codons 210-220 im Vergleich der Arten (mit Ausnahme des Codon 217, in dem keine pathogene Veränderung bekannt ist) betont [188] sowie durch die direkte Nachbarschaft zu den Cysteinen 213 und 214, welche an der Bildung der strukturstabilisierenden Disulfidbrücke beteiligt sind. Bezüglich der pathophysiologischen Überlegungen zu den gefundenen Mutationen siehe 4.3.2.

4.3 Pathophysiologische Überlegungen

4.3.1 Rhodopsin

Die beiden von mir gefundenen Mutationen liegen im intradiscalen Anteil des Moleküls. Darüber hinaus ist bei beiden Aminosäuren eine konkretere Funktion bekannt.

Das Threonin an Codon 17 ist Teil der Erkennungssequenz Asn-Xaa-Thr/Ser (Xaa ist eine beliebige AS mit Ausnahme von Prolin), die Voraussetzung für die Glykosylierung an Asn15 ist. Asn15 ist die zweite Glykosylierungsstelle neben Asn2. Für die Mutationen an Asn15 sowie an Thr4 (Teil der Erkennungssequenz für die Glykosylierung an Asn2) ist ebenfalls das Auftreten von RP beschrieben [27,114]. Die Glykosylierung wird im Zusammenhang mit dem intrazellulären Transport des Rhodopsin-Moleküls gesehen (s.a.

1.2.2). Sie findet nach der Translation im Endoplasmatischen Retikulum (ER) sowie im Golgi-Apparat statt, die beide im Innensegment lokalisiert sind [114].

Die Mutation Thr17Met ist in verschiedenen Zellsystemen bezüglich der Funktionalität des Rhodopsins untersucht worden. Bei der Transfektion embryonaler Nierenzellen mit Thr17Met-Rhodopsin zeigte sich, daß die Expression auf einem insgesamt niedrigeren Niveau stattfand und vorwiegend Dimere oder größere Aggregate entstanden. Eine Retinalbindung wurde nicht festgestellt, ebenso war ein Transport zur Zellmembran nicht gegeben, vielmehr kumulierte das mutierte Rhodopsin im ER [183].

Die Befunde dieser Studie passen zu den Ergebnissen der Anwendung von Tunicamycin auf Frosch-Stäbchen-Zellen, in denen es nicht zu einem regelrechten Opsin-Transport kam, so daß dort auf die Glykosylierung als notwendige Voraussetzung für den Transport rückgeschlossen wurde [61].

Eine andere Untersuchung testete mit einem COS-1-Zellsystem im Vergleich die generelle Inhibition der Glykosylierung durch Tunicamycin (am Wildtyp-Rhodopsin) mit gezielter Mutagenese an der Glykosylierungsstelle Asn15 sowie Thr17Met. Es zeigte sich in diesem Versuch, daß die generelle Inhibition der Glykosylierung eine primär unauffällige Struktur des Moleküls sowie einen normalen intrazellulären Transport zuließ. Ebenso war die Bindung mit 11-cis-Retinal möglich, die Aktivierung von Transducin jedoch auf etwa 10% der Norm reduziert. Der Austausch Asn15Gln führte zu einem heterogeneren Bandenmuster in der elektrophoretischen Auftrennung, hinweisend auf ein Spektrum an Fehlfaltungen, dazu passend war die Retinalbindung deutlich eingeschränkt. Es kam nicht zu einem normalen intrazellulären Transport und die Aktivierung von Transducin war auf 1% der Norm reduziert.

Die Veränderung Thr17Met zeigte ein dazwischen liegendes Verhalten mit einer fast normalen Retinalbindung, einer dabei jedoch wie bei Asn15Gln sehr starken Einschränkung der Transducinaktivierung auf 1% der Norm. Die Retinalbindung blieb unter Lichteinfluß stabil, das Ausmaß der Transducinbindung durch das lichtaktivierte Rhodopsin war jedoch relativ zum Wildtyp sehr schnell rückläufig, wobei eine leichte Konformationsänderung nachweisbar war. Der intrazelluläre Transport wurde in diesem Fall nicht gezielt untersucht [106]. In einer späteren Publikation wird von der gleichen Arbeitsgruppe der normale intrazelluläre Transport für Thr17Met, jedoch eine leicht eingeschränkte Retinalbindungsfähigkeit beschrieben [105].

Aus den Untersuchungen wird geschlossen, daß der intrazelluläre Transport nicht von der generellen Glykosylierung abhängig ist, sondern von der korrekten Struktur an der Stelle 15-Asn. Die eingeschränkte Aktivierung von Transducin bei allen Veränderungen der Glykosylierung deutet darauf hin, dass daß die Glykosylierung für die Signaltransduktion eine Rolle spielt [106].

Zusammenfassend kann gefolgert werden, daß durch die Veränderung Thr17Met verschiedene Funktionen des Rhodopsin-Moleküls verlorenzugehen scheinen. Es kommt zu einer kleineren Strukturveränderung, welche die Retinalbindungsfähigkeit und, v.a. im Metarhodopsin II-Status, wesentlich stärker die Transducinbindung und –aktivierung einschränkt.

Die Datenlage bezüglich des intrazellulären Transports ist widersprüchlich. Geht man von einer Transportstörung aus, kommt ein zweiter Pathomechanismus über eine Akkumulation von Rhodopsin im Endoplasmatischen Retikulum im Innensegment sowie im Zwischenraum zwischen Innen- und Außensegment zum Tragen. Es sind dort keine Mechanismen zum Abbau von Rhodopsin vorhanden, so daß über die Akkumulation eine Zellschädigung mit nachfolgendem Untergang des Photorezeptors anzunehmen ist [44,61]. Ausgehend von den anderen G-Proteinen ist die Glykosylierung darüber hinaus für die Membraninsertion und die Proteinfaltung von Bedeutung [79].

Bereits kurz nach der Erstbeschreibung der Struktur des Rhodopsin-Moleküls wurde eine Disulfidbrücke zur Stabilisierung der dreidimensionalen Struktur postuliert [104]. In einem Zellsystem konnte an bovinem Rhodopsin nach gezielter Mutagenese gezeigt werden, daß Cys187Ser in deutlich reduzierter Menge exprimiert wird, nicht normal glykosyliert wird und nicht zur Bindung von Retinal geeignet ist, woraus sich eine Veränderung der dreidimensionalen Struktur (Tertiärstruktur) mit Verhinderung der dafür nötigen Tasche ableiten läßt. Als Folge davon war die Unmöglichkeit der Aktivierung von Transducin nachweisbar [104]. Da ähnlich schwere Einschränkungen als Folge der Veränderung eines einzelnen Cysteins nur bei Cys110 auftreten, konnte auf die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen Cys110 und Cys187 rückgeschlossen [104] und später die Notwendigkeit dieser zwei AS zur Ausbildung einer Disulfidbrücke bewiesen werden [103]. Die anderen Cysteine des Rhodopsin-Moleküls waren ohne unmittelbare Auswirkung auf die dreidimensionale Struktur, die Retinalbindungsfähigkeit oder Aktivierung von Transducin austauschbar [104].

Die in-vitro-Synthese eines Rhodopsins mit nur den Cysteinen 110, 185 und 187 erbrachte ein Gemisch aus unterschiedlich stark fehlgefalteten Proteinen, die teilweise kaum vom Wildtyp-Rhodopsin zu unterscheiden waren, andererseits auch teilweise keine der Funktionen des Moleküls mehr hatten. Der Anteil des retinalbindenden Rhodopsins schwankte dabei zwischen 20 und 70%, was evtl. einen Erklärungsansatz für unterschiedliche Ausprägungen des klinischen Phänotyps liefert. Da bei einigen der fehlgefalteten Rhodopsine dennoch die Existenz einer Disulfidbrücke nachweisbar war und nur die drei Cysteine 110, 185 und 187 zur Verfügung standen, wurde hier die Bildung einer abnormen Verbindung (110-185 oder 185-187) angenommen, ohne daß ihre Existenz konkret nachgewiesen wurde [119].

Gegen die Ausbildung einer alternativen „falschen“ Disulfidbrücke bei Fehlen von Cys110 oder Cys187 sprechen Untersuchungen an Zellsystemen, die bei Anwesenheit von nur Cys110/Cys185 oder Cys185/Cys187 freie Sulfhydrylgruppen nachweisen konnten, die sonst die Disulfidbrücke bilden würden [103].

Andererseits konnte in Komigrationsstudien von Rhodopsinfragmenten und in der Massenspektrometrie die Bildung von alternativen Disulfidbrücken nachgewiesen werden [90,113].

Unabhängig von der Einschätzung der Ausbildung von alternativen Disulfidbrücken stimmen die Studien in der Auswirkung der Veränderung der Cysteine 110 und 187 auf die Tertiärstruktur mit der Anordnung der transmembranen Abschnitte zueinander überein.

Die Konservierung der Cysteine 110 und 187 (bzw. der korrespondierenden Codons) zwischen allen bekannten Sehpigmenten sowie die Feststellung einer analogen Disulfidbrücke bei den anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit Bedeutung für die Funktion der jeweiligen Proteine macht die Bedeutung dieses Strukturmerkmals über das Rhodopsin-Molekül hinaus deutlich [103,104].

Zusammenfassend kann als Pathomechanismus für Cys187Tyr eine starke Veränderung der dreidimensionalen Struktur des Proteins angenommen werden, da die wichtige Disulfidbrücke 110-187 bei Fehlen eines „Partners“ nicht mehr möglich ist. Bei der starken Tertiärstrukturveränderung sind in der Folge Beeinträchtigungen aller weiteren Funktionen des Proteins anzunehmen, angefangen von der Retinal-Bindung und Phototransduktion bis hin zur Glykosylierung und zum davon abhängigen intrazellulären Transport und der Membranintegration mit den oben beschriebenen Konsequenzen der Akkumulation [nach 155].

4.3.2 Peripherin

Bei den dicht beieinander liegenden Peripherin-Mutationen möchte ich vertiefend auf die Pathophysiologie von Veränderungen des umgebenden Proteinabschnitts und die mögliche Beteiligung der gefundenen Mutationen eingehen.

Aminosäuren mit bekannter Funktion innerhalb des Proteinabschnittes sind die konservierten Cysteine an den Positionen 213 und 214, die durch die Möglichkeit der Disulfidbrückenbildung Verbindungen innerhalb des Moleküls und zwischen Molekülen stabilisieren können [13]. Allerdings ist von den konservierten Cysteinen im Peripherin-Molekül (Cys150, 165, 166, 213, 214, 222, 250) nur Cys150 an der Bildung einer Disulfidbrücke mit dem anderen Peripherin-Molekül im Dimer beteiligt. Durch gezielte Mutagenese konnte nachgewiesen werden, daß es trotz Veränderungen der anderen Cysteine (u.a. 213, 214 und 222) zur Ausbildung von Peripherin-Dimeren (Peripherin)₂ kommt [68].

Eine Heterodimerisierung zwischen Peripherin und Rom-1 ist nicht möglich. Im Gegenzug verbindet sich $(\text{Peripherin})_2$ bevorzugt mit $(\text{Rom-1})_2$ zu Heterotetrameren; Homotetramere entstehen nur im Falle des (funktionellen) Fehlens von Rom-1. (Die Peripherin-Homotetramere sind dabei im Gegensatz zu den Rom-1-Tetrameren funktionell, weshalb die Peripherinfunktion nicht von Rom-1 kompensiert werden kann.) [13,71]

Im Zusammenhang mit der nicht-kovalenten, jedoch sehr stabilen Verbindung zwischen $(\text{Peripherin})_2$ und $(\text{Rom-1})_2$, die auf hydrophobe Reaktionen zurückgeführt wird [69], ist die starke Homologie der beiden Proteinabschnitte, die durch die Codons 207-222 der entsprechenden Gene kodiert werden, von Bedeutung [13]. Speziell nicht-kovalente Bindungen sind stark von der exakten Faltstruktur abhängig, die von der Intaktheit der AS-Sequenz abhängt.

Da die funktionelle Einheit des Peripherin-Moleküls das Tetramer ist, kommt der Ausbildung dieser Struktur eine besondere Bedeutung zu [71]. Hier spielen die konservierten Cysteine im Peripherin-Molekül eine wichtige Rolle. Gezielte Mutagenese an Cys165 und Cys214 konnte nachweisen, daß dadurch die Ausbildung von Tetrameren verhindert wird, während die Veränderung an Cys150 trotz fehlender Disulfidbindung einer Tetramerisierung nicht entgegen steht.

Die Veränderungen an Cys214 und Cys165 führen statt dessen zu einer Ausbildung größerer Aggregate, wie sie auch in der Untersuchung der weiteren zur Dimerisierung geeigneten Cystein-Veränderungen (Cys166, 213, 222, 250) zu beobachten war [68].

Der Mechanismus, über den Veränderungen an Cys214 die Tetramerisierung verhindern, liegt am ehesten in der Beeinflussung der Faltstruktur (Sekundär- und Tertiärstruktur) des Peripherin-Moleküls. Da die konservierten Cysteine im Bereich des intradiscalen/extrazellulären Raumes mit nichtreduzierendem Milieu liegen, sind sie Kandidaten für eine intramolekulare Disulfidbrückenbindung, die wesentlich die Tertiärstruktur des Moleküls prägt und stabilisiert [68]. Das Vorliegen mindestens einer intramolekularen Disulfidbrücke kann anhand der veränderten Mobilität unter Zugabe von oxidiertem Glutathion (Disulfidbrücken-fördernd) in vitro nachgewiesen werden [199].

Bei der Betrachtung der drei gefundenen Peripherinmutationen fällt auf, daß in allen 3 Fällen die AS Prolin beteiligt ist, entweder durch Wegfall an Position 216 oder durch Hinzukommen an Position 218. Prolin stellt in der AS-Kette eine „Ecke“ dar und beeinflusst so auf besondere Weise die Sekundärstruktur. Der Austausch durch eine andere AS oder das Hinzukommen von Prolin läßt damit eine besonders ausgeprägte Veränderung der Sekundärstruktur erwarten [122].

Eine Studie konnte einen Zusammenhang zwischen Schwere der Klinik und Ausmaß der Sekundärstrukturveränderung im Peripherin-Molekül nachweisen. Es wurde mit Hilfe eines Computerprogramms die Sekundärstruktur bei jeder AS bestimmt und das Ausmaß der

Sekundärstrukturveränderung als Anzahl der durch eine Mutation ausgelösten Strukturübergänge angegeben. Es zeigt sich dabei, daß die Mutation einer AS Auswirkungen auf die 12 benachbarten AS haben kann. Im hier untersuchten Bereich resultieren beispielsweise aus Cys214Ser die folgenden Veränderungen: 207 Turn(T) → Beta-Struktur(B), 208 Turn(T) → Beta-Struktur(B), 210 T→B, 215 T→B. Auch ohne Beteiligung von Cys214 an der Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke (s.o) ist somit eine Pathogenität über eine größere Gesamtstrukturveränderung mit Verhinderung der nicht-kovalenten Bindungen denkbar [134].

Die von mir gefundenen Mutationen Pro216Leu und Pro216Ser wurden hier ebenfalls in ihren Auswirkungen auf die unmittelbare Struktur des Abschnitts untersucht und zeigten vergleichbare Veränderungen (Pro216Leu: 212(T→B), 213(T→B), 222(B→T); Pro216Ser: 210(T→B), 212(T→B), 222(B→T)). Sie können damit die Sekundärstruktur im Bereich der Cysteine 213 und 214 verändern, so dass über den gleichen Mechanismus ein Funktionsverlust des Proteins denkbar ist [134].

Im In-vitro-Versuch konnte die Wirkung von Peripherin auf mikrosomale Vesikel in Form einer Abflachung der sonst runden Struktur gezeigt werden. Mit gezielter Mutagenese wurde unter anderem die Mutation Pro216Leu untersucht. Es waren dabei keine abgeflachten Vesikel nachweisbar, so daß ein Funktionsverlust des Proteins damit in vitro bewiesen werden konnte [199].

Für den weitergehenden Pathomechanismus vom Funktionsverlust zur Retinopathie wird für die heterozygote Mutation Cys214Ser eine Haploinsuffizienz des Peripherin-Gens, wie sie auch bei der rds-Maus beschrieben ist, angenommen. Bei der rds-Maus ist die funktionelle Inaktivierung des Gens durch eine 9,2 kb-Insertion bedingt und führt im heterozygoten Stadium zu verkürzten, in hohem Maße disorganisierten Außensegmenten und zur progressiven Retinadegeneration. Ein zweiter denkbarer Mechanismus ist der Anfall der größeren Peripherin-Aggregate, die evtl. kumulieren können und so den Zelluntergang fördern [68]. Beide Mechanismen halte ich auch für die von mir gefundenen Mutationen für zutreffend.

4.4 Zusammenhang zwischen ERG und Schädigungsmuster

Detaillierte ERG-Befunde liegen mir für die Patienten mit den Mutationen Peri Ser218Pro und Peri Pro216Ser vor. Diese möchte ich anhand der in 1.1.6.3 beschriebenen Computermodele und der daraus abgeleiteten Schädigung mit den oben beschriebenen pathophysiologischen Ansätzen und den klinischen Befunden der Patienten vergleichen.

Die Patientin mit der Mutation Peripherin Pro216Ser (#93) zeigt gegenüber schwachen weißen Blitzen (stäbchenvermittelt) eine sehr stark reduzierte Antwort mit auf 12% der untersten Norm reduzierter Amplitude und deutlich verlängerter b-Wellen-Latenz. Die Amplitude der Zapfen-b-Welle ist mit 54% der unteren Norm bei helladaptierten weißen Lichtreizen (29% bei Flackerlicht) etwas besser erhalten, jedoch sind auch hier die Latenzzeiten über die Norm verlängert. Die gemischte Stäbchen-Zapfen-Antwort ist ebenfalls deutlich auf 38% reduziert. Die Untersuchung ergibt leider keine harten Messwerte zur a-Welle, die Abschätzung von 50 μ V liegt bei 29% der unteren Norm.

Von den im Modell gegebenen Werten findet sich damit für Stäbchen und Zapfen eine Verlängerung der b-Wellen-Latenz, die mit einer Veränderung der Photorezeptorsensitivität (δ_{p3}) korreliert ist. Die zusätzliche Reduktion der b-Wellen-Amplitude ist durch ihr gemeinsames Auftreten mit der verlängerten b-Wellen-Latenz durch Veränderungen an den Parametern Rm_{p3} und δ_{p2} erklärbar. Eine Differenzierung ist über die Beurteilung der führenden Zacke der a-Welle möglich. Der abzuschätzende Wert von 50 μ V für die a-Wellen-Amplitude in der gemischten Stäbchen-Zapfen-Antwort läge deutlich unter der Norm von >170 μ V (29%), was für eine Einschränkung der Maximalamplitude der Photorezeptorenschicht (Rm_{p3}) spricht. Damit resultiert als Schädigungsort schwerpunktmäßig die Photorezeptorenschicht, deren Sensitivität und maximale Erregbarkeit herabgesetzt sind. Die fundoskopischen Befunde der Patientin mit atrophischen Herden im RPE und in der Choriokapillaris lassen auch eine Schädigung der Inneren Körner- und Ganglienzellschicht möglich erscheinen. Dieses hätte eine Einschränkung der Sensitivität δ_{p2} zur Folge, die jedoch keinen Einfluß auf die a-Wellen-Amplitude haben kann. Die ERG-Untersuchung macht durch die reduzierte a-Wellen-Amplitude diese Ursache für die ERG-Veränderungen unwahrscheinlich.

Da in diesem Fall nur Angaben zu einer einzelnen Patientin zu einem einzelnen Zeitpunkt vorliegen, lassen sich keine Aussagen über die Reihenfolge der Schädigung machen.

In der Familie mit Peri Ser218Pro ist das ERG bei dem 71jährigen Indexpatienten (#248) ausgelöscht, so daß hier keine Aussagen über den Mechanismus ableitbar sind. Der klinisch schwerer betroffene ältere Sohn (#248 S1) zeigt ein ebenfalls deutlich pathologisches ERG mit reduzierten b-Wellen-Amplituden für Stäbchen (19% der untersten Norm mit schwachen weißen Blitzen, nicht detektierbar mit blauen Stimuli) und Zapfen

(25%) sowie in der gemischten Stäbchen-Zapfen-Antwort (16%). Die Stäbchen sind im direkten Vergleich etwas schwerer betroffen (19% vs. 25%). Die b-Wellen Latenzen sind jeweils unauffällig, die a-Wellen-Amplitude lässt sich nur abschätzen, liegt jedoch mit ca. 30 μ V sicher unterhalb des unteren Normwertes von 170 μ V (18%).

Beim zweiten Sohn (#248 S2) sind die Veränderungen weniger ausgeprägt. Die b-Wellen-Amplituden der Stäbchen sowie der gemischten Antwort sind auf 58% und 54% der untersten Norm reduziert, die Zapfenantwort liegt im normalen Bereich. Auffällig ist hier die leicht verlängerte b-Wellen-Latenz für Zapfen, während die Latenzen für Stäbchen und in der gemischten Antwort unauffällig sind. Die bei diesem Patienten gemessenen Parameter der a-Welle sind jeweils unauffällig.

Aus den Daten der Brüder #248 S1 und #248 S2 läßt sich keine Alterskorrelation der Progredienz ableiten, da die Untersuchung des schwerer betroffenen älteren Bruders wesentlich früher stattfand (38 vs. 44 Jahre). Dennoch kann bei gleicher Mutation der gleiche Schädigungsmechanismus angenommen werden, so daß die Befunde in Relation zum klinischen Fortschreiten der Erkrankung die Reihenfolge der Schädigung verschiedener Zellschichten an der Netzhaut abbilden können.

Bei #248 S2 sind die pathologischen Befunde die Reduktion der b-Wellen-Amplitude für Stäbchen und der Stäbchen-Zapfen-Antwort bei unauffälliger Zapfen-b-Wellen-Amplitude. Die isolierte Veränderung der Amplitude der b-Welle bei normaler Stäbchen-Latenz weist nach den Ausführungen in 1.1.6.3 auf Veränderungen der Ganglienzell- oder Inneren Körnerschicht-Sensitivität (δ_{p2}) oder der Gesamtkonstanten c hin. Da die bei diesem Patienten bestimmte a-Wellen-Amplitude normal ist, weist dieses nach dem Computermodell auf eine vorwiegende Schädigung der Ganglienzell- und der Inneren Körnerschicht hin. Die isolierte Verlängerung der Zapfen-b-Wellen-Latenz deutet auf eine eingeschränkte Sensitivität der Zapfen.

Die Veränderungen bei #248 S1 stellen gegenüber #248 S2 im wesentlichen eine Abnahme der b-Wellen-Amplituden dar, die jetzt auch die Zapfen mit einschließen. Die Latenzen der Stäbchen sind weiterhin unauffällig, bei diesem Patienten auch die der Zapfen, so daß es sich bei der verlängerten Zapfen-b-Wellen-Latenz nicht um einen konstanten (oder progredienten) Befund handelt. Die Kombination aus reduzierter b-Wellen-Amplitude und normaler b-Wellen-Latenz weist auf Veränderungen an δ_{p2} (Sensitivität der Ganglienzell- oder der Inneren Körnerschicht) oder c (Netzhautfläche) hin. Bei einer deutlich reduzierten a-Wellen-Amplitude von ca. 30 μ V (18%) spricht dieses allerdings eher für eine Veränderung der Gesamtkonstanten c und damit der zur Verfügung stehenden Netzhautfläche.

Für die geschilderten Ableitungen aus den b-Wellen ergeben sich aus den klinischen Befunden keine weiteren stützenden Ergebnisse. Bei beiden Brüdern sind zum Zeitpunkt

der Untersuchung keine kompletten Gesichtsfeldausfälle nachweisbar, die ausreichen, um die zur Verfügung stehende Netzhautfläche in einem solchen Ausmaß zu verringern. Fundoskopisch waren ebenfalls keine atrophischen Bezirke in dieser Größenordnung darstellbar. Allerdings sind nach den Ausführungen in 1.1.6.3 auch sektorielle Reduktionen der Sensitivität im Bereich ab 0,5 log-Stufen ausreichend für einen signifikanten Effekt auf die Gesamtkonstante [87]. Für Veränderungen der Körnerschicht gibt es in den augenärztlichen Untersuchungen keine unmittelbare Korrelation, so daß diese Aussage nicht durch die Fundoskopie verifiziert werden kann. Histologische Untersuchungen an Netzhäuten von RP-Patienten zeigten ein breites Spektrum an Veränderungen der Zahl an Ganglienzellen, die nicht unmittelbar mit dem klinischen Schweregrad der Erkrankung korrelierten; eine signifikante Abnahme der Zahl von Bipolaren war demgegenüber nur bei fortgeschrittener RP nachweisbar [166], s.a. 1.1.6.4.

Die reduzierte a-Wellen-Amplitude, wie sie bei #93 und #248 S1 vorliegt, spricht für sich genommen schon für eine eingeschränkte Funktion der Photorezeptoren, die Untersuchung dieser frühen Welle ermöglicht jedoch keine Differenzierung in eine Einschränkung der Sensitivität (δ_{p3}) oder der Maximalantwort ($R_{m_{p3}}$). Die Schädigung der Photorezeptoren entspricht dem angenommenen Pathomechanismus, bei dem nachgeordnete Zellschichten erst in der Folge der Photorezeptorendegeneration betroffen wären.

Im Vergleich der Mutationen und der sich aus dem ComputermodeLL ergebenden Konsequenzen kommt es zu einer Diskrepanz, da die Mutationen nach 4.3.2 einen vergleichbaren Pathomechanismus und demgemäß auch ähnliche Ergebnisse in der ERG-Auswertung erwarten lassen. Während sich die Ergebnisse für Peri Pro216Ser gut mit dem für Retinitis pigmentosa allgemein und Peripherin im speziellen zu erwartenden Pathomechanismus vereinbaren lassen, weisen die ERG-Befunde bei #248 S2 (Peri Ser218Pro) in Richtung einer frühen Schädigung tieferer Netzhautschichten, die von #248 S1 auf regionale Netzhautschäden hin.

Bei der aus der reduzierten a-Welle (#248 S1) anzunehmenden Photorezeptorenschädigung nehme ich dennoch einen Pathomechanismus mit primärer Schädigung des Photorezeptors an. Die sich in dieser Familie konstant von den üblichen Ergebnissen (verminderte Amplitude und verlängerte Latenz) unterscheidenden Befunde scheinen mir jedoch nicht zufällig zu sein. In Anbetracht der später deutlichen Zunahme der Gesichtsfeldausfälle in der Nachuntersuchung von #248 S1 im Alter von 48 Jahren sowie der ausgeprägten Ringskotome bei #248 im Alter von 71 Jahren sind die Veränderungen wohl eher den Netzhautausfällen (wie oben beschrieben auch den partiellen Ausfällen mit erniedrigter Sensitivität) oder einer Reduktion an Ganglienzellen als einer primären Beteiligung der Inneren Körnerschicht (Bipolare) zuzuschreiben. Um dieses zu

untermauern, wären ERG-Verlaufskontrollen bei den Brüdern #248 S1 und S2 sowie histologische Untersuchungen der Netzhaut bei diesen oder anderen Patienten mit vergleichbaren ERG-Befunden interessant. Die mir bekannten histologischen Untersuchungen korrelieren die Befunde nicht mit derart differenzierten ERG-Befunden [166].

Für die Mutationen Peri Pro216Leu sowie Rho Cys187Tyr waren weder die Original-ERG-Aufzeichnungen der von mir untersuchten Patienten noch entsprechend detaillierte Angaben in der Literatur zugänglich.

Für die Mutation Rho Thr17Met liegen detaillierte ERG-Angaben in der Fallbeschreibung einer Familie vor [59]. Da die weiteren klinischen Angaben und die mir zugänglichen ERG-Daten meiner Patienten eine weitgehende Übereinstimmung zeigen (siehe 3.1.1.1 und 4.2.1.1), sollen stellvertretend die vollständigeren Angaben der Literatur (inklusive Angaben zur a-Welle) diskutiert werden.

Es ist hier im jugendlichen Alter eine reduzierte Stäbchen-b-Wellen-Amplitude (26% unter der Norm) bei unauffälliger Stäbchen-b-Wellen-Latenz und insgesamt unauffälligen Ergebnissen der Zapfen berichtet. Für das Alter von 33 Jahren werden eine Einschränkung der b-Wellen-Amplitude für Stäbchen (37% unter Norm) und Zapfen (23% unter Norm) bei normalen Latenzzeiten beschrieben. Ein 51-jähriger Patient wird mit einer weiteren Reduktion der b-Welle auf 60% unter Norm für Stäbchen und 30% unter Norm für Zapfen bei grenzwertigen Latenzzeiten berichtet, während ein 57-jähriger Patient dann außer einer weiteren Reduktion der Amplituden (60% und 37% unter Norm) auch eine verlängerte Latenz aufweist. Die a-Wellen werden summarisch mit reduzierter Amplitude und normaler Latenz berichtet.

Nach dem ComputermodeLL spricht die Kombination aus reduzierter b-Wellen-Amplitude, normaler b-Wellen-Latenz und erniedrigter a-Wellen-Amplitude am ehesten für eine Veränderung der Gesamtkonstanten c, die für die funktionale Netzhautfläche steht. Die Reduktion der a-Wellen-Amplitude spricht für sich genommen für eine Schädigung der Photorezeptoren, wobei die typischen weiteren Veränderungen einer primären Verlängerung der a- oder b-Wellen-Latenz initial fehlen. Die Veränderungen des ältesten berichteten Patienten mit der zusätzlichen Verlängerung der b-Wellen-Latenz sprechen dann für eine Erniedrigung der Maximalamplitude der Rezeptoren (R_{mp3}), ein Befund, der in das pathophysiologische Bild einer primären Photorezeptorschädigung paßt.

Der Rückschluß auf die Reduktion der aktiven Netzhautfläche wird hier, im Gegensatz zu Peri Pro218Ser, durch den klinischen Untersuchungsbefund mit regionalen Unterschieden der Netzhautschädigung und der Klassifizierung als sektorielle RP unterstützt.

Alternativ wäre, wie auch schon bei Peri Pro218Ser, eine durch einige Mutationen bei Peripherin und Rhodopsin vermehrte Wirkung auf die nachgeordneten Zellen im Sinne einer vorzeitigen Mitschädigung mit funktionellem Ausfall von Netzhautarealen zu erwägen, welche evtl. durch histologische Untersuchungen zu stützen wäre.

5. Zusammenfassung

Retinitis pigmentosa ist eine Gruppe genetisch und phänotypisch heterogener Netzhauterkrankungen, die durch die gemeinsamen Merkmale einer progredienten Seheinschränkung mit Verlust der Nachtsehfähigkeit, Einengung des Gesichtsfeldes und progressivem Untergang der Photorezeptoren gekennzeichnet ist. Der Name resultiert aus dem fundoskopischen Bild mit Hyper- und Hypopigmentierungen. Eine entzündliche Reaktion liegt der Erkrankung nicht zugrunde, entgegen der Annahme der frühen Beschreiber.

Von den bislang beschriebenen zahlreichen Genen, die mit autosomal-dominant erblicher RP in Verbindung gebracht werden, habe ich zwei (Rhodopsin und Peripherin/rds) auf Mutationen in einem Kollektiv aus dänischen und deutschen Patienten untersucht. Die dabei gefundenen 2 Rhodopsin- (Rho Thr17Met und Cys187Tyr) und 3 Peripherin-Mutationen (Peri Ser216Pro, Ser216Leu und Pro218Ser) entsprechen in etwa der Menge an statistisch zu erwartenden Veränderungen. Vier der fünf Mutationen waren als krankheitsauslösend vorbeschrieben. Bei der fünften (Peri Pro218Ser) kann anhand der Kosegregation mit dem Erkrankungsphänotyp und des Ausschlusses bei einem gesunden Kollektiv die pathogene Wirkung des Aminosäureaustausches als sehr wahrscheinlich angesehen werden.

Der Vergleich der klinischen Befunde der Patienten mit den in der Literatur veröffentlichten Kasuistiken unterstützt die These einer gewissen Konstanz in der Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei dennoch vorhandener inter- und intrafamiliärer Heterogenität.

Die Übersicht und Einordnung in die Ansätze zum Pathomechanismus zeigt für die dicht zusammenliegenden Peripherin-Mutationen (Codon 216-218) als gemeinsames Merkmal die Beeinflussung der Struktur einer Disulfidbrückenbindungsstelle, wodurch sich die dreidimensionale Struktur des Proteins ändert, die Tetramerisierung verhindert wird und so die Funktion des Proteins nicht mehr gewährleistet ist.

Bei den Mutationen im Rhodopsin-Gen werden zwei bekannte Funktionen des Proteins durch die Mutationen blockiert. Mit Rho Thr17Met geht die Erkennungssequenz einer der Glykosylierungsstellen des Proteins verloren, woraus sich eine Reduktion der Retinalbindungsfähigkeit, der Bindung und Aktivierung von Transducin sowie fraglich eine Störung des intrazellulären Transportes von Rhodopsin ergeben. Bei Cys187Tyr wird einer der Partner der Disulfidbrücke verändert, die für die korrekte Tertiärstruktur des Proteins und davon abhängige Funktionen wie die Retinalbindungsfähigkeit und die Aktivierung der weiteren Schritte der Signalkaskade von essentieller Bedeutung ist.

Über den Funktionsverlust hinaus kommt es durch die Veränderungen an den Peripherin- und Rhodopsin-Proteinen zu einer aktiven Schädigung der Zelle durch Akkumulation

fehlerhafter Proteine (teilweise zusätzlich im falschen Kompartiment) und so zu einem dominant negativen Effekt. Über Mechanismen des kontrollierten Zelltodes werden die betroffenen Photorezeptorzellen trotz theoretisch erhaltener reduzierter Restfunktion gezielt zur Apoptose gebracht.

Zum Vergleich des theoretisch angenommenen Pathomechanismus mit den meßbaren Veränderungen der Patienten habe ich an einigen ausgewählten Patienten anhand eines Computermodells die vermutlichen Schädigungsorte bestimmt. Neben einer primären Schädigung der Photorezeptoren weisen die Ergebnisse bei einigen Patienten auf eine relativ frühe Beteiligung auch tieferer Netzhautschichten sowie den Funktionsausfall von Netzhautarealen hin. Diese lassen sich nur teilweise in den fundoskopischen Befunden nachvollziehen, unterstützen aber die These eines Zelluntergangs durch Apoptose, die durch zellübergreifend wirksame Faktoren vermittelt wird.

Als praktische Konsequenz der Arbeit konnte in den Familien die konkrete Ursache der familiären Erkrankung benannt werden und so weiteren klinisch (bislang) gesunden Familienmitgliedern eine Aussage über ihren Genträgerstatus gemacht werden. Konkret konnten in einer Familie die Sehprobleme einer Tochter der Indexpatientin als beginnende Symptome von RP benannt werden und so eine genetische Beratung durch den bekannten Hintergrund detaillierter erfolgen.

In einer zweiten Familie mit spätem Erkrankungsbeginn konnte die klinisch gesunde Tochter eines Erkrankten von der Sorge um eine möglicherweise noch lauernde Erkrankung befreit werden.

Therapeutische Optionen resultieren zum jetzigen Zeitpunkt für die Erkrankten noch nicht. In Tiermodellen war bislang ein kuratives Vorgehen bei der primär haploinsuffizienten rds-Maus durch Virus-assoziierten Transfer eines weiteren gesunden Allels möglich. Die erforderlichen Maßnahmen für die Behandlung dominanter Mutationen im Rhodopsin- und Peripherin-Gen sind zwar im Tiermodell bereits erfolgreich angewandt worden, dabei jedoch wesentlich aufwendiger, so daß sich die Frage der breiten Verfügbarkeit solcher Therapieformen stellt. Dennoch ergibt sich aus der Beforschung der molekularen Grundlagen genetischer Erkrankungen die reale Hoffnung auf zukünftige Therapiemöglichkeiten.

6. Literaturverzeichnis

1. Ainsworth PJ, Surh LC, Coulter-Mackie MB (1991) Diagnostic single strand conformational polymorphism (SSCP): a simplified non-radioisotopic method as applied to a Tay-Sachs B1 variant. *Nucleic Acids Research* 19: 405-406
2. Ali RR, Sarra GM, Stephens C, Alwis MD, Bainbridge JW, Munro PM, Fauser S, Reichel MB, Kinnon C, Hunt DM, Bhattacharya SS, Thrasher AJ (2000) Restoration of photoreceptor ultrastructure and function in retinal degeneration slow mice by gene therapy. *Nat Genet* 25: 306-310
3. Al-Maghteh M, Gregory C, Inglehearn C, Hardcastle A, Bhattacharya S (1993) Rhodopsin Mutations in Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa. *Human Mutation* 2: 249-255
4. Al-Maghteh MN, Inglehearn CF, Keen TJ, Evans K, Moore AT, Jay M, Bird AC, Bhattacharya SS (1994) Identification of a sixth locus for autosomal dominant retinitis pigmentosa on chromosome 19. *Hum Mol Gen* 3: 351-354
5. Alvarez AI, Arostegui E, Martin R, Molina M, Duran M, Tejada MI (1999) Role of the Pro23Leu mutation in a family affected by retinitis pigmentosa in the Basque Country. *Clin Genet* 56: 407-408
6. Amado RG, Chen ISY (1999) Lentiviral vectors—the promise of gene therapy within reach? *Science* 285: 674-676
7. Anderson B, Gibbs RA (1994) PCR and DNA Sequencing. In: Mullis KB, Ferré F, Gibbs RA (Hrsg.) *Birkhäuser Boston: The Polymerase Chain Reaction*, S. 201-213
8. Apfelstedt-Sylla E, Theischen M, Rüther K, Wedemann H, Gal A, Zrenner E (1995) Extensive intrafamilial and interfamilial phenotypic variation among patients with autosomal dominant retinal dystrophy and mutations in the human RDS/peripherin gene. *Br J Ophthalmology* 79: 28-34
9. Arikawa K, Molday LL, Molday RS, Williams DS (1992) Localization of Peripherin/RDS in the Disk Membranes of Cone and Rod Photoreceptors: Relationship to Disk Membrane Morphogenesis and Retinal Degeneration. *The Journal of Cell Biology* 116: 659-667
10. Ayres C (1886) Retinitis pigmentosa. *American Journal of Ophthalmology* 4:81
11. Bareil C, Hamel CP, Delague V, Arnaud B, Demaille J, Claustres M (2001) Segregation of a mutation in CNGB1 encoding the β -subunit of the rod cGMP-gated channel in a family with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Hum Genet* 108: 328-334
12. Bascom RA, Liu L, Heckenlively JR, Stone EM, McInnes RR (1995) Mutation analysis of the ROM1 gene in retinitis pigmentosa. *Hum Mol Gen* 4: 1895-1902

13. Bascom RA, Manara S, Collins L, Molday RS, Kalnins VI, McInnes RR (1992) Cloning of the cDNA for a Novel Photoreceptor Membrane Protein (rom-1) Identifies a Disk Rim Protein Family Implicated in human retinopathies. *Neuron* 8: 1171-1184
14. Bascom RA, Schappert K, McInnes RR (1993) Cloning of the human and murine ROM1 genes: genomic organization and sequence conservation. *Hum Mol Gen* 2: 385-391
15. Bennett J, Wilson J, Sun D, Forbes B, Maguire A (1994) Adenovirus vector mediated in vivo gene transfer into adult murine retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 2535-2542
16. Bennett J, Zeng Y, Bajwa R, Klatt L, Li Y, Maguire AM (1998) Adenovirus-mediated delivery of rhodopsin-promoted bcl-2 results in a delay in photoreceptor cell death in the rd/rd mouse. *Gene Ther* 5: 1156-1164
17. Berson EL (1976) Retinitis Pigmentosa and Allied Retinal Diseases: Electrophysiologic findings. *Tr Am Acad Ophth & Otol* 81: 659-666
18. Berson EL (1993) Retinitis Pigmentosa The Friedenwald Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 1659-1676
19. Berson EL (1996) Retinitis pigmentosa: Unfolding its mystery. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 4526-4528
20. Berson EL, Remulla JFC, Rosner B, Sandberg MA, Weigel-DiFranco C (1996) Evaluation of Patients With Retinitis Pigmentosa Receiving Electric Stimulation, Ozonated Blood, and Ocular Surgery in Cuba. *Arch Ophthalmol* 114: 560-563
21. Berson EL, Rosner B, Sandberg MA, Dryja TP (1991) Ocular Findings in Patients With Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa and a Rhodopsin Gene Defect (Pro-23-His). *Arch Ophthalmol* 109: 92-101
22. Berson EL, Rosner B, Sandberg MA, Hayes KC, Nicholson BW, Weigel-DiFranco C, Willett W (1993) A Randomized Trial of Vitamin A and Vitamin E Supplementation for Retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol* 111: 761-772
23. Berson EL, Rosner B, Sandberg MA, Weigel-DiFranco C, Dryja TP (1991) Clinical findings in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa and rhodopsin, proline-347-leucine. *Am J Ophthalmol* 111: 614-623
24. Bessant DAR, Payne AM, Mitton KP, Wang Q-L, Swain PK, Plant C, Bird AC, Zack DJ, Swaroop A, Bhattacharya SS (1999) A mutation in NRL is associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nature Genetics* 21: 355-356
25. Birch DG, Herman WK, deFaller JM, Disbrow DT, Birch EE (1987) The Relationship Between Rod Perimetric Thresholds and Full-Field Rod ERGs in Retinitis Pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28: 954-965

26. Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC (1991) Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet* 48: 137-144
27. Bunge S, Wedemann H, David D, Terwilliger DJ, van den Born LI, Aulehla-Scholz C, Samanns C, Horn M, Ott J, Schwinger E, Schinzel A, Denton MJ, Gal A (1993) Molecular Analysis and Genetic Mapping of the Rhodopsin Gene in families with Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa. *Genomics* 17: 230-233
28. Burstedt MS, Sandgren O, Holmgren G, Forsman-Semb K (1999) Bothnia dystrophy caused by mutations in the cellular retinaldehyde-binding protein gene (RLBP1) on chromosome 15q26. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 995-1000
29. Cayouette M, Behn D, Sendtner M, Lachapelle P, Gravel C (1998) Intraocular gene transfer of ciliary neurotrophic factor prevents death and increases responsiveness of rod photoreceptors in the retinal degeneration slow mouse. *J Neurosci* 18: 9282-9293
30. Chang G-Q, Hao Y, Wong F (1993) Apoptosis: Final Common Pathway of Photoreceptor Death in rd, rds, and Rhodopsin Mutant Mice. *Neuron* 11: 595-605
31. Chaubert P, Bautista D, Benhattar J (1993) An Improved Method for Rapid Screening of DNA Mutations by Nonradioactive Single-Strand Conformation Polymorphism Procedure. *BioTechniques* 15: 586
32. Chen J, Makino CL, Peachey NS, Baylor DA, Simon MI (1995) Mechanisms of Rhodopsin Inactivation by a COOH-Terminal Truncation Mutant. *Science* 267: 374-377
33. Chong NHV, Alexander RA, Waters L, Barnett KC, Bird AC, Luthert PJ (1999) Repeated injections of a ciliary neurotrophic factor analogue leading to long-term photoreceptor survival in hereditary retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 1298-1305
34. Connell G, Bascom R, Molday L, Reid D, McInnes RR, Molday RS (1991) Photoreceptor peripherin is the normal product of the gene responsible for retinal degeneration in the rds mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 723-726
35. Connell GJ, Molday RS (1990) Molecular cloning, primary structure, and orientation of the vertebrate photoreceptor cell protein peripherin in the rod outer segment disk membrane. *Biochemistry* 29: 4691-4698
36. Davies K (1993) Peripherin and the vision thing. *Nature* 362: 92
37. Deretic D, Schmerl S, Hargrave PA, Arendt A, McDowell JH (1998) Regulation of sorting and post-Golgi trafficking of rhodopsin by its C-terminal sequence QVS(A)PA. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 10620-10625
38. Doi T, Molday RS, Khorana HG (1990) Role of the intradiscal domain in rhodopsin assembly and function. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 4991-4995

39. Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS (1991) 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research* 19: 4008
40. Donders FC (1855) Beiträge zur pathologischen Anatomie des Auges. V. Graefe's Archiv für Ophthalmologie 2:106-118
41. Drenser KA, Timmers AM, Hauswirth WW, Lewin AS (1998) Ribozyme-Targeted Destruction of RNA Associated with Autosomal-Dominant Retinitis Pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39: 681-689
42. Dryja TP, Berson EL (1995) Retinitis Pigmentosa and Allied Diseases Implications on Genetic Heterogeneity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 1197-1200
43. Dryja TP, Finn JT, Peng Y-W, McGee TL, Berson EL, Yau K-W (1995) Mutations in the gene encoding the α subunit of the rod cGMP-gated channel in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 10177-10181
44. Dryja TP, Hahn LB, Cowley GS, McGee TL, Berson EL (1991) Mutation spectrum of the rhodopsin gene among patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9370-9374
45. Dryja TP, Li T (1995) Molecular genetics of retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet* 4: 1739-1743
46. Dryja TP, McGee TL, Hahn LB, Cowley GS, Olsson JE, Reichel E, Sandberg MA, Berson EL (1991) Mutations within the rhodopsin gene in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *N Engl J Med* 323: 1302-1307
47. Dryja TP, McGee TL, Reichel E, Hahn LB, Cowley GS, Yandell DW, Sandberg MA, Berson EL (1990) A point mutation of the rhodopsin gene in one form of retinitis pigmentosa. *Nature* 343: 364-366
48. Ekström U, Ponjavic V, Abrahamson M, Nilsson-Ehle P, Andreasson S, Stenström I, Ehinger B (1998) Phenotypic expression of autosomal dominant retinitis pigmentosa in a Swedish family expressing a Phe-211-Leu variant of peripherin/rds. *Ophthalmic Genet* 19: 27-37
49. Faktorovich EG, Steinberg RH, Yasamura D, Matthes MT, La Vail MM (1990) Photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy delayed by fibroblast growth factor. *Nature* 347: 83-86
50. Farrar GJ, Jordan SA, Kumar-Singh R, Inglehearn CF, Gal A, Gregory C, Al-Maghteh M, Kenna PF, Humphries MM, Sharp EM, Sheils DM, Bunge S, Hargrave PA, Denton MJ, Schwinger E, Bhattacharya SS, Humphries P (1993) Extensive genetic heterogeneity in autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Retinal Degeneration*, Plenum Press New York

51. Farrar GJ, Jordan SA, Kenna P, Humphries MM, Kumar-Singh R, McWilliams P, Allamand V, Sharp E, Humphries P (1991) Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa: Localization of a Disease Gene (RP6) to the Short Arm of Chromosome 6. *Genomics* 11: 870-874
52. Farrar GJ, Kenna P, Jordan SA, Kumar-Singh R, Humphries P (1991) A sequence polymorphism in the human peripherin/RDS gene. *Nucleic Acids Research* 19: 6982
53. Farrar GF, Kenna P, Jordan SA, Kumar-Singh R, Humphries MM, Sharp EM, Sheils DM, Humphries P (1991) A three-base-pair deletion in the peripherin-RDS gene in one form of retinitis pigmentosa. *Nature* 354: 478-480
54. Farrar GJ, Kenna P, Jordan SA, Kumar-Singh R, Humphries MM, Sharp EM, Sheils D, Humphries P (1992) Autosomal dominant retinitis pigmentosa: a novel mutation at the peripherin/RDS locus in the original 6p-linked pedigree. *Genomics* 14: 805-807
55. Farrar GJ, Kenna P, Redmond R, McWilliam P, Bradley DG, Humphries MM, Sharp EM, Inglehearn CF, Bashir R, Jay M, Watty A, Ludwig M, Schinzel A, Samanns C, Gal A, Bhattacharya S, Humphries P (1990) Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa: Absence of the Rhodopsin Proline→Histidine Substitution (codon 23) in Pedigrees from Europe. *Am J Hum Genet* 47: 941-945
56. Felbor U, Schilling H, Weber BHF (1997) Adult Vitelliform Macular Dystrophy Is Frequently Associated With Mutations in the Peripherin/RDS Gene. *Hum Mutat* 10: 310-309
57. Finckh U, Xu S, Kumaramanickavel G, Schürmann M, Mukkadan JK, Fernandez T, John S, Weber JL, Denton MJ, Gal A (1998) Homozygosity mapping of Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa Locus (RP22) on Chromosome 16p12.1-p12.3. *Genomics* 38: 341-345
58. Fishman GA, Stone E, Gilbert LD, Vandenburgh K, Sheffield VC, Heckenlively JR (1994) Clinical features of a previously undescribed codon 216 (proline to serine) mutation in the peripherin/retinal degeneration slow gene in autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Ophthalmology* 101: 1409-1421
59. Fishman GA, Stone EM, Sheffield VC, Gilbert LD, Kimura AE (1992) Ocular Findings Associated With Rhodopsin Gene Codon 17 and Codon 182 Transition Mutations in Dominant Retinitis Pigmentosa. *Arch Ophthalmol* 110: 54-62
60. Fishman GA, Vandenburgh K, Stone EM, Gilbert LD, Alexander KR, Sheffield VC (1992) Ocular Findings Associated With Rhodopsin Gene Codon 267 and Codon 190 Mutations in Dominant Retinitis Pigmentosa. *Arch Ophthalmol* 110: 1582-1588
61. Fliesler SJ, Rayborn ME, Hollyfield JG (1985) Membrane morphogenesis in retinal rod outer segments: inhibition by tunicamycin. *J Cell Biol* 100: 574-587

62. Franke RR, König B, Sakmar TP, Khorana HG, Hofmann KP (1990) Rhodopsin Mutants That Bind But Fail To Activate Transducin. *Science* 250:123-125
63. Gal A, Apfelstedt-Sylla E, Janecke AR, Zrenner E (1997) Rhodopsin mutations in inherited retinal dystrophies and dysfunctions. *Progress in Retinal and Eye Research* 16: 51-79
64. Gal A, Li Y, Thompson DA, Weir J, Orth U, Jacobson SG, Apfelstedt-Sylla E, Vollrath D (2000) Mutations in MERTK, the human orthologue of the RCS rat retinal dystrophy gene, cause retinitis pigmentosa. *Nature Genetics* 26: 270-271
65. Gal A, Xu S, Piczenic Y, Eiberg H, Duvigneau C, Schwinger E, Rosenberg T (1994) Gene for autosomal dominant congenital stationary night blindness maps to the same region as the gene for the β -subunit of the rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase (PDEB) in chromosome 4p16.3. *Hum Mol Gen* 3: 323-325
66. Garriga P, Liu X, Khorana HG (1996) Structure and function in rhodopsin: Correct folding and misfolding in point mutants at and in proximity to the site of the retinitis pigmentosa mutation Leu-125→Arg in the transmembrane helix C. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 4560- 4564
67. Gerber S, Rozet J-M, Takezawa S-I, Coutinho dos Santos L, Lopes L, Gribouval O, Penet C, Perrault I, Ducroq D, Souied E, Jeanpierre M, Romana S, Frézal J, Ferraz F, Yu-Umesono R, Munnich A, Kaplan J (2000) The photoreceptor cell-specific nuclear receptor gene (PNR) accounts for retinitis pigmentosa in the Crypto-Jews from Portugal (Marranos), survivors from the Spanish Inquisition. *Hum Genet* 107: 276-284
68. Goldberg AFX, Loewen CJ, Molday RS (1998) Cysteine Residues of Photoreceptor Peripherin/rds: Role in Subunit Assembly and Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa. *Biochemistry* 37: 680-685
69. Goldberg AFX, Molday RS (1996) Subunit Composition of the Peripherin/rds-Rom-1 Disk Rim Complex from Rod Photoreceptors: Hydrodynamic Evidence for a Tetrameric Quaternary Structure. *Biochemistry* 35: 6144-6149
70. Goldberg AFX, Molday RS (1996) Defective subunit assembly underlies a digenic form of retinitis pigmentosa linked to mutations in peripherin/rds and rom-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 13726-13730
71. Goldberg AFX, Moritz OL, Molday RS (1995) Heterologous Expression of Photoreceptor Peripherin/rds and Rom-1 in COS-1 cells: Assembly, Interaction and Localization of Multisubunit Complexes. *Biochemistry* 34: 14213-19
72. Gorin MB, Jackson KE, Ferrell RE, Sheffield VC, Jacobson SG, Gass JD, Mitchell E, Stone EM (1995) A Peripherin/Retinal Degeneration Slow Mutation (Pro-210-Arg) Associated with Macular and Peripheral Retinal Degeneration. *Ophthalmology* 102: 246-255

73. Gouras PG, Flood MT, Kjeldbye H, Bilak MK, Eggers H (1985) Transplantation of cultured human retinal epithelium to Bruch's membrane of the owl monkeys eye. *Curr Eye Res* 4: 253
74. Greenberg J, Goliath R, Beighton P, Ramesar R (1994) A new locus for autosomal dominant retinitis pigmentosa on the short arm of chromosome 17. *Hum Mol Gen* 3: 915-918
75. Griffin HG, Griffin AM (1993) DNA Sequencing. In: H. and A. Griffin (editors) *Methods in Molecular Biology*, Vol. 23: DNA Sequencing Protocols, Humana Press Inc., Totowa, NJ
76. Grompe M (1993) The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nature Genetics* 5:11-117
77. Grover S, Fishman GA, Anderson RJ, Alexander KR, Derlacki DJ (1996) Rate of Visual Field Loss in Retinitis Pigmentosa. *Ophthalmology* 104: 460-465
78. Hardcastle AJ, Thiselton DL, Zito I, Ebenezer N, Mah TS, Gorin MB, Bhattacharya SS (2000) Evidence for a new locus for X-linked retinitis pigmentosa (RP23). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 2080-2086
79. Hargrave PA, McDowell JH (1992) Rhodopsin and phototransduction: a model system for G protein-linked receptors. *FASEB Journal* 6: 2323-2331
80. Hargrave P, McDowell JH (1992) Rhodopsin and Phototransduction. *International Review of Cytology* 137B: 49-97
81. Hawkins RK, Jansen HG, Sanyal S (1985) Development and degeneration of retina in rds mutant mice: Photoreceptor abnormalities in the heterozygotes. *Exp Eye Res* 44: 347-361
82. Hayashi K (1991) PCR-SSCP : a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods Appl* 1: 34-38
83. Heckenlively JR, Rodriguez JA, Daiger SP (1991) Autosomal dominant sectoral retinitis pigmentosa. Two families with transversion mutation in codon 23 of rhodopsin. *Arch Ophthalmol* 109: 84-91
84. Heckenlively JR, Yoser SL, Friedman LH, Oversier JJ (1988) Clinical findings and Common Symptoms in Retinitis Pigmentosa. *Am J of Ophthalmol* 105: 504-511
85. Hood DC, Birch GB (1990) The A-Wave of the Human Electroretinogram and Rod Receptor Function. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31: 2070-2081
86. Hood DC, Birch DG (1992) A computational model of the amplitude and implicit time of the b-wave of the human ERG. *Visual Neuroscience* 8:107-126
87. Hood DC, Shady S, Birch DG (1994) Understanding Changes in the b-Wave of the ERG Caused by Heterogenous Receptor Damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 2477-2488

88. Huang SH, Pittler SJ, Huang X, Oliveira L, Berson EL, Dryja TP (1995) Autosomal recessive retinitis pigmentosa caused by mutations in the α subunit of rod cGMP phosphodiesterase. *Nature Genetics* 11: 468-471
89. Humphries P, Kenna P, Farrar GJ (1992) On the Molecular Genetics of Retinitis Pigmentosa. *Science* 256: 804-808
90. Hwa J, Klein-Seetharaman J, Khorana HG (2001) Structure and function in rhodopsin: Mass spectrometric identification of the abnormal intradiscal disulfide bond in misfolded retinitis pigmentosa mutants. *Proc Natl Acad Sci* 98: 4872-4876
91. Hwa J, Reeves PJ, Klein-Seetharaman J, Davidson F, Khorana HG (1999) Structure and function in rhodopsin: Further elucidation of the role of the intradiscal cysteines, Cys-110, -185, and -187, in rhodopsin folding and function. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 1932-1935
92. Inglehearn CF, Carter SA, Keen TJ, Lindsey J et al. (1993) A new locus for autosomal dominant retinitis pigmentosa on chromosome 7p. *Nature Genetics* 4: 51-53
93. Inglehearn CF, Hardcastle AJ (1996) Nomenclature for Inherited Diseases of the Retina. *Am J Hum Genet* 58: 433-435
94. Inglehearn CF, Keen TJ, Bashir R, Jay M, Fitzke F, Bird AC, Crombie A, Bhattacharya SS (1992) A completed screen for mutations of the rhodopsin gene in a panel of patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Hum Mol Gen* 1: 41-45
95. Jordan SA, Farrar GJ, Kenna P, Humphries P (1992) Polymorphic variation within "conserved" sequences at the 3' end of the human RDS gene which results in amino acid substitutions. *Hum Mutat* 1: 240-247
96. Jordan SA, Farrar GJ, Kenna P, Humphries MM et al. (1993) Localization of an autosomal dominant retinitis pigmentosa gene to chromosome 7q. *Nature genetics* 4: 54-58
97. Jordan SA, Farrar GJ, Kumar-Singh R, Kenna P, Humphries MM, Allamand V, Sharp EM, Humphries P (1992) Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa (adRP; RP6): Cosegregation of RP6 and the Peripherin-RDS Locus in a Late-Onset Family of Irish Origin. *Am J Hum Genet* 50: 634-639
98. Kaiser-Kupfer ML, Caruso RC, Calle D (1991) Gyrate atrophy of the choroid and retina. Long-term reduction of ornithine slows retinal degeneration. *Arch Ophthalmol* 109: 1539-1548
99. Kajiwara K, Berson EL, Dryja TP (1994) Digenic Retinitis Pigmentosa Due to Mutations at the Unlinked Peripherin/RDS and ROM1 Loci. *Science* 264: 1604-1608
100. Kajiwara K, Christen W, Seddon JM, Dryja TP (1994) Screen for mutations in the human rds/peripherin gene in patients with age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 1717

101. Kajiwar K, Hahn LB, Mukai S, Travis GH, Berson EL, Dryja TP (1991) Mutations in the human retinal degeneration slow gene in autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nature* 354: 480-483
102. Kajiwar K, Sandberg MA, Berson EL, Dryja TP (1993) A null mutation in the human peripherin/RDS gene in a family with autosomal dominant retinitis punctata albescens. *Nature Genetics* 3: 208-212
103. Karnik SS, Khorana HG (1990) Assembly of Functional Rhodopsin Requires a Disulfide Bond between Cystein Residues 110 and 187. *J Biol Chem* 265: 17520-17524
104. Karnik SS, Sakmar TP, Chen HB, Khorana HG (1988) Cystein residues 110 and 187 are essential for the formation of correct structure in bovine rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 8459-8463
105. Kaushal S, Khorana HG (1994) Structure and Function in Rhodopsin. 7. Point Mutations Associated with Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa. *Biochemistry* 33: 6121-6128
106. Kaushal S, Ridge KD, Khorana HG (1994) Structure and function in rhodopsin : the role of asparagine-linked glycosylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 4024-4028
107. Keen TJ, Inglehearn CF (1996) Mutations and Polymorphisms in the Human Peripherin-RDS Gene and Their Involvement in Inherited Retinal Degeneration. *Human Mutation* 8: 297-303
108. Keen J, Lester D, Inglehearn F, Curtis A, Bhattacharya S (1991) Rapid Detection of single base mismatches as heteroduplexes on Hydrolink gels. *Trends Genet* 7: 5
109. Kemp CM, Jacobson SG, Cideciyan AV, Kimura AE, Sheffield VC, Stone EM (1994) RDS Gene Mutations Causing Retinitis Pigmentosa or Macular Degeneration Lead to the Same Abnormality in Photoreceptor Function. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 3154-3162
110. Kim SK, Wold BJ (1985) Stable Reduction of Thymidine Kinase Activity in Cells Expressing High Levels of Anti-Sense RNA. *Cell* 42: 129-138
111. Kohl S, Christ-Adler M, Apfelstedt-Sylla E, Kellner U, Eckstein A, Zrenner E, Wissinger B (1997) RDS/peripherin gene mutations are frequent causes of central retinal dystrophies. *J Med Genet* 34: 620-624
112. Kohl S, Giddings I, Besch D, Apfelstedt-Sylla E, Zrenner E, Wissinger B (1998) The Role of the Peripherin/RDS Gene in Retinal Dystrophies. *Acta Anat* 162:75-84
113. Kono M, Yu H, Oprian DD (1998) Disulfide bond exchange in rhodopsin. *Biochemistry* 37: 1302-1305

114. Kranich H, Bartkowski S, Denton MJ, Krey S, Dickinson P, Duvigneau C, Gal A (1993) Autosomal dominant 'sector' retinitis pigmentosa due to a point mutation predicting an Asn-15-Ser substitution of rhodopsin. *Hum Mol Gen* 2: 813-814
115. La Vail MM, Unoki K, Yasamuro D, Matthes MT, Yancopoulos GD, Steinberg RH (1992) Multiple growth factors, cytokines and neurotrophins rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 11249-11253
116. Lewin AS, Drenser KA, Hauswirth WW, Nishikawa S, Yasumura D, Flannery JG, LaVail MM (1998) Ribozyme rescue of photoreceptor cells in a transgenic rat model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nature Medicine* 4: 967-971
117. Li T, Adamian M, Roof DJ, Berson EL, Dyja TP, Roessler BJ, Davidson BL (1994) In vivo transfer of reporter gene to retina mediated by an adenoviral vector. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 2543-2549
118. Litchfield TM, Whiteley SJO, Lund RD (1997) Transplantation of Retinal Pigment Epithelial, Photoreceptor and other Cells as Treatment for Retinal Degeneration. *Experimental Eye Research* 64: 655-666
119. Liu X, Garriga P, Khorana HG (1996) Structure and function in rhodopsin: Correct folding and misfolding in two point mutants in the intradiscal domain of rhodopsin identified in retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 4554-4559
120. Lynness AL, Ernst W, Quinlan MP, Glover GM, Arden GB, Carter RM, Bird AC, Parker JA (1985) A clinical, psychophysical and electrographic survey of patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Brit J of Ophthalmology* 69: 326-339
121. Ma J, Norton JC, Allen AC, Burns JB, Hasel KW, Burns JL, Sutcliffe JG, Travis GH (1995) Retinal degeneration slow (rds) in Mouse results from Simple Insertion of a t Haplotype-Specific Element into Protein-Coding Exon II. *Genomics* 28: 212-219
122. Macke J, Davenport CM, Jacobson SG, Hennessey JC, Gonzalez-Fernandez F, Conway BP, Heckenlively J, Palmer R, Maumenee ICH, Sieving P, Gouras P, Good W, Nathans J (1993) Identification of Novel Rhodopsin Mutations Responsible for Retinitis Pigmentosa: Implications for Structure and Function of Rhodopsin. *Am J Hum Gen* 53: 80-89
123. Massof RW, Finkelstein D (1981) Two forms of autosomal dominant primary retinitis pigmentosa. *Doc Ophthalmol* 51: 289-346
124. Massof RW, Finkelstein D (1993) Supplemental Vitamin A Retards Loss of ERG Amplitude in Retinitis Pigmentosa. *Arch Ophthalmol* 111, 751-754
125. McInnes RR, Bascom RA (1992) Retinal genetics: a nullifying effect for rhodopsin. *Nature Genetics* 1: 155-157

126. McLaughlin ME, Ehrhart TL, Berson EL, Dryja TP (1995) Mutation spectrum of the gene encoding the β subunit of rod phosphodiesterase among patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3249-3253
127. Michaud J, Brody LC, Steel G, Fontaine G, Martin LS, Valle D, Mitchell G (1992) Strand-separating conformational polymorphism analysis: Efficacy of detection of point mutations in the human ornithine δ -aminotransferase gene. *Genomics* 13: 389-394
128. Miyoshi H, Takahashi M, Gage FH, Verma IM (1997) Stable and efficient gene transfer into the retina using an HIV-based lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci* 94: 10319-10323
129. Molday RS, Hicks D, Molday L (1987) Peripherin. A Rim-Specific Membrane Protein of Rod Outer Segment Disks. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28: 50-61
130. Morimura H, Saindelle-Ribeaudeau F, Berson EL, Dryja TP (1999) Mutations in RGR, encoding a light-sensitive opsin homologue, in patients with retinitis pigmentosa. *Nature Genetics* 23: 393-394
131. Moritz OL, Molday RS (1996) Molecular Cloning, Membrane Topology, and Localization of Bovine Rom-1 in Rod and Cone Photoreceptor Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 352-361
132. Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350
133. Naash ML, Peachey NS, Li Z-Y, Gryczan CC, Goto Y, Blanks J, Milam AH, Ripps H (1996) Light-Induced Acceleration of Photoreceptor Degeneration in Transgenic Mice Expressing Mutant Rhodopsin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 775-782
134. Nakazawa M, Wada Y, Chida Y, Tamai M (1997) A correlation between computer-predicted changes in secondary structure and the phenotype or retinal degeneration associated with mutations in peripherin/RDS. *Curr Eye Res* 16: 1134-1141
135. Nakazawa M, Wada Y, Tamai M (1998) Arrestin gene mutations in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol* 116 : 498-501
136. Nathans J, Hogness DS (1984) Isolation and nucleotide sequence of the gene encoding human rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 4851-4855
137. Nir I, Agarwal N, Papermaster DS (1990) Opsin gene expression during early and late phases of retinal degeneration in rds mice. *Exp Eye Res* 51: 257-267
138. Nir I, Kedzierski W, Chen J, Travis GH (2000) Expression of Bcl-2 Protects against Photoreceptor Degeneration in retinal degeneration slow (rds) Mice. *J Neuroscience* 20: 2150-2154
139. Ogden RC, Adams DA (1987) Electrophoresis in agarose and acrylamide gels. *Methods Enzymol* 152: 61-87

140. Oh KT, Weleber RG, Lotery A, Oh DM, Billingslea AM, Stone EM (2000) Description of a new mutation in rhodopsin, Pro23Ala, and comparison with electroretinographic and clinical characteristics of the Pro23His mutation. *Arch Ophthalmol* 118: 1269-1276
141. Olsson JE, Samanns C, Jimenez J, Pongratz J, Chand A, Watty A, Seuchter SA, Denton M, Gal A (1990) Gene of Type II Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa maps on the Long Arm of Chromosome 3. *Am J of Med Genet* 35: 595-599
142. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 2766-2770
143. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K (1989) Rapid and Sensitive Detection of Point Mutations and DNA Polymorphisms Using the Polymerase Chain Reaction. *Genomics* 5: 874-879
144. Orth U, Samanns C, Gussek H, Niemeyer G, Ludwig M, Meitinger T, Schinzel A, Schwinger E, Gal A (1991) Autosomal-dominant erbliche Retinopathia pigmentosa ist genetisch heterogen. *Fortschr Ophthalmol* 88: 455-459
145. Owens GC, Bunge RP (1991) Schwann cells infected with a recombinant retrovirus expressing myelin-associated glycoprotein antisense RNA do not form myelin. *Neuron* 7: 565-575
146. Passarge E (1994) Kopplung und LOD Score. In: Passarge E (1994) *Taschenatlas der Genetik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
147. Payne AM, Downes SM, Bessant DAR, Bird AC, Bhattacharya SS (1998) Founder effect, seen in the British population, of the 172 Peripherin/RDS mutation – and Further Refinement of Genetic Positioning of the Peripherin/RDS Gene. *Am J Hum Genet* 62: 192-195
148. Payne AM, Evans K, Plant C, Bird AC, Bhattacharya SS (1997) The prevalence and effect of peripherin/RDS mutations in autosomal dominant pattern dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37(Suppl.): 508
149. Postel EH, Flint SJ, Kessler DJ, Hogen ME (1991) Evidence that a triplex-forming oligodesoxyribonucleotide binds to the c-myc promotor in HeLa cells, thereby reducing c-myc mRNA levels. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 8227-8231
150. Prober J, Trainor GL, Dam RJ, Hobbs FW, Robertson CW, Zagursky RJ, Cocuzza AJ, Jensen MA, Baumeister K (1987) A System for Rapid DNA Sequencing with Fluorescent Chain-Terminating Dideoxynucleotides. *Science* 238: 336-341
151. Ravník-Glavac M, Glavac D, Dean M (1994) Sensitivity of single-strand conformation polymorphism and heteroduplex method for mutation detection in the cystic fibrosis gene. *Hum Mol Genet* 3: 801-807

152. Reichel E, Adamian M, Lessel S, Rizzo JF, Berson EL (1991) Peripapillary cone density in the normal human retina. *Retina* 11: 912
153. Reig C, Trujillo MJ, Martinez-Gimeno M, Garcia-Sandoval B, Calvo MT, Ayuso C, Carballo M (2000) Homozygous and heterozygous Gly-188-Arg mutation of the rhodopsin gene in a family with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Ophthalmol Genet* 21: 79-87
154. Richards JE, Scott KM, Sieving PA (1995) Disruption of conserved rhodopsin disulfide bond by Cys187Tyr mutation causes early and severe autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Ophthalmology* 102: 669-677
155. Ridge KD, Lu Z, Liu X, Khorana HG (1995) Structure and Function in Rhodopsin. Separation and Characterization of the Correctly Folded and Misfolded Opsins Produced on Expression of an Opsin Mutant Gene Containing Only the Native Intradiscal Cysteine Codons. *Biochemistry* 34: 3261-3167
156. Riede U, Schaefer H (1995) Letale Zellschädigung. In: Riede U, Schaefer H (Hrsg.) *Störungen der Reizbeantwortung*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York (Allgemeine und spezielle Pathologie, 4. aktualisierte Auflage, S. 135-143)
157. Robison WG, Kuwabara T, Bieri JG (1982) The roles of vitamin E and unsaturated fatty acids in the visual process. *Retina* 2: 263-281
158. Roof DJ, Adamian M, Hayes A (1994) Rhodopsin Accumulation at Abnormal Sites in Retinas of Mice With a Human P23H Rhodopsin Transgene. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 4049-4062
159. Rosas DJ, Roman AJ, Weissbrod P, Macke JP, Nathans J (1994) Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa in a Large Family: A Clinical and Molecular Genetic Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 3134-3144
160. Rosenfeld PJ, Cowley GS, McGee TL, Sandberg MA, Berson EL, Dryia TP (1992) A Null mutation in the rhodopsin gene causes rod photoreceptor dysfunction and autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nature Genetics* 1: 209-213
161. Saga M, Mashima Y, Akeo K, Oguchi Y, Kudoh J, Shimizu N (1993) A novel Cys-214-Ser mutation in the peripherin/RDS gene in a Japanese family with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Hum Genet* 92: 519-521
162. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* 239: 487-491
163. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354

164. Sandberg MA, Weigel-DiFranco C, Dryja TP, Berson EL (1995) Clinical Expression Correlates With Location of Rhodopsin Mutation in Dominant Retinitis Pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 1934-1942
165. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467
166. Santos A, Humayun MS, de Juan E, Greenburg RJ, Marsh MJ, Klock IB, Milam AH (1997) Preservation of the Inner Retina in Retinitis Pigmentosa. *Arch Ophthalmol* 115: 511-515
167. Sarkar FH, Li YW, Ball DE, Crissman JD (1992) Comparative method for detection of RNA-PCR-amplified signals. *Biotechniques* 12: 22, 24, 26
168. Sawyer JC, Gannon AM, Sullivan LS, Wagner MG, Daiger SP (1995) Haplotypes for polymorphic amino acid substitutions in peripherin/RDS. *Am J Hum Gen* 57: A203
169. Shady S, Hood DC, Birch DG (1995) Rod phototransduction in Retinitis Pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 1027-1037
170. Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM (1993) The Sensitivity of Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis for the Detection of Single Base Substitutions. *Genomics* 16: 325-332
171. Sibulesky L, Hayes KC, Pronczuk A, Weigel-DiFranco C, Rosner B, Berson EL (1999) Safety of <7500 RE (<25000 IU) vitamin A daily in adults with retinitis pigmentosa. *Am J Clin Nutr* 69: 656-663
172. Spinardi L, Mazars R, Theillet C (1991) Protocols for an improved detection of point mutations by SSCP. *Nucleic Acids Research* 19: 4009
173. Steinberg RH, Fisher SK, Anderson DH (1980) Morphogenesis in Vertebrate Photoreceptors. *The Journal of Comparative Neurology* 190: 501-518
174. Stone EM, Kimura AE, Nichols BE, Khadivi P, Fishman GA, Sheffield VC (1991) Regional Distribution of Retinal Degeneration in Patients with the Proline to Histidine Mutation in Codon 23 of the Rhodopsin Gene. *Ophthalmology* 98: 1806-1813
175. Stone EM, Sheffield VC, Hagemann GS (2001) Molecular genetics of age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet* 10: 2285-2292
176. Stone EM, Vandenburgh K, Kimura AE, Lam BL, Fishman GA, Heckenlively JR, Castillo TA, Sheffield VC (1993) Novel mutations in the peripherin (rds) and rhodopsin genes associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34 (Suppl.): 1149
177. Streichert LC, Birnbach CD, Reh TA (1999) A diffusible factor from normal retinal cells promotes rod photoreceptor survival in an in vitro model of retinitis pigmentosa. *J Neurobiol* 39: 475-490

178. Sullivan LS, Heckenlively JR, Browne SJ, Zuo J, Hide WA, Gal A, Denton M, Inglehearn CF, Blanton SH, Daiger SP (1999) Mutations in a novel retina-specific gene cause autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nature Genetics* 22 : 255-259
179. Sullivan LJ, Makris GS, Dickinson P, Mulhall LEM, Forrest S, Cotton RGH, Loughnan MS (1993) A New Codon 15 Rhodopsin Gene Mutation in Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa Is Associated With Sectorial Disease. *Arch Ophthalmol* 111: 1512-1517
180. Sung C-H, Davenport CM, Hennessey JC, Maumenee IH, Jacobson SG, Heckenlively JR, Nowakowski R, Fishman G, Gouras P, Nathans J (1991) Rhodopsin mutations in autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 6481-6485
181. Sung C-H, Davenport CM, Nathans J (1993) Rhodopsin Mutations Responsible for Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa. *Journal of Biological Chemistry* 268: 26645-26649
182. Sung CH, Makino C, Baylor D, Nathans J (1994) A Rhodopsin Gene Mutation Responsible for Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa Results in a Protein That is Defective in Localization to the Photoreceptor Outer Segment. *Journal of Neuroscience* 14: 5818-5833
183. Sung C-H, Schneider BG, Agarwal N, Papermaster D, Nathans J (1991) Functional heterogeneity of mutant rhodopsins responsible for autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 8840-8844
184. Tai AW, Chuang J-Z, Bode C, Wolfrum U, Sung C-H (1999) Rhodopsin's Carboxy-Terminal Cytoplasmatic Tail Acts as a Membrane Receptor for Cytoplasmatic Dynein by Binding to the Dynein Light Chain Tctex-1. *Cell* 97: 877-887
185. Takasugi M, Guendouz A, Chassignol M, Decout JL, Lhomme J, Thuong NT, Hélène C (1991) Sequence-specific photo-induced cross-linking of the two strands of double helical DNA by a psoralen covalently linked to a triple helix forming oligonucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 5602-5606
186. Thompson DA, Li Y, McHenry CL, Carlson TJ, Ding X, Sieving PA, Apfelstedt-Sylla E, Gal A (2001) Mutations in the gene encoding lecithin retinol acyltransferase are associated with early-onset severe retinal dystrophy. *Nat Genet* 28: 123-124
187. Travis GH, Brennan MB, Danielson PE, Kozak CA, Sutcliffe JG (1989) Identification of a photoreceptor specific mRNA encoded by the gene responsible for retinal degeneration slow (rds). *Nature* 338: 70-73
188. Travis GH, Christerson L, Danielson PE, Klisak I, Sparkes RS, Hahn LB, Dryja TP, Sutcliffe JG (1991) The Human Retinal Degeneration Slow (RDS) Gene: Chromosome Assignment and Structure of the mRNA. *Genomics* 10: 733-739

189. Travis GH, Groshan KR, Lloyd M, Bok D (1992) Complete rescue of photoreceptor dysplasia and degeneration in transgenic retinal degeneration slow (rds) mice. *Neuron* 9: 113-119
190. Travis GH, Sutcliffe JG, Bok D (1991) The retinal degeneration slow (rds) gene product is a photoreceptor disc membrane-associated glycoprotein. *Neuron* 6: 61-70
191. Trujillo MJ, Garcia-Sandoval B, Lorda-Sanchez I, Gimenez A, Sanz R, Rodriguez de Alba M, Gonzalez-Gonzalez MC, Ibanez A, Ramos C, Ayuso C (2000) Ser186Pro mutation of RHO gene in a Spanish autosomal dominant retinitis pigmentosa (ADRP) family. *Ophthalmol Genet* 21: 251-256
192. van Nie R, Ivanyi D, Demant P (1978) A New H-2-Linked Mutation, rds, Causing Retinal Degeneration in the Mouse. *Tissue Antigens* 12: 106-108
193. van Soest S, Westerveld A, de Jong PT, Bleeker-Wagemakers EM, Bergen AA (1999) Retinitis pigmentosa: defined from a molecular point of view. *Surv Ophthalmol* 43: 321-334
194. Wang Q, Chen Q, Zhao K, Wang L, Wang L, Traboulsi EI (2001) Update on the molecular genetics of retinitis pigmentosa. *Ophthalmic Genet* 22: 133-154
195. Weleber RG (1996) The Cuban experience. False Hope for a cure for retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol* 114: 606-607
196. Wells J, Wroblewski J, Keen J, Inglehearn C, Jubb C, Eckstein A, Jay M, Arden G, Bhattacharya S, Fitzke F, Bird A (1993) Mutations in the human retinal degeneration slow (RDS) gene can cause either Retinitis pigmentosa or macular dystrophy. *Nature Genetics* 3: 213-218
197. White MB, Carvalho M, Derse D, O'Brien SJ, Dean M (1992) Detecting Single Base Substitutions as Heteroduplex Polymorphisms. *Genomics* 12: 301-306
198. Wong F (1997) Investigating Retinitis Pigmentosa: a Laboratory Scientist's Perspective. *Progress in Retinal and Eye Research* 16: 353-373
199. Wrigley JDJ, Ahmed T, Nevett CL, Findlay BC (2000) Peripherin/rds Influences Membrane Vesicle Morphology. *J Biol Chem* 275: 13191-13194
200. Xu SY, Schwartz M, Rosenberg T, Gal A (1996) A ninth locus (RP18) for the autosomal dominant retinitis pigmentosa maps in the pericentric region of chromosome 1. *Hum Mol Genet* 5: 1193-1197
201. Zrenner E (1990) Lichtinduzierte Schäden am Auge. *Fortschr Ophthalmol* 87 [Suppl]: S41-S51
202. Zrenner E, Rüther K, Apfelstedt-Sylla E (1992) Retinitis Pigmentosa - Klinische Befunde, molekulargenetische Ergebnisse und Forschungsperspektiven. *Ophthalmologie* 89: 5-21

7 Anhang und Abbildungen

7.1 Bekannte Genloci und ihre Merkmale (Tab. 1)

Locus Nr.	Vererbungsmodus	Chromosomale Lokalisation	Klinik und Anmerkungen
RP1	dominant	8q12.1	Stäbchen-Zapfen-Dystrophie; Mutationsnachweis in DCX-verwandtem Gen [178]
RP2	X-gekoppelt	Xp11.23	Aussehen wie RP in Fundus und Nachtblindheit; Unterschied durch fehlendes Ringskotom, frühen Befall zentraler NH-Areale und nur geringe Gefäßveränderungen; chorioretinale Atrophie in fortgeschrittenen Stadien; Erstmanifestation Myopie mit durchschnittlich 3,5 Jahren;
RP3	X-gekoppelt	Xp11.4	Konduktorinnen weisen einen "tapetal-like" Reflex auf der Retina auf; Erstmanifestation bei Betroffenen ist Nachtblindheit mit durchschnittlich 10,6 Jahren; einige Patienten zeigen gleichzeitig Atemwegsinfektionen wie beim Immobiler-Zilien-Syndrom, was den Zusammenhang zu einer Zilienstörung wahrscheinlicher macht; 10-20% der Patienten mit Kopplung zu RP3 haben Mutationen im dort gefundenen Gen RP-GTPase-Regulator; bei den restlichen ist unklar, ob das Gen noch mehr unbekannte Exons hat oder ob es ein weiteres Gen in unmittelbarer Nähe liegt; eine Kopplung zu RP3 läßt sich in 60-90% der X-gekoppelten RP-Fälle nachweisen;

RP4	dominant/ rezessiv	3q22.1	Rhodopsin; auch Locus für adCSNB große phänotypische Heterogenität; meist korreliert mit Typ 1; zur Klinik siehe 1.2
RP5			vermuteter 2. Genloкус auf 3q, später widerlegt[164]
RP6	X-gekoppelt	Xp21.3- p21.2	aus Linkage-Untersuchungen wahrscheinlicher dritter Genloкус auf dem X-Chromosom, von anderen Autoren angezweifelt [54]
RP7	dominant	6p21.2	Peripherin/RDS; zur Klinik siehe 1.3
RP8	dominant	Ausschluß für 3q, 6p, 8, X	geforderter weiterer adRP-Lokus bei Ausschluß der bekannten; Betroffene hatten zuerst Hörprobleme in der 2. Lebensdekade, in der 3. traten Nachtblind- heit und periphere Gesichtsfeldverluste auf; das bei Schwerhörigkeit in Frage kommende Usher-Syndrom konnte molekulargenetisch ausgeschlossen werden
RP9	dominant	7p14.3	durch Kopplungsanalysen konnte gezeigt werden, daß RP9 verschieden ist von dem Locus für cys- toide Makuladystropie, der ebenfalls auf 7p liegt; mögliches Protein: PIM1K-assoziiertes Protein (PAP1)
RP10	dominant	7q32.1	relativ frühes Einsetzen der Symptome mit durchschnitt- lich 12,9 Jahren in einer spanischen Familie; Genloкус jedoch auch bei einer amerikanischen Familie mit spätem Krankheitsbeginn identifiziert; Protein IMPDH1, Enzym in der Regulation der Guaninsynthese

RP11	dominant	19q13.42	bimodale Expressivität: ein Teil der Patienten zeigt eine inkomplette Penetranz bis hin zu asymptomatischem Konduktoren-Status, ein anderer entwickelt Nachtblindheit und Gesichtsfeldverluste in der 2. Lebensdekade und wird in der 4. als gesetzlich blind anerkannt; wichtig für die Differentialdiagnose zu RP9 mit starker Variabilität in der Expressivität; das Gen ist verschieden von dem für cone-rod-dystrophy (CRD) auf 19q; Mutationen im PRPF31-Gen nachgewiesen
RP12	rezessiv	1q31.3	große Heterogenität; der größte Teil der Betroffenen zeigt als Auffälligkeit eine para-arterielle Kon-servierung des retinalen Pigmentepithels (RPE), der Rest ein klassisches RP-Bild mit starker Myopie; Mutationen im CRB1-Gen nachgewiesen
RP13	dominant	17p13.3	beginnende Nachtblindheit zwischen 4 und 10 Jahren; im mittleren Alter diffuse Fundusveränderungen und extensive retinale Degeneration; typisch sind mittig äquatoriale Pigmentierungen sowie relativ früh einsetzende Gesichtsfeldeinschränkungen; sie wurden als early-onset RP Typ 1 klassifiziert; Protein PRPC8
RP14	rezessiv	6p21.31	Genlokus 20 cM telomerisch von Peripherin; dort konnten Mutationen im Gen des "tubby-like" protein TULP1 identifiziert werden

RP15			identisch mit RPGR (RP3), daher aufgegeben
RP16			aufgegeben
RP17	dominant	17q22	von drei dort lokalisierten Kandidatengen (PDEG, TIMP2, PRKCA) konnten die ersten beiden ausgeschlossen werden;
RP18	dominant	1p21.2	Nachtblindheit ab dem 2.Lebensjahrzehnt, typisches fundoskopisches Bild mit Knochenkörperchenbildung, starken Einengungen der retinalen Arteriolen sowie progressive GF-Verluste beginnend mit Ringskotomen in der mittleren Peripherie; im 2. Lebensjahrzehnt ausgelöschte Stäbchen-ERGs, konventionelles ERG ausgelöscht im 3. Lebensjahrzehnt, Sehschärfe bei peripherer GF-Einschränkung relativ lange erhalten [155]; Mutationen im HPRP3-Gen nachgewiesen
RP19	rezessiv	1p22.1	Erstmanifestation Nachtblindheit mit durchschnittlich 8 Jahren, ab 14 Jahren Sehschärfenverlust; Fundoskopisch Papillenabblassung, veränderte Gefäße, peripher verstreute Pigmentationen. Knochenkörperchen bis an die Makula heranreichend und eine schwere Atrophie des RPE als Unterscheidungsmöglichkeit; Mutationen im ABCA4-Gen nachgewiesen

RP20	rezessiv	1p31.2	Mutationen im dort lokalisierten RPE65-Gen wurden bei Patienten mit arRP und mit Leber'scher Amaurose gefunden, die damit eventuell verschieden schwere Ausprägungen von RP, nicht distinkte Entitäten darstellen;
RP21	mitochondrial		beschrieben in einer großen Familie mit adRP und begleitender sensoneuraler Schwerhörigkeit; nach der Feststellung einer Kopplung zu 9q34 wurde später eine Pathogenese durch Mutationen im mitochondrialen Genom (MTTS2) festgestellt; RP21 aufgegeben
RP22	rezessiv	16p12.1-p12.3	relativ schwerer und rasch progredienter Verlauf mit Nachtblindheit in der 1. oder 2. Dekade, Gesichtsfeldverlusten, schweren Sehbehinderungen im Alter von 40 Jahren; fundoskopisch Gefäßveränderungen, Hyperpigmentierungen und RPE-Atrophie [57]
RP23	X-gekoppelt (rezessiv)	Xp22	atypischer Verlauf mit sehr frühem Erkrankungsbeginn der Männer, unauff.Fundus der Konduktorinnen; von RP2 und RP3 verschieden
RP24	X-gekoppelt (rezessiv)	Xq26-q27	früher Beginn der Stäbchendysfunktion, später progressiver Verlust auch der Zapfendysfunktion; in fortgeschrittenen Stadien wenig oder nicht nachweisbare ERG-Antworten, typ. Fundusveränderungen;

RP25	rezessiv	6cen-q15	Erstmanifestation Nachtblindheit mit 25 Jahren, Sehschärfenverlust ab 30 Jahren, im Alter von 55-60 J. häufig keine Lichtwahrnehmung mehr möglich
RP26	rezessiv	2q31-q33	evtl. Assoziation zu einem dort lokalisierten Gen (MPP4), das Retina-spezifisch ist;
RP 27	dominant	14q11.2	Mutationen im NRL-Gen nachgewiesen; im Originalartikel keine konkreten klinischen Angaben [24]
RP28	rezessiv	2p11-p16	Erkrankungsbeginn im Alter zwischen 5-15 Jahren, ab dem 3. bis 4. Lebensjahrzehnt starke Einschränkungen der Sehfähigkeit;
RP29	rezessiv	4q32-q34	Nachtblindheit und periphere GF-Verluste mit 20 Jahren, Verlust zentralen Sehens mit 25-30 Jahren, komplette Erblindung mit 40-50 Jahren
	rezessiv	4p14-q13	Mutationen im CNGA1-Gen beschrieben; keine spezifischen klinischen Angaben im Originalartikel [43]
	rezessiv	16q13-q21	Mutationen im CNGB1-Gen nachgewiesen; schwerer Verlauf mit Nachtblindheit ab der frühen Kindheit, starken Einschränkungen des Gesichtsfeldes und ausgelöschten Stäbchen-ERGs mit 30 Jahren; fundoskopisch typische "Knochenkörperchen"-artige Pigmentierungen [11]

rezessiv	4p16.3	Mutationen im PDE6B-Gen nachgewiesen; Nachtblindheit ab der frühen Kindheit, nachfolgend konzentrische GF-Einschränkung, im ERG ausgelöschte Stäbchenantworten; fundoskopisch verengte Gefäße und "Knochenkörperchen"-artige Pigmentierungen in der mittleren Peripherie [126]
rezessiv	5q33.1	Mutationen im PDE6A-Gen nachgewiesen; Nachtblindheit ab der frühen Kindheit, deutliche periphere GF-Verluste, v.a. stäbchenbetonte ERG-Veränderungen; fundoskopisch Gefäßverengungen, Papillenabblassung und "Knochenkörperchen"-artige Pigmentierungen [88]
digenisch/ dominant	11q12.3	ROM 1-Gen; typischer RP-Verlauf mit Nachtblindheit in der Jugend, zunehmenden Gesichtsfeldeinschränkung und gesetzlicher Blindheit im mittleren Lebensalter; einach heterozygote Träger bei digenischer Vererbung zeigen leichte ERG-Veränderungen ohne fundoskopische Auffälligkeiten [91]
rezessiv	10q23.1	Mutationen im RGR-Gen beschrieben; schwerer Verlauf mit GF-Einschränkung, ERG-Veränderungen und reduzierter Sehschärfe, Fundusveränderungen an den Gefäßen und De- und Hyperpigmentierungen [130]
dominant	19q13.3	Mutationen im CRX-Gen nachgewiesen; klinisch breites Phänotyp-Spektrum von progressiven Krankheiten wie Cone-Rod-Dystrophy und spät einsetzender RP bis hin zu Kongenitaler Amaurose Typ Leber; fundoskopisch RPE-

Atrophie und Hyperpigmentierungen

rezessiv	2q14.1	Mutationen im MERTK-Gen nachgewiesen; schwerer Verlauf mit schlechtem Sehvermögen und Nachtblindheit ab der frühen Kindheit, ab Mitte 30 nur noch kleine zentrale Gesichtsfeldinsel [64]
rezessiv	2q37.1	Mutationen im SAG1-Gen nachgewiesen; klinisch RP-Phänotyp mit mit Netzhautdegeneration in der mittleren Peripherie und Hyperpigmentierung; auch bei Oguchi-Krankheit nachgewiesen [135]
rezessiv	15q23	Mutationen im NR2E3/PNR-Gen nachgewiesen; Nachtblindheit in der 1. Dekade, in der 2. und 3. Dekade zunehmende konzentrische Einschränkung des Gesichtsfeldes, Nachlassen der Sehschärfe um 40 Jahre, fundoskopisch Hyperpigmentierung, RPE-Atrophie und Papillenabblassung [67]
rezessiv	15q26.1	Mutationen im RLBP1-Gen nachgewiesen; Beginn mit früher Nachtblindheit und rasch progredientem Verlauf im Sinne einer RP oder Retinitis punctata albescens [28]
rezessiv	4q32.1	Mutationen im LRAT-Gen nachgewiesen; schwerer Verlauf mit frühem Erkrankungsbeginn; pathophysiologisch Störung der 11-cis-Retinal-Synthese [186]

Quelle: OMIM-Datenbank, RetNet, [45,78,93,178]

7.2 Rhodopsin-Sequenz

10			20			30			40			50		
GGATCCTGAG			TACCTCTCCT			CCCTGACCTC			AGGGTTCCTC			CTAGTGTAC		
60			70			80			90			100		
CTTGGCGCCT			CTTAGAAGCG			AATTAGGCC			TCAGTTTCTG			CAGCGGGGAT		
110			120			130			140			150		
TAATATGATT			ATGAACACCC			CCAATCTCCC			AGATGCTGAT			TCAGCCAGGA		
160			170			180			190			200		
GCTTAGGACG			GGGAGGTCAC			TTTATAAGGG			TCTGGGGGGG			TCAGAACCCA		
210			220			230			240			250		
GAGTCATCCA			GCTGGAGCCC			TGAGTGGCTG			AGCTCAGGCC			TTCGCAGCAT		
260			270			280			290			294		
TCTTGGGTGG			GAGCACCCAC			GGGTCAGCCA			CAAGGGCCAC			AGCC		
309			324			339								
ATG	AAT	GGC	ACA	GAA	GGC	CCT	AAC	TTC	TAC	GTG	CCC	TTC	TCC	AAT
Met	Asn	Gly	Thr	Glu	Gly	Pro	Asn	Phe	Tyr	Val	Pro	Phe	Ser	Asn
5			10			15								
354			369			384								
GCG	ACG	GGT	GTG	GTA	CGC	AGC	CCC	TTC	GAG	TAC	CCA	CAG	TAC	TAC
Ala	Thr	Gly	Val	Val	Arg	Ser	Pro	Phe	Glu	Tyr	Pro	Gln	Tyr	Tyr
20			25			30								
399			414			429								
CTG	GCT	GAG	CCA	TGG	CAG	TTC	TCC	ATG	CTG	GCC	GCC	TAC	ATG	TTT
Leu	Ala	Glu	Pro	Trp	Gln	Phe	Ser	Met	Leu	Ala	Ala	Tyr	Met	Phe
35			40			45								
444			459			474								
CTG	CTG	ATC	GTG	CTG	GGC	TTC	CCC	ATC	AAC	TTC	CTC	ACG	CTC	TAC
Leu	Leu	Ile	Val	Leu	Gly	Phe	Pro	Ile	Asn	Phe	Leu	Thr	Leu	Tyr
50			55			60								
489			504			519								
GTC	ACC	GTC	CAG	CAC	AAG	AAG	CTG	CGC	ACG	CCT	CTC	AAC	TAC	ATC
Val	Thr	Val	Gln	His	Lys	Lys	Leu	Arg	Thr	Pro	Leu	Asn	Tyre	Ile
65			70			75								
534			549			564								
CTG	CTC	AAC	CTA	GCC	GTG	GCT	GAC	CTC	TTC	ATG	GTC	CTA	GGT	GGC
Leu	Leu	Asn	Leu	Ala	Val	Ala	Asp	Leu	Phe	Met	Val	Leu	Gly	Gly
80			85			90								
579			594			609								
TTC	ACC	AGC	ACC	CTC	TAC	ACC	TCT	CTG	CAT	GGA	TAC	TTC	GTC	TTC
Phe	Thr	Ser	Thr	Leu	Tyr	Thr	Ser	Leu	His	Gly	Tyr	Phe	Val	Phe
95			100			105								

				624					639					654
GGG	CCC	ACA	GGA	TGC	AAT	TTG	GAG	GGC	TTC	TTT	GCC	ACC	CTG	GGC
Gly	Pro	Thr	Gly	Cys	Asn	Leu	Glu	Gly	Phe	Phe	Ala	Thr	Leu	Gly
				110					115					120

GTATGAGCCG... Intron 1 ...TGCCTTGCAG

↓				2452					2467					2482
GGT	GAA	ATT	GCC	CTG	TGG	TCC	TTG	GTG	GTC	CTG	GCC	ATC	GAG	CGG
Gly	Glu	Ile	Ala	Leu	Trp	Ser	Leu	Val	Val	Leu	Ala	Ile	Glu	Arg
				125					130					135

				2497					2512					2527
TAG	GTG	GTG	GTG	TGT	AAG	CCC	ATG	AGC	AAC	TTC	CGC	TTC	GGG	GAG
Tyr	Val	Val	Val	Cys	Lys	Pro	Met	Ser	Asn	Phe	Arg	Phe	Gly	Glu
				140					145					150

				2542					2557					2572
AAC	CAT	GCC	ATC	ATG	GGC	GTT	GCC	TTC	ACC	TGG	GTC	ATG	GCG	CTG
Asn	His	Ala	Ile	Met	Gly	Val	Ala	Phe	Thr	Trp	Val	Met	Ala	Leu
				155					160					165

GTAATGGCAC... Intron 2 ...CTGTCCTCAG

				2587					2602		↓			3822
GCC	TGC	GCC	GCA	CCG	CCA	CTC	GCC	GGC	TGG	TCC	AGG	TAC	ATC	CCC
Ala	Cys	Ala	Ala	Pro	Pro	Leu	Ala	Gly	Trp	Ser	Arg	Tyr	Ile	Pro
				170					175					180

				3837					3852					3867
GAG	GGC	CTG	CAG	TGC	TCG	TGT	GGA	ATC	GAC	TAC	TAC	ACG	CTC	AAG
Glu	Gly	Leu	Gln	Cys	Ser	Cys	Gly	Ile	Asp	Tyr	Tyr	Thr	Leu	Ly
				185					190					195

				3882					3897					3912
CCG	GAG	GTC	AAC	AAC	GAG	TCT	TTT	GTC	ATC	TAC	ATG	TTC	GTG	GTC
Pro	Glu	Val	Asn	Asn	Glu	Ser	Phe	Val	Ile	Tyr	Met	Phe	Val	Val
				200					205					210

				3927					3942					3957
CAC	TTC	ACC	ATC	CCC	ATG	ATT	ATC	ATC	TTT	TTC	TGC	TAT	GGG	CAG
His	Phe	Thr	Ile	Pro	Met	Ile	Ile	Ile	Phe	Phe	Cys	Tyr	Gly	Gln
				215					220					225

GTACGGGCCG... Intron 3 ...TGTCCTGCAG

				3972		↓			4103					4118
CTC	GTC	TTC	ACC	GTC	AAG	GAG	GCC	GCT	GCC	CAG	CAG	CAG	GAG	TCA
Leu	Val	Phe	Thr	Val	Lys	Glu	Ala	Ala	Ala	Gln	Gln	Gln	Glu	Ser
				230					235					240

				4133					4148					4163
GCC	ACC	ACA	CAG	AAG	GCA	GAG	AAG	GAG	GTC	ACC	CGC	ATG	GTC	ATC
Ala	Thr	Thr	Gln	Lys	Ala	Glu	Lys	Glu	Val	Thr	Arg	Met	Val	Ile
				245					250					255

ATC ATG GTC	4178	ATC GCT TTC	4193	TGG GTG CCC	4208	TAC GCC AGC
Ile Met Val		Ile Ala Phe		Trp Val Pro		Tyr Ala Ser
	260		265		270	
GTG GGA TTC	4223	TAC ATC TTC	4238	GGC TCC AAC	4253	TTC GGT CCC
Val Ala Phe		Tyr Ile Phe		Gly Ser Asn		Phe Gly Pro
	275		280		285	
ATC TTC ATG	4268	ACC ATC CCA	4283	GCC AAG AGC	4298	GCC GCC ATC
Ile Phe Met		Thr Ile Pro		Ala Lys Ser		Ala Ala Ile
	290		295		300	
GTGCCTACTG... Intron 4 ...TGCCTTCCAG						
TAC AAC CCT	4313	GTC ATC TAT	4328	AAC AAG CAG	↓	5176
Tyr Asn Pro		Val Ile Tyr		Asn Lys Gln		Phe Arg Asn
	305		310		315	
TGC ATG CTC	5191	ACC ACC ATC	5206	AAG AAC CCA	5221	CTG GGT GAC
Cys Met Leu		Thr Thr Ile		Lys Asn Pro		Leu Gly Asp
	320		325		330	
GAT GAG GCC	5236	TCT GCT ACC	5251	ACG GAG ACG	5266	AGC CAG GTG
Asp Glu Ala		Ser Ala Thr		Thr Glu Thr		Ser Gln Val
	335		340		345	
	5275	GCC CCG GCC	5285		5295	
		Ala Pro Ala	TAAGACCTGC		CTAGGACTCT	
	348					
5305	5315	5325	5335	5345		
GTGGCCGACT	ATAGGCGTCT	CCCATCCCCT	ACACCTTCCC	CCAGCCACAG		
5355	5365	5375	5385	5395		
CCATCCCACC	AGGAGCAGCG	CCTGTGCAGA	ATGAACGAAG	TCACATAGGC		
5405	5415	5425	5435	5445		
TCCTTAATTT	TTTTTTTTTT	TTTAAGAAAT	AATTAATGAG	GCTCCTCACT		
5455	5465	5475	5485	5495		
CACCTGGGAC	AGCCTGAGAA	GGGACATCCA	CCAAGACCTA	CTGATCTGGA		
5505	5515	5525	5535	5545		
GTCCCACGTT	CCCCAAGGCC	AGCGGGATGT	GTGCCCCTCC	TCCTCCCAAC		
5555	5565	5575	5585	5595		
TCATCTTTCA	GGAACACGAG	GATTCTTGCT	TTCTGGAAAA	GTGTCCCAGC		

5605 TTAGGGATAA	5615 GTGTCTAGCA	5625 CAGAATGGGG	5635 CACACAGTAG	5645 GTGCTTAATA
5655 AATGCTGGAT	5665 GGATCCAGGA	5675 AGGAATGGAG	5685 GAATGAATGG	5695 GAAGGGAGAA
5705 CATATCTATC	5715 CTCTCAGACC	5725 CTCGCAGCAG	5735 CAGCAACTCA	5745 TACTTGGCTA
5755 ATGATATGGA	5765 GCAGTTGTTT	5775 TTCCCTCCCT	5785 GGGCCTCACT	5795 TTCTTCTCCT
5805 ATAAAATGGA	5815 AATCCCAGAT	5825 CCCTGGTCCT	5835 GCCGACACGC	5845 AGCTACTGAG
5855 AAGACCAAAA	5865 GAGGTGTGTG	5875 TGTGTCTATG	5885 TGTGTGTTTC	5895 AGCACTTTGT
5905 AAATAGCAAG	5915 AAGCTGTACA	5925 GATTCTAGTT	5935 AATGTTGTGA	5945 ATAACATCAA
5955 TTAATGTAAC	5965 TAGTTAATTA	5975 CTATGATTAT	5985 CACCTCCTGA	5995 TAGTGAACAT
6005 TTTGAGATTG	6015 GGCATTCAGA	6025 TGATGGGGTT	6035 TCACCCAACC	6045 TTGGGGCAGG
6055 TTTTTAAAAA	6065 TTAGCTAGGC	6075 ATCAAGGCCA	6085 GACCAGGGCT	6095 GGGGGTTGGG
6105 CTGTAGGCAG	6115 GGACAGTCAC	6125 AGGAATGCAG	6135 GATGCAGTCA	6145 TCAGACCTGA
6155 AAAAACAACA	6165 CTGGGGGAGG	6175 GGGACGGTGA	6185 AGGCCAAGTT	6195 CCCAATGAGG
6205 GTGAGATTGG	6215 GCCTGGGGTC	6225 TCACCCCTAG	6235 TGTGGGGCCC	6245 CAGGTCCCGT
6255 GCCTCCCCTT	6265 CCCAATGTGG	6275 CCTATGGAGA	6285 GACAGGCCTT	6295 TCTCTCAGCC
6305 TCTGGAAGCC	6315 ACCTGCTCTT	6325 TTGCTCTAGC	6335 ACCTGGGTCC	6345 CAGCATCTAG
6355 AGCATGGAGC	6365 CTCTAGAAGC	6375 CATGCTCACC	6385 CGCCCACATT	6395 TAATTAACAG
6405 CTGAGTCCCT	6415 GATGTCATCC	6425 TTRACTGAAG	6435 AGCTTAGAAA	6445 CAAAGAGTGG
6455 GAAATTCCAC	6465 TGGGCCTACC	6475 TTCCTTGGGG	6485 ATGTTTCATG	6495 GCCCCAGTTT

6505 CCAGTTTCCC	6515 TTGCCAGACA	6525 AGCCCATCTT	6535 CAGCAGTTGC	6545 TAGTCCATTC
6555 TCCATTCTGG	6565 AGAATCTGCT	6575 CCAAAAAGCT	6585 GGCCACATCT	6595 CTGAGGTGTC
6605 AGAATTAAGC	6615 TGCCTCAGTA	6625 ACTGCTCCCC	6635 CTTCTCCATA	6645 TAAGCAAAGC
6655 CAGAAGCTCT	6665 AGCTTTACCC	6675 AGCTCTGCCT	6685 GGAGACTAAG	6695 GCAAATTGGG
6705 CCATTAAAAG	6715 CTCAGCTCCT	6725 ATGTTGGTAT	6735 TAACGGTGGT	6745 GGGTTTTTGT
6755 GCTTTCACAC	6765 TCTTCCACA	6775 GGATAGATTG	6785 AAACTGCCAG	6795 CTTCCACCTG
6805 ATCCCTGACC	6815 CTGGGATGGC	6825 TGGATTGAGC	6835 AATGAGCAGA	6845 GCCAAGCAGC
6855 ACAGAGTCCC	6865 CTGGGGCTAG	6875 AGGTGGAGGA	6885 GGCAGTCCTG	6895 GGAATGGGAA
6905 AAACCCCAAC	6915 TTTGGGGTCA	6925 TAGAGGCACA	6935 GGTAACCCAT	6945 AAAAGTCAA
6553 ACAAGCTT				

Quelle [136]

7.2 Bekannte Rhodopsin-Mutationen (Tab. 2)

Stand: 1997

Exon/Codon	Abschnitt	Mutation	Phänotyp	Erstbeschreiber
I / 4	Aminoterm.	Thr4Lys	adRP	Gal et al., 1995
I / 15	Aminoterm.	Asn15Ser	adRP	Kranich et al., 1993
I / 17	Aminoterm.	Thr17Met	adRP	Sung et al., 1991
I / 23	Aminoterm.	Pro23His	adRP	Dryja et al., 1990
I / 23	Aminoterm.	Pro23Leu	adRP	Dryja et al., 1991
		Pro23Ala	adRP	Oh et al., 2000
I / 28	Aminoterm.	Gln28His	adRP	Gal et al., 1995
I / 40	M1	Leu40Arg	adRP	Kim et al., 1993
I / 44	M1	Met44Thr	arRP	Reig et al., 1993
I / 45	M1	Phe45Leu	adRP	Sung et al., 1991
I / 46	M1	Leu46Arg	adRP	Rodriguez et al., 1993
I / 51	M1	Gly51Val	adRP	Dryja et al., 1991
I / 51	M1	Gly51Arg	adRP	Dryja et al., 1992
I / 51	M1	Gly51Ala	?	Macke et al., 1993
I / 53	M1	Pro53Arg	adRP	Inglehearn et al., 1992
I / 58	M1	Thr58Arg	adRP	Dryja et al., 1990
I / 64	i1	Gln64Stop	adRP	Macke et al., 1993
I / 68-71	i1	68-71del (12bp)	adRP	Keen et al., 1991

I / 87	M2	Val87Asp	adRP	Sung et al., 1991
I / 89	M2	Gly89Asp	adRP	Sung et al., 1991
I / 90	M2	Gly90Asp	DCCN	Sieving et al., 1991
I / 106	e1	Gly106Trp	adRP	Sung et al., 1991
I / 106	e1	Gly106Arg	adRP	Ingelehearn et al., 1992
I / 110	M3	Cys110Tyr	adRP	Dryja et al., 1992
I / 110	M3	Cys110Phe	adRP	Gal et al., ?
I / 114	M3	Gly114Asp	adRP	Vaithinathan et al., 1994
II / 125	M3	Leu125Arg	adRP	Dryja et al., 1991
II / 127	M3	Ser127Phe	adRP	Souied et al., 1994
II / 131	M3	Leu131Arg	adRP	Souied et al., 1994
II / 131	M3	Leu131Pro	adRP	Fuchs et al., 1994
II / 135	i2	Arg135Leu	adRP	Sung et al., 1991
II / 135	i2	Arg135Trp	adRP	Sung et al., 1991
II / 135	i2	Arg135Gly	adRP	Gal et al., 1995
II / 135	i2	Arg135Pro	adRP	Rodriguez et al., 1994
II / 137	i2	Val137Met	adRP	Manuskript
II / 140	i2	Cys140Ser	adRP	Macke et al., 1993
II / 140	i2	Cys140ins (150bp)	adRP	al Maghthteh et al., 1994
II / 150	i2	Glu150Lys	arRP	Kumaramanickavel et al., 1994
II / 164	M4	Ala164Val	adRP	Fuchs et al., 1994
II / 164	M4	Ala164Glu	adRP	Vaithinathan et al., 1994
II / 167	M4	Cys167Arg	adRP	Dryja et al., 1991
II / 171	M4	Pro171Leu	adRP	Dryja et al., 1991
II / 171	M4	Pro171Ser	adRP	Stone et al., 1993
II / 171	M4	Pro171Gln	adRP	Antinolo et al., 1994
II / 174	M4	Gly174Ser	arRP	Fujiki et al., 1995
III / 178	e2	Tyr178Asn	adRP	Souied et al., 1994
III / 178	e2	Tyr178Cys	adRP	Sung et al., 1991
III / 180	e2	Pro180Ala	adRP	Rodriguez et al., 1994
III / 181	e2	Glu181Lys	adRP	Dryja et al., 1991
III / 182	e2	Gly182Ser	adRP	Sheffield et al., 1991
III / 186	e2	Ser186Pro	adRP	Dryja et al., 1991
III / 186	e2	Ser186Trp	adRP	Rüther et al., 1995
III / 187	e2	Cys187Tyr	adRP	Scott et al., ?
III / 188	e2	Gly188Arg	adRP	Dryja et al., 1991
III / 188	e2	Gly188Glu	adRP	Macke et al., 1993
III / 190	e2	Asp190Gly	adRP	Sung et al., 1991
III / 190	e2	Asp190Asn	adRP	Keen et al., 1991
III / 190	e2	Asp190Tyr	adRP	Stone et al., 1993
III / 207	e2	Met207Arg	adRP	Farrar et al., 1992
III / 209	M5	Val209Met	?	Macke et al., 1993
III / 211	M5	His211Pro	adRP	Keen et al., 1991
III / 211	M5	His211Arg	adRP	Macke et al., 1993
III / 216	M5	Met216Lys	adRP	al Maghthteh et al., 1994
III / 220	M5	Phe220Cys	adRP	Gal et al., 1995
III / 222	M5	Cys222Arg	adRP	Gal et al., 1995
IV / 234	i3	Val234del (2bp)	adRP	Gal et al., ?
IV / 249	i3	Glu249Stop	arRP	Rosenberg et al., 1992
IV / 255	M6	Ile255del	adRP	Inglehearn et al., 1991
IV / 264	M6	Cys264del (3bp)	adRP	Vaithinathan et al., 1996

IV / 267	M6	Pro267Leu	adRP	Sheffield et al., 1991
IV / 267	M6	Pro267Arg	adRP	Souied et al., 1993
IV / 270	M6	Ser270Arg	adRP	Rodriguez et al., 1994
IV / 292	M7	Ala292Glu	DCCN	Dryja et al., 1993
IV / 296	M7	Lys296Glu	adRP	Keen et al., 1991
IV / 296	M7	Lys296Met	adRP	Sullivan et al., 1993
IV / 297	M7	Ser297Arg	adRP	Souied et al., 1994
V	i4, Splice	4335 G-T	arRP, evtl. Polymorphismus	Rosenfeld et al., 1992
V / 314-316	i4	Intr.4-Cys316 ins(150bp) del(30bp)	adRP	al Maghtheh et al., ?
V / 322-336	i4/Carboxyterm.	Cys322del (45bp)	adRP	Rodriguez et al., 1993
V / 328	Carboxyterm.	Leu328Pro	adRP	Rodriguez et al., 1993
V / 332.336	Carboxyterm.	332Glu del (15bp)	?	Rodriguez et al., 1993
V / 340	Carboxyterm.	Thr340del (1bp) Frameshift	adRP	Horn et al., 1992
V / 340-348	Carboxyterm.	Thr340del (42bp)	adRP	Restango et al., 1993
V / 341-343	Carboxyterm.	Glu341del (8bp)	adRP	Apfelstedt-Sylla et al., 1992
V / 341-343	Carboxyterm.	Glu341Lys	adRP	Richards and Sieving, 1993
V / 342	Carboxyterm.	Thr342Met	adRP	Stone et al., 1993
V / 344	Carboxyterm.	Gln344Stop	adRP	Sung et al., 1991
V / 345	Carboxyterm.	Val345Met	adRP	Dryja et al., 1991
V / 345	Carboxyterm.	Val345Leu	adRP	Vaithinathan et al., 1996
V / 347	Carboxyterm.	Pro347Leu	adRP	Dryja et al., 1990
V / 347	Carboxyterm.	Pro347Ser	adRP	Dryja et al., 1990
V / 347	Carboxyterm.	Pro347Arg	adRP	Gal et al., 1991
V / 347	Carboxyterm.	Pro347Ala	adRP	Stone et al., 1993
V / 347	Carboxyterm.	Pro347Gln	adRP	Vaithinathan et al., 1996
V / 347	Carboxyterm.	Pro347Thr	adRP	Rodriguez et al., 1993
	Carboxyterm.	Ins (60bp)	adRP	Kim et al., 1993
I / 104	e1	Val104Ile	Leber Dystr.	Macke et al., 1993

Quellen [3,63]

7.3 Bekannte Rhodopsin-Polymorphismen (Tab. 3)

Stand: 1997

Exon/Codon	Abschnitt	Veränderung	Phänotyp	Erstbeschreiber
I / 107	e1	Pro107Pro (CCC-CCT)	Polymorph.	Gal et al., 1995
I / 120	M3	Gly120Gly (GGC-GGT)	Polymorph.	Dryja et al., 1991
II / 160	M4	Thr160Thr (ACC-ACA)	Polymorph.	Sung et al., 1991
II / 173	M4	Ala173Ala (GCC-GCT)	Polymorph.	Dryja et al., 1991
IV / 248	i3	Lys248Lys (AAG-AAA)	Polymorph.	Sung et al., 1991
IV / 284	e3	Gly1284Ser (GGT-AGT)	Polymorph.	Gal et al., 1996
IV / 297	M7	Ser297Ser (AGC-AGT)	Polymorph.	Saga et al., 1993
5'-Ende		269 A-G	Polymorph.	Dryja et al., 1991
	Intron 1	(CA)n	Polymorph.	Weber and May, 1989
	Intron 3	C-A	Polymorph.	Saga et al., 1993
	Intron 3	3982 C-T	Polymorph.	Dryja et al., 1991
	Intron 4	5145 G-A	Polymorph.	Sung et al., 1991
3'-Ende		5321 C-A	Polymorph.	Dryja et al., 1990

Quelle [3,63]

7.4 Peripherin-Sequenz

10			20			30			40			50		
CAGCGCCCAG			GACCAGGACT			ATAAACTGAT			CAAGCTGTGA			TTCCGAGACC		
60			70			80			90			100		
CCTGCCACCA			CTACTGCATT			CACGGGGATC			CCAGGCTAGT			GGGACTCGAC		
110			120			130			140			150		
ATGGGTAGCC			CCCAGGGCAG			CTCCCTACAG			CTTGGGCCAT			CTGCACTTTT		
160			170			180			190			200		
CCCAAGGCCC			TAAGTCTCCG			CCTCTGGGCT			CGTTAAGGTT			TGGGGTGGGA		
210			220			230			240					
GCTGTGCTGT			GGGAAGCAAC			CCGGACTACA			CTTGGCAAGC					
255									270			285		
ATG	GCG	CTA	CTG	AAA	GTC	AAG	TTT	GAC	CAG	AAG	AAG	CGG	GTC	AAG
Met	Ala	Leu	Leu	Lys	Val	Lys	Phe	Asp	Gln	Lys	Lys	Arg	Val	Lys
			5						10			15		
300									315			330		
TTG	GCC	CAA	GGG	CTC	TGG	CTC	ATG	AAC	TGG	TTC	TCC	GTG	TTG	GCT
Leu	Ala	Gln	Gly	Leu	Trp	Leu	Met	Asn	Trp	Phe	ser	Val	Leu	Ala
			20						25			30		
345									360			375		
GGC	ATC	ATC	ATC	TTC	AGC	CTA	GGA	CTG	TTC	CTG	AAG	ATT	GAA	CTC
Gly	Ile	Ile	Ile	Phe	Ser	Leu	Gly	Leu	Phe	Leu	Lys	Ile	Göu	Leu
			35						40			45		
390									405			420		
CGA	AAG	AGG	AGC	GAT	GTG	ATG	AAT	AAT	TCT	GAG	AGC	CAT	TTT	GTG
Arg	Lys	Arg	Ser	Asp	Val	Met	Asn	Asn	Ser	Glu	Ser	His	Phe	Val
			50						55			60		
435									450			465		
CCC	AAC	TCA	TTG	ATA	GGG	ATG	GGG	GTG	CTA	TCC	TGT	GTC	TTC	AAC
Pro	Asn	Ser	Leu	Ile	Gly	Met	Gly	Val	Leu	Ser	Cys	Val	Phe	Asn
			65						70			75		
480									495			510		
TCG	CTG	GCT	GGG	AAG	ATC	TGC	TAC	GAC	GCC	CTG	GAC	CCA	GCC	AAG
Ser	Leu	Ala	Gly	Lys	Ile	Cys	Tyr	Asp	Ala	Leu	Asp	Pro	Ala	Lys
			80						85			90		
525									540			555		
TAT	GCC	AGA	TGG	AAG	CCC	TGG	CTG	AAG	CCG	TAC	CTG	GCT	ATC	TGT
Tyr	Ala	Arg	Trp	Lys	Pro	Trp	Leu	Lys	Pro	Tyr	Leu	ala	Ile	Cys
			95						100			105		

				570					585					600
GTC	CTC	TTC	AAC	ATC	ATC	CTC	TTC	CTT	GTG	GCT	CTC	TGC	TGC	TTT
Val	Leu	Phe	Asn	Ile	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Leu	Cys	Cys	Phe
				110					115					120
				615					630					645
CTG	CTT	CGG	GGC	TCG	CTG	GAG	AAC	ACC	CTG	GGC	CAA	GGG	CTC	AAG
Leu	Leu	Arg	Gly	Ser	Leu	Glu	Asn	Thr	Leu	Gly	Gln	Gly	Leu	Lys
				125					130					135
				660					675					690
AAC	GGC	ATG	AAG	TAC	TAC	CGG	GAC	ACA	GAC	ACC	CCT	GGC	AGG	TGT
Asn	Gly	Met	Lys	Tyr	Tyr	Arg	Asp	Thr	Asp	Thr	Pro	Gly	Arg	Cys
				140					145					150
				705					720					735
TTC	ATG	AAG	AAG	ACC	ATC	GAC	ATG	CTG	CAG	ATC	GAG	TTC	AAA	TGC
Phe	Met	Lys	Lys	Thr	Ile	Asp	Met	Leu	Gln	Ile	Glu	Phe	Lys	Cys
				155					160					165
				750					765					780
TGC	GGC	AAC	AAC	GGT	TTT	CGG	GAC	TGG	TTT	GAG	ATT	CAG	TGG	ATC
Cys	Gly	Asn	Asn	Gly	Phe	Arg	Asp	Trp	Phe	Glu	Ile	Gln	Trp	Ile
				170					175					180
									GTGAGTGGCT...	Intron 1	...	TCCCTTTAAG		
				795					810				↓	825
AGC	AAT	CGC	TAC	CTG	GAC	TTT	TCC	TCC	AAA	GAA	GTC	AAA	GAT	CGA
Ser	Asn	Arg	Tyr	Leu	Asp	Phe	Ser	Ser	Lys	Glu	Val	Lys	Asp	Arg
				185					190					195
				840					855					870
ATC	AAG	AGC	AAC	GTG	GAT	GGG	CGG	TAC	CTG	GTG	GAC	GGC	GTC	CCT
Ile	Lys	Ser	Asn	Val	Asp	gly	Arg	Tyr	Leu	Val	Asp	Gly	Val	Pro
				200					205					210
				885					900					915
TTC	AGC	TGC	TGC	AAT	CCT	AGC	TCG	CCA	CGG	CCC	TGC	ATC	CAG	TAT
Phe	Ser	Cys	Cys	Asn	Pro	Ser	Ser	Pro	Arg	Pro	Cys	Ile	Gln	Tyr
				215					220					225
				930					945					960
CAG	ATC	ACC	AAC	AAC	TCA	GCA	CAC	TAC	AGT	TAC	GAC	CAC	CAG	ACG
Gln	Ile	Thr	Asn	Asn	Ser	Ala	His	Tyr	Ser	Tyr	Asp	His	Gln	Thr
				230					235					240
				975					990					1005
GAG	GAG	CTC	AAC	CTG	TGG	GTG	CGT	GGC	TGC	AGG	GCT	GCC	CTG	CTG
Glu	Glu	Leu	Asn	Leu	Trp	Val	Arg	Gly	Cys	Arg	Ala	Ala	Leu	Leu
				245					250					255
				1020					1035					1050
AGC	TAC	TAC	AGC	AGC	CTC	ATG	AAC	TCC	ATG	GGT	GTC	GTC	ACG	CTC
Ser	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Leu	Met	Asn	Ser	Met	Gly	Val	Val	Thr	Leu
				260					265					270

GTAGGCCCTG... Intron 2 ...CCACCACCAG

1065 ↓ 1080 1095

CTC ATT TGG CTC TTC GAG GTG ACC ATT ACA ATT GGG CTG CGC TAC
 Leu Ile Trp Leu Phe Glu Val thr Ile Thr Ile Gly Leu Arg Tyr
 275 280 285

1110 1125 1140

CTA CAG ACG TCG CTG GAT GGT GTG TCC AAC CCC GAG GAA TCT GAG
 Leu Gln Thr Ser Leu Asp Gly Val Ser Asn Pro Glu Glu Ser Glu
 290 295 300

1155 1170 1185

AGC GAG AGC GAG GGC TGG CTG CTG GAG AAG AGC GTG CCG GAG ACC
 Ser Glu Ser Glu Gly Trp Leu Leu Glu Lys Ser Val Pro Glu Thr
 305 310 315

1200 1215 1230

TGG AAG GCC TTT CTG GAG AGT GTG AAG AAG CTG GGC AAG GGC AAC
 Trp Lys Ala Phe Leu Glu Ser Val Lys Lys Leu Gly Lys Gly Asn
 320 325 330

1245 1260 1275

CAG GTG GAA GCC GAG GGC GCA GGC GCA GGC CAG GCC CCA GAG GCT
 Gln Val Glu Ala Glu Gly Ala Gly Ala Gly Gln Ala Pro Glu Ala
 335 340 345

1290 1305 1320

GGC TGAGGGCCCTGG GGCCCTCCCTCCC GAACACTGAGAAATA
 Gly
 346

1330 1340 1350 1360 1370

GTGCACTCCA AGAAACGTGG ATCTCCCCCT CATCCAACCTC CGAAAGTCTG

1380 1390 1400 1410 1420

AATCTCCCAA GGAGGGCACC ATCTTACAGA GACTCTCCCT GACGGTGGAA

1430 1440 1450 1460 1470

TTTAAGTTTA GGGTCCCTAA AAGCATTTGA CACACAGTTG TTGAATGACT

1480 1490 1500 1510 1520

GACCCAAAAT GTGAATGAAG CTAATGTGAA TGTGAGTGAA GCTCCCTTCA

1530 1540 1550 1560 1570

GGCCCGCTGC CCTAGGATAT GCCCTCCTGG TGA CTCGGGG GCTGTCTCAG

1580 1590 1600 1610 1620

ACGACTAGCC CAGGACCCAT CTTTCTCACA CGGATTTAGT CCCACCCTAT

1630 1640 1650 1660 1670

GGCCACTGGC CGTATCTGAG GGCTGCTCCC CTTTTAGAAT TTACCTCTTA

1680 1690 1700 1710 1720

TGAGCTCCAT GTTGCTTCAC TCTATCCAAA GTGTCACTTG GTGCATAAGC

1730 ACAGAAATCT	1740 GAAAAATGGC	1750 CATGTTGTCT	1760 TTTTTTTTTT	1770 TTTTTTTTTAA
1780 TGCCAAGATT	1790 GACAGGTTGG	1800 CCGTTTGCTT	1810 AATGCCAGAA	1820 GTTGGGGGAA
1830 AGTTACACTT	1840 TTCTAAGAAT	1850 AATGGACTCT	1860 TAAGGCATTG	1870 AGGGCTCTAA
1880 ACAGGATTCT	1890 TTAATCATGG	1900 AGCAAGAGAA	1910 TTTCAAGGCA	1920 GGGGATTTTA
1930 TCCCCACCA	1940 AAAACACAGT	1950 GAAAGGCCTG	1960 CTTTTGTGTC	1970 CCATTCACAT
1980 GCCCTCGGTC	1990 ACTGAGTCTG	2000 GAGTGAACCA	2010 CGGGTTGAGG	2020 AAGTCAGGCT
2030 GTTGGCGTGT	2040 CCCAGCACCA	2050 CACCATCCCT	2060 AAAGTGCCAG	2070 GTGATCTCCT
2080 GTGGCTCATC	2090 GGTGGAAGCA	2100 GTGGGGTAGG	2110 CTGCTGCCCT	2120 GCTGTGGAAG
2130 AGGAGCAACA	2140 ATCAGACATG	2150 AGTCCACCCT	2160 TTGGAGACCA	2170 AGCCTCAGCT
2180 CTTGGTGGGC	2190 CAAGGGACAC	2200 CCACACAGGT	2210 GGCCATCACA	2220 GCCCCATGGA
2230 CAACACTAAT	2240 TGTCCACAGC	2250 AAAGGGCAAG	2260 GAATCCTCTG	2270 GGAGCTTCTT
2280 CCGTTTCTTC	2290 CCCCAAGATA	2300 CCCATCTTGA	2310 AAAACACTAT	2320 TTCTGGAATG
2330 CTTCTGCATC	2340 AAAGGAGATT	2350 CTTTGAGATA	2360 GCCCATCTTC	2370 CTGAGCTAGC
2380 AAATACAGGA	2390 GTTTTCACTT	2400 TCTTTAGGAA	2410 AGAGAAGCTT	2420 TCAGGGGAAG
2430 GAGAGAATGA	2440 TTTTGCTGAC	2450 TTCCCAAGCC	2460 CTGGTGACCA	2470 GACCAAGGCA
2480 GGGCCAGCA	2490 TAATTCCTCC	2500 AGTTGGATGA	2510 ACATTCAAGA	2520 GAGCTCGTTC
2530 CTACCTGGCT	2540 GGAGACCGAG	2550 GCCAGAAGGC	2560 AAAAACCAGA	2570 AAGGGAACAG
2580 TCCATAACTT	2590 ACCTCTGCTT	2600 CTGACCGATG	2610 GTGTTTGGA	2620 ATAGGTTACT

2630 TTGGACTGAG	2640 TTTGGGTTCT	2650 TTGCTGTCCT	2660 AAGAACTTTA	2670 GTGTAGAGAA
2680 AATAAGACTT	2690 CTGGTGCTGC	2700 TGGGGTATGT	2710 TCTGGGCTTA	2720 ATTCCCCCAA
2730 GCAGAAAGACC	2740 AGATCCAAGA	2750 TGTTTGACACA	2760 CCCTGTCAGA	2770 CGTTGGTCCC
2780 AAGTTTAATT	2790 AGATTTCTGA	2800 ATCTCGTTGA	2810 GGCCAAGGAA	2820 TGATCCATAC
2830 TGAAAAAATG	2840 CTGAGCCAGC	2850 CATCTTTGGC	2860 AAAGGTCCTT	2870 GAGCTCTTGC
2880 TATCTCTCAA	2890 GAGTGCTGAG	2900 AACCACGGTG	2910 AAAGTGCTGC	2920 TCTAGGCCCA
2930 CAAGTGTAAC	2940 TATGCTGTTA	2950 ACAGCTGTCA	2960 ATAGATAATT	2970 AAAATTCATA
2977 CTGTATG				

Quelle [188]

7.5 Bekannte Peripherin-Mutationen (Tab. 4)

Stand: 1998

Exon/Codon	Abschnitt	Mutation	Phänotyp	Erstbeschreiber
I / 1	Aminoterm.	Met1Thr	AVMD	Felbor et al., 1997
I / 13	Aminoterm.	Arg13Trp	Digenische RP (+ROM-1)	Jacobson et al., 1995
I / 25	M1	Trp 25del (2bp)	ad Retinitis punctata albescens	Kajiwarra et al., 1993
I / 27	M1	Ser27Phe	Cone dystrophy	Fishman et al., 1997
I / 32	M1	Ile32Val	ARMD?	Kajiwarra et al., 1994
I / 32	M1	Ile32ins (1bp)	ad CRD	Jacobson et al., 1996
I / 45	i1	Leu45Phe	Digenische RP (+ROM-1)	Jacobson et al., 1995
I / 46	i1	Arg46Stop	Stargardt' Disease, adRP, Fundus flavimaculatus	Meins et al., 1993
I / 67	M2	Met67del (3bp)	CRD, Pattern dyst.	Jacobson et al., 1994
I / 67-69	M2	67-69del(5bp) ins(8bp)	ad CRD	Jacobson et al., 1996
I / 68	M2	Gly 68 Arg	adRP?	Dryja et al., 1997
I / 87	e1	Asp87del (8bp)	Pattern dystrophy	Payne et al., 1998
I / 118-119	M3	Cys118/119del (3bp)	adRP	Farrar et al., 1991
I / 123	i2	Arg123del (1bp)	CRD	Nicht publiziert
I / 126	i2	Leu126Arg	adRP	Kajiwarra et al., 1992
I / 140	i2	Tyr140ins (4bp)	Pattern dystrophy	Kenn et al., 1994
I / 142	i2	Arg142Trp	Centr. Areolar Chor. Dyst.	Hoyng et al., 1996
I / 147	i2	Pro147del (1bp)	Makuladystrophie	Trujillo et al., 1997
I / 153	i2	Lys153Arg	adRP	Jacobson et al., 1994
I / 153-154	i2	Lys153/154del (3bp)	Pattern dystrophy, adRP, Fundus flavimaculatus	Weleber et al., 1993

I / 157	i2	Asp157Asn	Pattern dystrophy	Cideciyan et al., 1995
I / 165	i2	Cys165Tyr	adRP	Souied et al., 1995
I / 167	i2	Gly167Asp	BSMD	Nichols et al., 1993
I / 170	i2	Gly170Ser	CRD	Nicht publiziert
I / 172	i2	Arg172Trp	ad Makuladystrophie	Wells et al., 1993
I / 172	i2	Arg172Gly	BSMD	Nichols et al., 1993
I / 172	i2	Arg172Gln	ad Makuladystrophie	Wells et al., 1993
I / 173	i2	Asp173Val	adRP	Grüning et al., 1994
I / 184	i2	Tyr184Ser	Rod-Cone-Dystrophy	Nakazawa et al., 1996
I / 185	i2	Leu185Pro	adRP, digenische RP	Kajiwarra et al., 1991
I / 193	i2	Lys193del (2bp)	ad CRD	Jacobson et al., 1996
	i2	Del Exon 2 und 3	BSMD	Fossarell et al., 1996
II / 197	i2	Lys197Glu	ad Cone-Rod-Dystrophy	Kohl et al., 1997
II / 200	i2	Val200Glu	ad Cone-Rod-Dystrophy	Nakazawa et al., 1996
II / 203	i2	Arg203del (17bp)	adRP	Gannon et al., 1993
I / 206-209	i2	Val206del (12bp)	adRP	Gannon et al., 1993
II / 208	i2	Gly 208ins (1bp)	Pattern Dystrophy	Kohl et al., 1997
II / 210	i2	Pro210Arg	BSMD, Pattern Dyst.	Feist et al., 1994
II / 210	i2	Pro210Ser	adRP	Kemp et al., 1994
II / 211	i2	Phe211Leu	adRP	Souied et al., 1995
II / 212	i2	Ser212Gly	adRP	Farrar et al., 1992
II / 212	i2	Ser212Thr	AVMD	Felbor et al., 1997
II / 213	i2	Cys213Arg	Pattern dystrophy	Payne et al., 1998
II / 214	i2	Cys214Ser	adRP	Saga et al., 1993
II / 216	i2	Pro216Leu	adRP	Kajiwarra et al., 1991
II / 216	i2	Pro216Ser	adRP	Fishman et al., 1994
II / 219	i2	Pro219del (3bp)	adRP	Kajiwarra et al., 1991
II / 219	i2	Pro219Arg	Makuladystrophie	Payne et al., 1998
II / 220	i2	Arg220Gln	Pattern dystrophy	Cideciyan et al., 1995
II / 220	i2	Arg220Trp	Pattern dystrophy	Payne et al., 1997
II / 224	i2	Gln224ins (37bp)	Pattern Dystrophy	Payne et al., 1998
II / 234	i2	Tyr234ins(1bp)	Pattern dystrophy	Payne et al., 1997
II / 239	i2	gln239Stop	AVMD	Kohl et al., 1997
II / 244	i2	Asn244Lys	adRP, CRD, Bull's Eye maculopathy	Kikawa et al., 1994
II / 244	i2	Asn244His	CRD	Nakazawa et al., 1994
II / 246	i2	Trp246Arg	adRP, AVMD	Kohl et al., 1997
II / 258	i2	Tyr258Stop	AVMD	Wells et al., 1993
II / 266	M4	Gly266Asp	adRP	Kajiwarra et al., 1992
II / 268	M4	Val268Ile	AVMD	Felbor et al., 1997
II / 270	M4	Leu270del (3bp)	Digen. RP (+ROM-1)?	Dryja et al., 1997
II / 275	M4	Phe275del (2bp)	Makuladystrophie	Bareil et al., 1997
III / 285	Carboxyterm.	Tyr285Stop	Pattern Dystrophy	Kohl et al., 1997
III / 289	Carboxyterm.	Ser289Leu	Cone dystrophy	Kohl et al., 1997
III / 300	Carboxyterm.	Glu300del (2bp)	BSMD	Nichols et al., 1993
III / 304	Carboxyterm.	Glu304del (9bp)	adRP	Heinzmann et al., 1995
III / 305	Carboxyterm.	Gly305Asp	AVMD	Felbor et al., 1997
III / 307	Carboxyterm.	Leu307del (1bp)	adRP	Grüning et al., 1994
III / 313	Carboxyterm.	Pro313Leu	adRP ?	Dryja et al., 1997
III / 316	Carboxyterm.	Trp316Stop	AVMD	Felbor et al., 1997

AVMD = Adulte Vitelliforme Makuladystrophie, CRD = Cone-Rod-Dystrophy, Centr. = Central,
BSMD = Butterfly-shaped macular dystrophy, Dystr. = Dystrophie, Chor. = Choroid

Quellen [107,112]

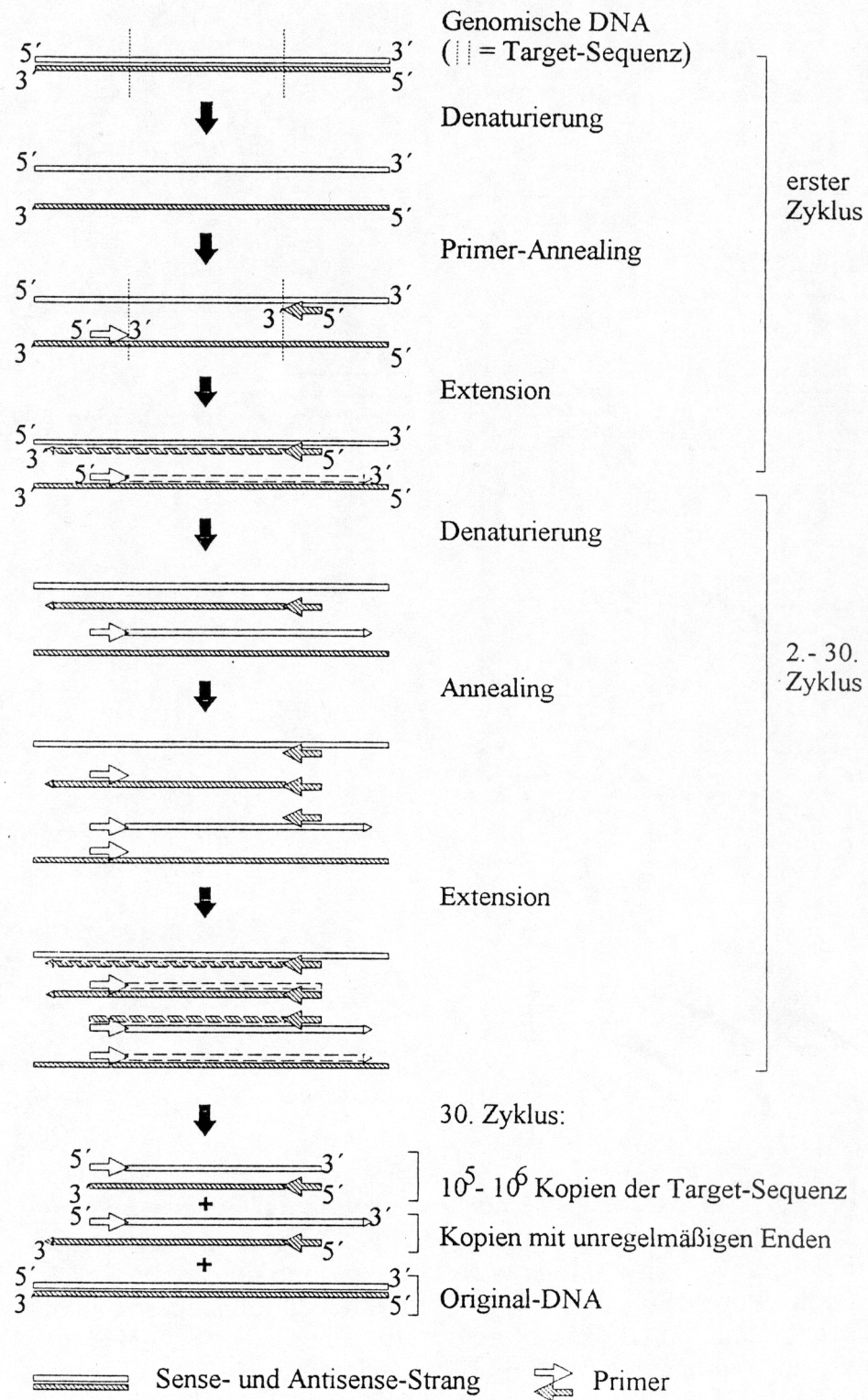
7.6 Bekannte Peripherin-Polymorphismen (Tab. 5)

Stand: 1998

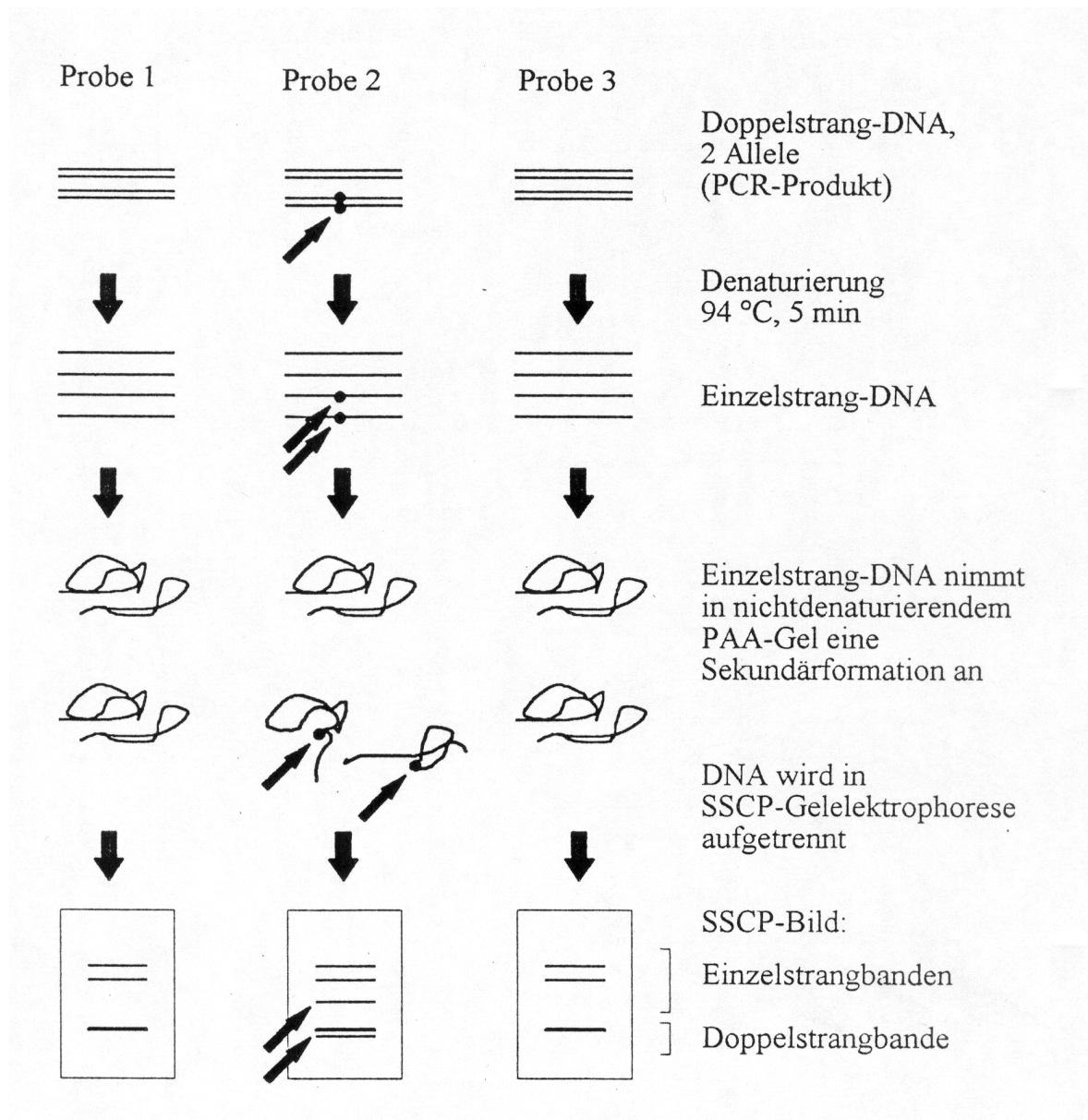
Exon/Codon	Abschnitt	Veränderung	Phänotyp	Erstbeschreiber
I / 72	M2	Cys72Ser	Polymorphismus	Fishman et al., 1997
I / 101	e1	Tyr101Tyr	Polymorphismus	Dryja et al., 1997
I / 106	M3	Val106Val	Polymorphismus	Farrar et al., 1991
I / 121	M3	Leu121Leu	Polymorphismus	Shastry/Trese, 1997
I / 146	i2	Thr146Arg	Polymorphismus	Dryja et al., 1997
II / 236	i2	Tyr236Tyr	Polymorphismus	Dryja et al., 1997
III / 304	Carboxyterm.	Glu304Gln	Polymorphismus	Jordan et al., 1992
III / 310	Carboxyterm.	Lys310Arg	Polymorphismus	Jordan et al., 1992
III / 335	Carboxyterm.	Glu335Glu	Polymorphismus	Dryja et al., 1997
III / 338	Carboxyterm.	Gly338Asp	Polymorphismus	Jordan et al., 1992
		3'UTR (1294C/T)	Polymorphismus	Felbor et al., 1997
		3'UTR (1750T/A)	Polymorphismus	Kumar-Singh et al., 1991

Quellen [107,112]

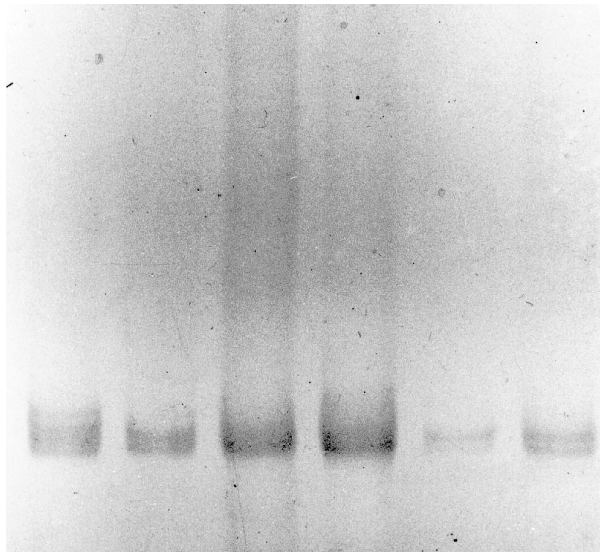
7.6 PCR-Schema (Abb. 8)



7.7 Schematische Darstellung der SSCP-Analyse mit Entstehung aberranter Banden durch Veränderungen in der Basensequenz bei Probe 2 (Abb. 9)

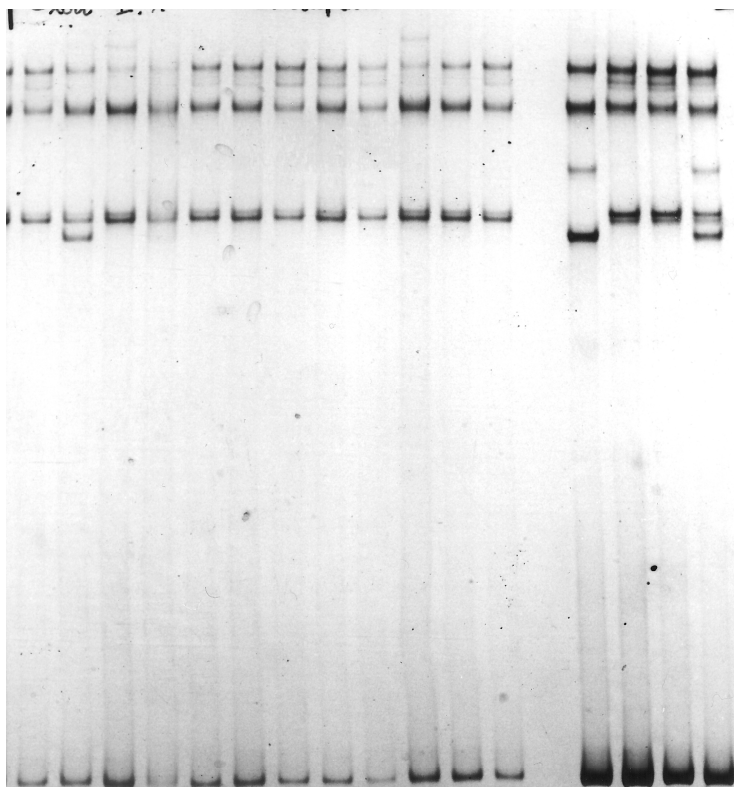


7.9 SSCP-Muster von Rho IV Probe 44 (Rho Cys187Tyr) (Abb. 13)



44

7.10 SSCP-Muster von Rho I.1. Proben 248 und 388 (Abb. 16)



200 248

388

**Kontrollen mit bek.
Polymorphismen**

7.11 Gefundene Rhodopsin-Mutationen und -Polymorphismen (Tab. 6)

Rhodopsin-Mutationen

Probe	Veränderung	Enzym	bekannt	Erstbeschreiber
A427	Thr17Met	BstXI	Ja	Sung et al. 1991a [29]
44	Cys18Tyr	Bss S I	Ja	Scott et al. 1993 Richards et al., 1994

Rhodopsin-Polymorphismen

Probe	Veränderung	Enzym	bekannt	Erstbeschreiber
200	269A/G (Intron)		Ja	Dryja et al. 1991 [9]
91	Gly120Gly		Ja	Dryja et al. 1991 [9]
370	Gly120Gly		Ja	Dryja et al. 1991 [9]
200	5321C/A (Intron)		Ja	Dryja et al. 1990a [178]

7.12 Gefundene Peripherin-Mutationen und -Polymorphismen (Tab. 7)

Peripherin-Mutationen

Probe	Veränderung	Enzym	bekannt	Erstbeschreiber
93	Pro216Ser	Tsp 509 I	ja	Stone et al.1993 [185]
e	Pro216Leu	Bfa I	ja	Kajiwara et al. 1991 [84]
248	Ser218Pro	Aci I	nein	

Peripherin-Polymorphismen

Probe	Veränderung	Enzym	bekannt	Erstbeschreiber
370	Val106Val		ja	Farrar et al., 1991 [188]
388	Val106Val		ja	Farrar et al., 1991 [188]
92	1294C/T (Intron)		ja	Felbor et al., 1997 [189]

191	Glu304Gln	ja	Jordan et al. 1992 [182]
	Gly338Asp	ja	Jordan et al. 1992 [182]
	1294C/T (Intron)	ja	Felbor et al., 1997 [182]
275	Glu304Gln	ja	Jordan et al. 1992 [182]
	Gly338Asp	ja	Jordan et al. 1992 [182]
429	Gly338Asp	ja	Jordan et al. 1992 [182]
c	Val106Val	ja	Farrar et al., 1991 [188]
	Glu304Gln	ja	Jordan et al. 1992 [182]
	Gly338Asp	ja	Jordan et al. 1992 [182]
e	Glu304Gln	ja	Jordan et al. 1992 [182]
	Gly338Asp	ja	Jordan et al. 1992 [182]
	1294C/T (Intron)	ja	Felbor et al., 1997 [189]
K2	Glu304Gln	ja	Jordan et al. 1992 [182]
	Gly338Asp	ja	Jordan et al. 1992 [182]

7.13 Verwendete Abkürzungen

A	Ampere
Å	Ångström
adRP	autosomal dominante Retinitis pigmentosa
AS	Aminosäure
<i>Aminosäurencodes</i>	
Ala	Alanin (A)
Gly	Glycin (G)
Ser	Serin (S)
Thr	Threonin (T)
Met	Methionin (M)
Cys	Cystein (C)
Val	Valin (V)
Leu	Leucin (L)
Ile	Isoleucin (I)
Pro	Prolin (P)
His	Histidin (H)
Glu	Glutaminsäure (E)
Gln	Glutamin (Q)
Asp	Asparaginsäure (D)
Asn	Asparagin (N)
Phe	Phenylalanin (F)
Tyr	Tyrosin (Y)

Trp	Tryptophan (W)
Arg	Arginin (R)
Lys	Lysin (K)
Bp	Basenpaar(e)
<i>Basencodes</i>	
A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
c	Gesamtkonstante im ERG-Computermodell
δ_{p2}	Sensitivität der Körnerschicht im ERG-Computermodell
δ_{p3}	Sensitivität der Photorezeptorenschicht im ERG-Computermodell
Da	Dalton
dNTP	Deoxyribonukleinsäuretriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GF	Gesichtsfeld
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man, National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, USA
OP	Oscillation Potential
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCD	Programmierter Zelltod (Programmed Cell Death)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Peri	Peripherin/rds
RetNet	Retinal Informations Network, The University of Texas, Houston Health Science Center, USA
Rho	Rhodopsin
Rm_{p2}	Maximalamplitude der p2-Welle im ERG-Computermodell
Rm_{p3}	Maximalamplitude der p3-Welle im ERG-Computermodell
RPE	Retinales Pigmentepithel
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris/Borsäure/EDTA
TE	Tris/EDTA
Temed	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
V	Volt

Danksagung

Für die Einarbeitung in die molekulargenetischen Techniken, die Unterstützung bei technischen Problemen und eine kollegiale Zusammenarbeit möchte ich den Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik Frau Christine Marschke, Frau Ulrike Orth, Herrn Dr. Andreas Janecke, Herrn Dr. Moritz Meins, Herrn Dr. Ulrich Finckh, Herrn Dr. Andres Veske und Herrn Dr. Su-Min Gu meinen herzlichen Dank sagen.

Für die freundliche Überlassung der klinischen Daten möchte ich Herrn Dr. Apfelstedt-Sylla, Herrn Dr. Villiger und Herrn Dr. Schuster (Universitätsklinik Tübingen) danken.

Einen besonderen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. T. Rosenberg (Statens ljenklinik, Kopenhagen) für die Vermittlung der dänischen Patienten, detaillierte klinische und elektrophysiologische Befunde und eine sehr zuvorkommende Zusammenarbeit sagen.

Für die sehr gute inhaltliche Betreuung und eine sehr gute Zusammenarbeit danke ich Herrn Prof. Dr. A. Gal sehr herzlich.

Lebenslauf

Persönliche Daten

geboren am 16.03.1973 in Hamburg
verheiratet seit 03.08.2002

Schulbildung

1979/83 Grundschule Brödermannsweg in Hamburg
1983/86 Gymnasium „Collegio Humboldt“ in Sao Paulo, Brasilien
1986/89 Gymnasium Deutsche Schule Paris, Frankreich
1989/92 Albert-Schweitzer-Gymnasium, Hamburg

Zivildienst 1992-1993 in der Klinik Poppenbüttel in Hamburg im Pflegebereich

Studium Medizinstudium 10/93-04/99 an der Universität Hamburg

09/95 Physikum
03/97 1. Staatsexamen
03/99 2. Staatsexamen
06/00 3. Staatsexamen

Famulaturen

06/96 Innere Medizin im Marienkrankenhaus, Hamburg
07/96 Chirurgie in der Klinik Poppenbüttel, Hamburg
09/97 Pädiatrie am Centre Hospitalier de Montmorency, Frankreich
02/98 Humangenetik am UKE, Hamburg
10/98 Radiologie im Royal United Hospital, Bath, England

Praktisches Jahr 04/99-04/00

1. Tert. Kinderklinik UKE, Hamburg
2. Tert. Chirurgie St. Mary's Hospital Center, Montreal, Kanada
Chirurgie AK Heidberg, Hamburg
3. Tert. Innere Medizin AK Barmbek, Hamburg

Arzt im Praktikum 08/00-01/02

Klinik für Allgemeine Pädiatrie des Universitätsklinikums
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

seit 03/02 Assistenzarzt in der Klinik für Allgemeine Pädiatrie des Universitätsklinikums
Schleswig-Holstein, Campus Kiel

Fremdsprachen

Französisch fließend in Wort und Schrift
Englisch fließend in Wort und Schrift
Portugiesisch Grundkenntnisse

Hobbies

Radfahren, Segeln, Musik

Hamburg, den 17.07.2003



Eidesstattliche Erklärung

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

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

17.07.2003 Sebastian Altmann - Jürgensen