

**Kopplungsanalyse und Kandidatengenansatz auf  
Chromosom 14 zur Identifikation des ursächlichen Gens in  
einer Familie mit Leberscher kongenitaler Amaurose (LCA)**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Kreutz, Annette, geb. Schick  
aus Amöneburg

Gießen, 2016

Aus dem Labor für Molekulare Ophthalmologie der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde,  
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen.

Gutachter: Prof. Dr. Müller

Gutachter: PD Dr. Preising

Tag der Disputation: 05.08.2016

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Lebersche kongenitale Amaurose .....	1
1.1.1	Definition.....	1
1.1.2	Phänotyp.....	1
1.1.3	Vererbungsmuster .....	2
1.1.4	Genmutationen und Untertypen der LCA.....	3
1.1.5	Differentialdiagnosen .....	5
1.1.6	Genotyp Phänotyp Korrelation.....	6
1.1.7	Therapie.....	8
1.2	Zielsetzung .....	10
2	Material und Methoden.....	11
2.1	Patient und Familie.....	11
2.2	Molekulargenetische Methoden.....	12
2.2.1	Geräte.....	12
2.2.2	Reagenzien, Enzyme, Chemikalien, Puffer.....	13
2.2.3	Phenolextraktion von DNA.....	14
2.3	DNA-Konzentrationsbestimmung und Ansetzen der Gebrauchslösungen aus den DNA-Stammlösungen .....	15
2.4	Amplifikation definierter Sequenzen durch die Polymerasekettenreaktion (PCR).....	15
2.5	Gelelektrophorese .....	17
2.5.1	Herstellung des Agarosegels.....	18
2.5.2	Auftrennung der PCR-Produkte .....	18
2.6	QIAxcel.....	19
2.7	Gensequenzierung .....	19
2.8	Kopplungsanalyse .....	19
2.8.1	Definition.....	19
2.8.2	Das menschliche Genom.....	20
2.8.3	Identifizierung von pathologischen Genveränderungen .....	20

2.8.4	Single Nucleotide Polymorphism (SNP) .....	21
2.8.5	Mikrosatellitenmarker.....	21
2.8.6	Logarithmic Odds Ratio (LOD)-Score .....	22
2.8.7	SNP-Genotyping Microarrays .....	23
2.8.8	Parametrische Analyse.....	23
2.9	Ermittlung geeigneter Mikrosatellitenmarker .....	24
2.10	Auswahl möglicher Kandidatengene .....	28
3	Ergebnisse .....	29
3.1	Anamnese der Familie.....	29
3.2	SNP Genotypisierung und Kopplungsanalyse.....	31
3.3	Optimierung der Mikrosatellitenamplifikation .....	33
3.3.1	Amplifikation der Mikrosatellitenmarker mit den DNA-Proben der Familie .....	35
3.4	Kopplungsanalyse mit den Mikrosatellitenmarkern .....	35
3.4.1	Haplotypen der Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 7 .....	35
3.4.2	Haplotypen der Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 8 .....	37
3.4.3	Haplotypen der Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 14 .....	37
3.4.4	Ergebnis der Haplotypenanalyse .....	38
3.5	Berechnung der Kopplungswahrscheinlichkeit mit MERLIN .....	39
3.6	Evaluation möglicher Kandidatengene auf Chromosom 14.....	46
3.6.1	Tubulin Polymerisation-Promoting Protein family member 2 ( <i>TPPP2</i> )...47	
3.6.2	Defender Against Cell death ( <i>DAD1</i> ) .....	47
3.6.3	Retinitis pigmentosa GTPase regulator-interacting Protein ( <i>RPGRIP1</i> ) .....	48
3.6.4	Neural Retina Leucine Zipper ( <i>NRL</i> ).....	49
3.7	Ergebnis der Kandidatengenanalyse.....	49
4	Diskussion .....	50
4.1	Bewertung des Patientenmaterials .....	50
4.2	Bewertung der Untersuchungstechnik.....	50
4.3	Bewertung der Kandidatengene .....	52
4.4	Die <i>RPGRIP1</i> -Mutation .....	53
4.5	Aussichten und Nutzen für die Familie .....	54

4.6	Ausblick.....	55
5	Zusammenfassung.....	56
6	Summary .....	57
7	Abbildungsverzeichnis.....	58
8	Tabellenverzeichnis.....	59
9	Abkürzungsverzeichnis.....	60
10	Literaturverzeichnis .....	60
11	Ehrenwörtliche Erklärung .....	76
12	Danksagung .....	77

# 1 Einleitung

## 1.1 Lebersche kongenitale Amaurose

### 1.1.1 Definition

Die nach dem Heidelberger Ophthalmologen Theodor Carl Gustav von Leber benannte Lebersche kongenitale Amaurose (LCA) beschreibt eine heterogene Gruppe von Aderhaut- und Netzhautdystrophien mit schweren Sehbeeinträchtigungen bis hin zur Erblindung [9]. Die bei 5 % der retinalen Dystrophien nachgewiesene LCA ist die am frühesten einsetzende und am schwersten verlaufende Form der erblichen retinalen Dystrophien. Die Inzidenz der LCA liegt bei 1–9 : 100.000 [50, 77, 103].

Die Diagnose LCA wird meist nach der Geburt oder in den ersten Lebensmonaten gestellt und weist eine hohe phänotypische und genotypische Heterogenität auf [71, 103]. Hauptmerkmal des Krankheitsbildes ist eine sich im frühen Lebensalter manifestierende Einschränkung des Sehvermögens bis hin zur Erblindung [77]. Die LCA ist die früheste Form der schweren frühkindlichen Netzhautdegenerationen (engl. early onset severe retinal dystrophy, EOSRD oder engl. severe early childhood onset retinal dystrophy, SECORD) [102].

### 1.1.2 Phänotyp

Der Fundus oculi ist bei den meisten Patienten zunächst unauffällig. Im Verlauf der Erkrankung treten Fundusveränderungen, wie Hyper- und Hypopigmentierungen, sowie eine unterschiedlich stark ausgeprägte Netzhautatrophie auf [9, 50]. Im weiteren Verlauf zeigen sich häufig generalisierende Gesichtsfeldeinschränkungen sowie ein deutlich reduzierter Visus. Die Patienten sind zudem meist hyperob [18, 34, 51, 71]. Auch das Farbsehen ist in der Regel eingeschränkt [71].

Erkrankte sind nicht in der Lage, Gegenstände zu fixieren. Man beobachtet wandernde Augenbewegungen oder einen sensorischen Nystagmus. Weitere Symptome sind ein Strabismus oder das okulodigitale Zeichen [9, 17].

Die Pupillenreaktion ist in einigen Fällen träge, die Pupillenreflexe erscheinen meist schon kurz nach der Geburt abgeschwächt.

Die Gefäße des Augenhintergrundes sind häufig eng und die Papille blass. Außerdem treten Pseudopapillenödeme oder Papillenödeme zum Teil schon in den ersten Lebensmonaten auf [9].

Schon bei der Geburt ist der Visus der Betroffenen meist stark eingeschränkt bis hin zu einer vollständigen Erblindung. In einigen Fällen bleibt ein Visus von 0,05 bis zum zehnten Lebensjahr erhalten.

Die Diagnostik erfolgt über ein Elektroretinogramm (ERG), bei dem über die von der Netzhaut gebildeten elektrischen Potentiale die elektrischen Aktivitäten der Stäbchen, Zapfen und der nachgeschalteten Bipolarzellen bestimmt werden. Bei LCA-Patienten sind die Signale im ERG bereits in den ersten Lebensjahren meist nicht mehr nachweisbar [35, 71].

Eine ortsauflösende Analyse der Stäbchen- und Zapfenfunktion gelingt mit der Zweifarben-Schwellenperimetrie (2FSP). Mit Hilfe dieser psychophysikalischen Methode kann die Funktion bzw. deren Einschränkung beider Systeme an einem definierten Ort unterschieden werden [71].

Zur Untersuchung des Augenhintergrundes nutzt man die Autofluoreszenz des retinalen Pigmentepithels (RPE, Fundus-Autofluoreszenz). Dabei werden Ablagerungen von Lipofuszin im RPE zur Fluoreszenz angeregt. Bei der Untersuchung kann sowohl eine Hyperfluoreszenz (bei Läsionen im RPE) als auch eine Hypofluoreszenz (aufgrund von abgestorbenen Photorezeptoren) beobachtet werden [71, 84]. Eine potentiell auftretende, pathologisch veränderte Schichtung der Neuroretina wird mit Hilfe der optischen Kohärenztomographie (OCT), mit der die Neuroretina, das RPE und die Aderhaut dargestellt werden kann, diagnostiziert [71].

Die Skiaskopie dient der objektiven Refraktionsbestimmung. Bei dieser Methode dient ein virtuelles Objekt als Lichtquelle, dessen Bild aus einer gleichmäßigen Beleuchtung des Augenhintergrundes besteht. Betroffene zeigen meist eine Hyperopie > 3 dpt, nur selten treten Myopien auf [9].

### 1.1.3 Vererbungsmuster

Das Vererbungsmuster der LCA ist in den meisten Fällen autosomal-rezessiv [73]. Patienten mit autosomal-dominanter Vererbung wurden im Zusammenhang mit Mutationen im Cone rod homeobox-(*CRX*)-, Inosine-5'-monophosphate-Dehydrogenase-1-(*IMPDH1*)- und Guanylate-cyclase-2D-(*GUCY2D*)-Gen beschrieben [8, 32, 67].

Bei dem horizontalen Vererbungsmuster der autosomal-rezessiven Vererbung der LCA sind häufig nur einzelne Personen in der Familie erkrankt. Sowohl Eltern als auch Kinder der betroffenen Person sind in der Regel gesund. Haben Eltern bereits ein erkranktes Kind, besteht für weitere Kinder unabhängig vom Geschlecht eine Wahrscheinlichkeit von 25 % ebenfalls zu erkranken, da beide Elternteile heterozygote Träger der Genmutation sind.

Bei einer Konsanguinität der Eltern erhöht sich das Erkrankungsrisiko für die direkten Nachkommen, da die Wahrscheinlichkeit für das Zusammentreffen zweier genetisch veränderter Gene deutlich erhöht ist. In Familien mit mehreren blutsverwandten Paaren kommen verglichen mit der Normalbevölkerung in verschiedenen Generationen gehäuft erkrankte Individuen vor [73].

#### 1.1.4 Genmutationen und Untertypen der LCA

Ursächlich für die LCA sind Mutationen in unterschiedlichen Genen (siehe Tabelle 1). Der Erbgang ist in den meisten Fällen autosomal-rezessiv.

Die am häufigsten auftretende Genmutation ist die Centrosomal protein 290 kDa- (*CEP290*)-Mutation c.2991+1655A>G, die bei bis zu 30 % der LCA-Patienten ursächlich für die Erkrankung ist [16].

Nicotinamide-nucleotide-adenylyltransferase-1- (*NMNAT1*)-Mutationen sind in 5 % und Retinol-Dehydrogenase-12- (*RDH12*)-Mutationen bei < 4 % aller LCA-Fälle beschrieben [25, 66].

Autosomal-rezessive Mutationen im *GUCY2D*-Gen führen zur LCA1 [67]. Heterozygote Mutationen im *CRX*-Gen wurden als Ursache einer autosomal-dominanten LCA beschrieben [26, 65, 67]. Die Mutation des Gens *IMPDH1*, die zur LCA11 führt, wird ebenfalls autosomal-dominant vererbt [8].

Tabelle 1: Bekannte Gene mit ursächlichen Mutationen der LCA

Gen	OMIM	Form	Funktion
<i>GUCY2D</i> Guanylate-cyclase-2D	600179	LCA1	Phototransduktion [67]
<i>RPE65</i> Retinal pigment epithelium-specific 65 kDa protein	180069	LCA2	Retinozyklus [59, 69]
<i>SPATA7</i> Spermatogenesis associated 7	609868	LCA3	Zilienbildung/-funktion [68]
<i>AIP1</i> Aryl hydrocarbon receptor interacting protein like 1	604392	LCA4	Proteinverteilung/-synthese [78]
<i>C6ORF152</i> Lebercilin	611408	LCA5	Zilienbildung/-funktion [20]
<i>RPGRIP1</i> Retinitis pigmentosa GTPase regulator interacting protein 1	605446	LCA6	Zilienbildung/-funktion [23, 31]
<i>CRX</i> Cone-rod homeobox	602225	LCA7	Retinale Entwicklung [27, 40, 81]
<i>CRB1</i> Crumbs 1, cell polarity complex component	604210	LCA8	Retinale Entwicklung [19]
<i>NMNAT1</i> Nicotinamide nucleotide adenyltransferase 1	608700	LCA9	zellulärer Metabolismus, beteiligt an der Nikotinsäureamid-Adenindinukleotid-(NAD) <sup>+</sup> -Synthese [25]
<i>CEP290</i> (=NPHP6) Centrosomal protein 290	610142	LCA10	Zilienbildung/-funktion [21]
<i>IMPDH1</i> Inosine monophosphate-dehydrogenase 1	146690	LCA11	Zilienbildung/-funktion [8]
<i>C10RF36</i> (=RD3) Retinal degeneration 3	610612	LCA12	Transport der Guanylatcyclase [4, 28]
<i>RDH12</i> Retinol dehydrogenase 12	608830	LCA 13	Vitamin A Metabolismus [42]

<i>LRAT</i> Lecithin retinol acyltransferase	604863	LCA14	Vitamin A Metabolismus [82]
<i>TULP1</i> Tubby like protein 1	602280	LCA15	Zilienbildung/-funktion [33]
<i>KCNJ13</i> Potassium voltage-gated channel subfamily J member 13 channel, inwardly rectifying subfamily J, member 13	603208	LCA16	Reizleitung [76]
<i>GDF6</i> Growth differentiation factor 6	601147	LCA17	Retinale Entwicklung [2]
<i>PRPH2</i> Peripherin 2	179605	LCA18	Zilienbildung/-funktion [85]
<i>IQCB1</i> (=NPHP5) IQ motif containing B1	609237	LCA	Zilienbildung/-funktion [12,86]
<i>MERTK</i> MER proto-oncogene, tyrosine kinase	604705	LCA	Phagozytose [29]
<i>ALMS1</i> Centrosome and basal body associated protein	606844	LCA	Zilienbildung/-funktion [86]
<i>CNGA3</i> Cyclic nucleotide gated channel alpha 3	600053	LCA	Phototransduktion [86]
<i>PDE6C</i> Phosphodiesterase 6C	600827	LCA	Phototransduktion [86]
<i>ADAMTS18</i> ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 18	607512	LCA	retinale Entwicklung [64]
<i>MyoVIIa</i> Myosin VIIA	600060	LCA	Zilienbildung/-funktion [86]

### 1.1.5 Differentialdiagnosen

Die LCA hat eine Reihe von Differentialdiagnosen, weil retinale Dystrophien einen ähnlichen Phänotyp aufweisen. Teilweise können Mutationen der beschriebenen Gene auch zu anderen Erkrankungen (Zapfen-Stäbchen-Dystrophie, Stäbchen-Zapfen-Dystrophie, Retinitis pigmentosa (RP) simplex, autosomal-rezessive RP) führen. Anders als bei der autosomal-rezessiven Form der RP ist bei der RP simplex innerhalb einer Familie häufig nur ein Individuum - meist aufgrund einer Neumutation - erkrankt [71].

Die juvenile RP ähnelt der LCA in ihrem klinischen Bild, manifestiert sich allerdings erst später. Auffällige Befunde, wie Hyperpigmentierungen und Knochenbälkchen, treten häufig erst ab dem sechsten Lebensjahr auf. Die Sehschärfe liegt meist unter 0,2; die

Erkrankten sind leicht myop oder hyperop. Die Pupillenreaktion bei Patienten mit juveniler RP ist im Vergleich zu der Mehrzahl der LCA-Patienten unauffällig [3].

Die Zapfen-Stäbchen-Dystrophie ist durch einen früheren Verlust der Zapfen- und Stäbchenfunktion charakterisiert. Die Funktion der Stäbchen nimmt entweder gleichzeitig oder zeitlich nach hinten versetzt mit der Funktion der Zapfen ab. Betroffene zeigen einen stark eingeschränkten Visus und zentrale Gesichtsfeldausfälle mit Nystagmus. In den ersten Lebensjahren imponiert eine hohe Blendungsempfindlichkeit. Der Fundus ist zu Beginn der Erkrankung meist unauffällig [53].

Die autosomal-dominante *GUCY2D*-Mutation folgt in ihrem klinischen Bild der Zapfen-Stäbchen-Dystrophie [32].

Auch Mutationen des Gens *AIP1* wurden mit einer autosomal-dominanten Zapfen-Stäbchen-Dystrophie in Verbindung gebracht. Diese Befunde ließen sich in folgenden Untersuchungen allerdings nicht wiederholen [78].

Die Stäbchen-Zapfen-Dystrophie zeigt im Gegensatz zur Zapfen-Stäbchen-Dystrophie zuerst eine Einschränkung der Stäbchenfunktion. Das Sehvermögen der Patienten ist deutlich weniger eingeschränkt. Vor allem der Phänotyp der LCA2, die durch Retinal pigment epithelium-specific 65 kDa protein- (*RPE65*)-Mutationen hervorgerufen wird, folgt dem Verlauf einer Stäbchen-Zapfen-Dystrophie [53].

Darüber hinaus führen Mutationen der Gene *LRAT* und *RPGRIP1* zu einem klinischen Bild einer frühen Stäbchen-Zapfen-Dystrophie [23, 82].

Differentialdiagnostisch sind diese Dystrophien von systemischen oder metabolischen Erkrankungen (z.B. Periarteriitis nodosa, Retinopathie bei Syphilis, Rötelnembryopathie, Vitamin-A Mangel), die aufgrund von Pigmentretinopathien zu ähnlichen klinischen Bildern führen, zu trennen. Darüber hinaus besteht auch die Möglichkeit einer Pigmentretinopathie durch Medikamente (z.B. Resochin, Phosphodiesterase-Hemmer, Tamoxifen) [9].

#### 1.1.6 Genotyp Phänotyp Korrelation

Bei der durch Mutationen des *GUCY2D*-Gens hervorgerufenen LCA1 haben die Betroffenen von Beginn an ein stark eingeschränktes Sehvermögen. Typisch ist die Diskrepanz zwischen der Sehqualität und der Funduspathologie, die in den ersten Jahren kaum Auffälligkeiten zeigt. Kennzeichnend für die Klinik ist eine von Beginn an hohe Blendungsempfindlichkeit der Patienten. Im Verlauf erinnert die Erkrankung an eine Zapfen-Stäbchen-Dystrophie [53].

Die pathologischen Veränderungen des Fundus bei der durch Mutationen des *RPE65*-Gens hervorgerufenen LCA2 erinnern an eine RP. Allerdings sind die

Hyperpigmentierungen weniger stark ausgeprägt und die für eine RP typischen Knochenbälkchen fehlen meist [54]. Analysen der Fundus-Autofluoreszenz sind nicht durchführbar, weil im RPE kein Lipofuszin gebildet wird [55]. Die sich im Verlauf entwickelnden Funduspathologien erinnern an eine Stäbchen-Zapfen-Dystrophie. Klinisch weisen die Patienten eine deutlich geringere Seheinschränkung und Blendungsempfindlichkeit auf als LCA1 Patienten [54, 72].

Im Gegensatz zu von anderen Genmutationen Betroffenen haben Erkrankte mit einer *RPE65*-Mutation einen relativ guten Visus, der abhängig von der Beleuchtung bei ca. 0,3 liegt. Häufig tritt eine absolute Hemeralopie auf [54].

Die autosomal-dominanten Mutationen des *CRX*-Gens korrelieren mit einer Zapfen-Stäbchen-Dystrophie. In der Funduskopie sind viele kleinere Läsionen, die unregelmäßig über die gesamte Netzhaut verteilt sind, zu erkennen. In der Fundusautofluoreszenz zeigt sich ein entsprechendes Muster mit reduzierten oder erhöhten Signalen. Die Veränderungen erstrecken sich ausgehend von der Makula über den gesamten Fundus [71].

Bei den autosomal-dominanten Mutationen des *GUCY2D*-Gens kommt es zu einer starken Zapfenschädigung und Veränderungen der Makula [32].

Die autosomal-rezessiven Mutationen des *GUCY2D*-Gens führen im Gegensatz zur autosomal-dominanten Mutation zu einer sehr frühen Form der Erkrankung. Der Augenhintergrund zeigt über lange Zeit hinweg keine Veränderungen. Gleichzeitig haben die Betroffenen einen Visus unter 0,1 und eine träge Pupillenreaktion. Ursächlich für das klinische Bild der Erkrankung ist ein erniedrigter retinaler cyclischer-Guanosinmonophosphat-(cGMP)-Spiegel, wodurch Lichtreize auf retinaler Ebene nicht weitergeleitet werden und die Bildung des Rezeptorpotentials unterbleibt [22]. Bei den Mutationen des *GUCY2D*-Gens handelt es sich entweder um Missense-Mutationen oder Mutationen, die zu Translationsabbrüchen führen. Erkrankte mit Missense-Mutationen, die sich auf die extrazelluläre Domäne des Proteins auswirken, zeigen eine verzögerte Krankheitsprogression [62].

Mutationen des *CRB1*-Gens führen zu einer charakteristischen Verdickung der Neuroretina, die mit Hilfe der optischen Kohärenztomographie (OCT) nachweisbar ist. Bei anderen Mutationen (z.B. *RPE65* oder *GUCY2D*) ist die Neuroretina meist verdünnt [41].

Mutationen im Gen *CEP290*, welches für das Protein Nephrocystin 6 kodiert, gehören zu den häufigsten LCA-assoziierten Mutationen. In einer Studie von den Hollander et al. wurden bei 16 von 76 nicht konsanguinen Patienten Mutationen in diesem Gen gefunden [21]. Coppieters et al. fanden in einer Studie mit 91 LCA-Patienten bei 30 % der Erkrankten eine Beteiligung des *CEP290*-Gens [16].

Mutationen im *CEP290*- und *IQCB1*-Gen führen zur Ziliopathie der Photorezeptoren. Auch die frühe und schnell fortschreitende Degeneration der Stäbchen ist charakteristisch; dabei sind hauptsächlich die Außensegmente betroffen. In der Fovea centralis bleiben die Zapfen meist noch eine Weile erhalten, verlieren aber – wie für die LCA typisch – schnell ihre Funktion [49]. Klinisch erinnert das Bild daher an eine Stäbchen-Zapfen-Dystrophie. Zilien kommen nicht nur in den Zellen des Auges, sondern in fast allen Körperzellen des Menschen vor. In der Niere sind sie für die Signalweiterleitung und den Flüssigkeitstransport von elementarer Bedeutung. Je nach Ausprägung der Ziliopathie kann eine *CEP290*-Mutation neben den ophthalmologischen Dysfunktionen auch respiratorische und nephrologische Funktionsstörungen zur Folge haben [61].

#### 1.1.7 Therapie

Die LCA ist eine genetische Erkrankung. Eine Therapie der Betroffenen gestaltet sich daher als schwierig.

Im Fokus des ärztlichen Handelns steht die Beratung von Erkrankten und Mutationsträgern im Sinne einer Primärprophylaxe. Dabei steht die Aufklärung über die Wahrscheinlichkeit erkrankte Kinder zu bekommen im Mittelpunkt.

Häufig bleibt bei LCA-Patienten ein sehr geringes Sehvermögen für einige Jahre bestehen. In diesen Fällen ist es wichtig eine Refraktionskorrektur durchzuführen, um eine zusätzliche Sehminderung durch eine Deprivationsamblyopie zu verhindern [3].

Zudem sollte bei der Untersuchung von LCA-Patienten auf Begleiterkrankungen geachtet werden, weil Netzhautdystrophien auch im Zusammenhang mit verschiedenen Syndromen (z. B. Joubert-Syndrom, Senior-Loken-Syndrom) auftreten können [74]. Bei der atypischen LCA sollte ebenso an ein cerebro-hepato-renales Syndrom oder an eine juvenile Nephronophthise gedacht werden [3]. Im Zusammenhang mit *CEP290*- oder *IQCB1*-Mutationen stehende Ziliopathien können zu schwerwiegenden Nieren- und Lungenfunktionsstörungen mit Superinfektionen führen [61].

Um weitere Folgeschäden in der Entwicklung zu minimieren, sollte eine allgemeine pädiatrische und neuropädiatrische Diagnostik erfolgen. Durch dieses Vorgehen lassen sich Nierenfehlbildungen, angeborene Epilepsien oder geistige Retardierungen frühzeitig erkennen und therapieren [3].

In jüngster Zeit gewinnt die Gentherapie in der Medizin zunehmend an Bedeutung und gibt von Mutationen Betroffenen neue Hoffnung. Die Entwicklung einer Gensubstitutionstherapie bei retinalen Dystrophien infolge von *RPE65*-Mutationen hat in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht [58, 79]. Bei einer spezifischen

Gentherapie werden gesunde Allele der mutierten Gene mithilfe von rekombinanten Adeno-assoziierten viralen-(AAV)-Vektoren transferiert [5]. Diese Vektoren werden in der Gentherapie häufig genutzt, weil sie als nicht humanpathogen gelten [57]. Zudem tritt nach einer Behandlung mit AAV-Vektoren nur eine geringe Immunreaktion auf [14]. Der limitierende Faktor der Gentherapie mit AAV-Vektoren ist die begrenzte Länge (maximal 4,8 kb) des transferierbaren Gens. Eine Möglichkeit, diese Einschränkung zu umgehen, ist die Verteilung längerer Sequenzen auf verschiedene AAV-Vektoren [6]. In klinischen Versuchen zur Gentherapie von LCA2-Patienten mit *RPE65*-Mutationen konnte eine geringe Verbesserung der Netzhautfunktion nachgewiesen werden [58]. Die subretinale Applikation von rAAV2/2.*RPE65* (AAV-Vektor mit *RPE65*-Gen) ergab bei LCA2-Patienten eine signifikante Verbesserung der Sehfähigkeit bei Dämmerung. Ein Fortschreiten der Netzhautdegeneration konnte mit der Therapie nicht aufgehalten werden [11, 39].

In einem Tierversuch mit *RPE65*<sup>-/-</sup>-Hunden konnte durch eine intravitreale Injektion von 9-cis-Retinol die Sehkraft bei den therapierten Hunden wiederhergestellt werden. Nach der Injektion konnte im ERG eine höhere Aktivität der Stäbchen und Zapfen nachgewiesen werden [30]. In einer Studie mit 14 LCA-Patienten mit *LRAT*- oder *RPE65*-Mutationen wurde eine orale Therapie über sieben Tage mit zwei verschiedenen Dosen eines synthetischen 9-cis-Retinols (QLT091001) durchgeführt. Drei Patienten zeigten nach sieben Tagen eine klinisch relevante Verbesserung der visuellen Funktionen (Gesichtsfeld, Sehschärfe und ERG), die bis zu vier Monate nach Behandlungsende anhielt [47].

In einem weiteren Versuch wurden Stäbchen und Zapfen mithilfe von *CRX*-positiven Spenderzellen in *CRB1*<sup>rd8/rd8</sup>- (Deletion einer Base mit nachfolgender Verschiebung des Leserasters) - und *GUCY2E*<sup>-/-</sup>-Mäusen transplantiert.

Dazu wurden *CRX*-exprimierende Zellen aus *CRX*-green-fluorescent-protein-(*GFP*) transgenen Mäusen entnommen und in die Empfängerretina verpflanzt. Mit Hilfe des *GFP* lassen sich die Transgen-tragenden Zellen lokalisieren. In dem Versuch integrierten sich die embryonalen Spenderzellen in die äußere Körnerschicht der Empfängerretinae. Obwohl die Spenderzellen hauptsächlich aus Zapfenvorläuferzellen bestanden, entwickelten sie sich zu Zapfen und Stäbchen in einem ähnlichen Verhältnis wie in der Empfängerretina (1 : 35) weiter. Offensichtlich beeinflusste das Milieu der Empfängerretina die Differenzierung der embryonalen Vorläuferzellen.

Bei den *GUCY2E*<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte ein höherer Anteil an Zapfen nachgewiesen werden als bei den *CRB1*<sup>rd8/rd8</sup>-Mäusen. Diese Befunde deuten darauf hin, dass ein starker Verlust der Zapfen (z. B. durch eine *GUCY2E*-Mutation) bessere

Voraussetzungen für eine Zapfentransplantation bietet als eine weniger stark ausgeprägte Zapfendegeneration (z. B. durch eine *CRB1*-Mutation).

Die Daten belegen weiter, dass embryonale *CRX*-positive Zellen das Potential haben, verlorengegangene Photorezeptoren zu ersetzen. Diese Befunde stellen damit einen wichtigen Ansatzpunkt für weitere Studien zur Therapie von erblich bedingten, retinalen Degenerationen dar [49].

2011 wurde ein Mausmodell entwickelt, das das LCA-Krankheitsbild bei *CEP290*- bzw. *IQCB1*-Mutationen imitiert. Wie auch beim Menschen zeigte sich bei den Mäusen eine frühe Degeneration der Stäbchen. Meist deutete nur noch der Nachweis von Lipofuszin im RPE auf die Existenz dieser Zellen hin [11]. Dieses Mausmodell eignet sich daher für präklinische Studien für Gentherapien der LCA auf der Basis von *CEP290*- bzw. *IQCB1*-Mutationen.

Aktuell werden im Tiermodell neue Gentransfermöglichkeiten erforscht. Im Fokus dieser Forschung steht der Transfer von Genen in Nanopartikeln mithilfe der Elektroporation [15, 44]. Dazu werden mit plasmid-desoxyribonucleic-acid-(DNA) beladene Nanopartikel subretinal in Mausaugen injiziert. Durch die Elektroporation werden die Zellmembranen vorübergehend permeabilisiert, so dass die Nanopartikel in die Zielzellen gelangen können [44].

Die Vorteile der Nanopartikel sind die geringe Immunreaktion, der einfache Transfer durch die Zellmembran und die kostensparende Herstellung. Mithilfe von Modifikationen der Nanopartikel ist es möglich, den Transport so zu steuern, dass die DNA-Fragmente nur in gewünschten Zielzellen freigesetzt werden. Damit werden mögliche systemische Effekte beim Übertreten der Blut-Retina-Schranke vermieden [43].

## 1.2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Identifikation der ursächlichen Mutation(en) eines Gens in einer Familie mit einem LCA-Patienten.

Mithilfe von Kopplungsanalysen über Single Nucleotide Polymorphism-(SNP)-Marker konnten im Vorfeld drei chromosomale Kandidatenregionen eingegrenzt werden. Über Mikrosatellitenmarker sollten diese drei Regionen auf eine einzelne Kandidatenregion mit einem Minimum an Kandidatengenen reduziert werden. Über eine Analyse der Funktion und der Lokalisation der Gene sollte eine Auswahl von Kandidatengenen getroffen werden. Das ursächliche Gen sollte dann über eine direkte Sequenzierung identifiziert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patient und Familie

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten DNA-Proben stammten von einer konsanguinen Familie türkischer Herkunft. Für die Analyse lagen Blutproben von beiden Elternteilen und deren fünf Kindern, von denen der jüngste Sohn an LCA erkrankt war, vor (Abbildung 1).

Der Patient wurde im Kinderzentrum in Bielefeld, einem akademischen Lehrkrankenhaus der Universitätsklinik in Münster, untersucht und diagnostiziert.

Die Familie wurde über die geplanten genetischen Untersuchungen aufgeklärt und das Einverständnis wurde eingeholt. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Regensburg (Antrag 00/106) und der Ethikkommission der Universität Gießen (Antrag 149/07) befürwortet.

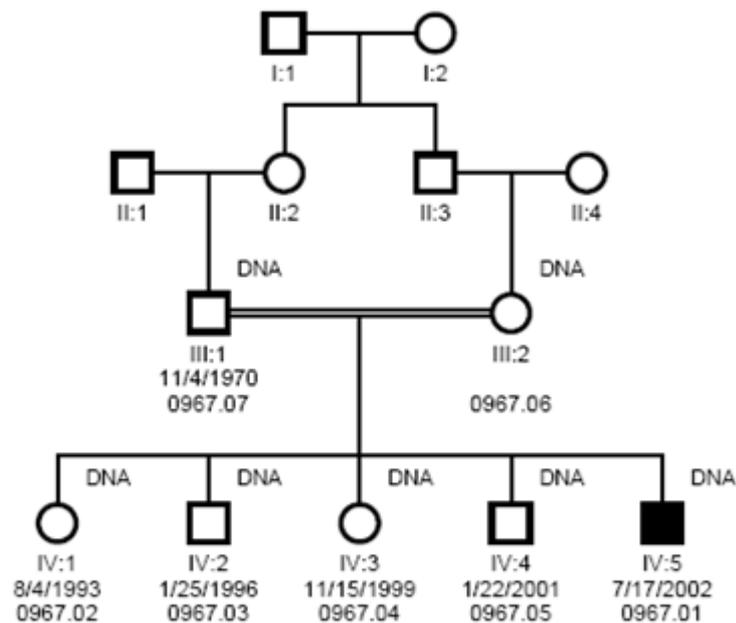


Abbildung 1: Stammbaum der Familie 967

## 2.2 Molekulargenetische Methoden

### 2.2.1 Geräte

Tabelle 2: Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Elektrophoresekammer	Compact XL Compact M Compact S	Biometra / Whatman Göttingen
Geldokumentation	Biodoc	Biometra / Whatman Göttingen
Gradienten Cycler	TProfessional Gradient	Biometra / Whatman, Göttingen
Waage	Pioneer	Ohaus Europe GmbH, Nänikon, Schweiz
Vortex		VWR International GmbH, Darmstadt
Mikropipetten	Eppendorf Reference 1 – 10 µl	Eppendorf AG, Hamburg
	Eppendorf Reference 100 – 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
	Eppendorf Reference 10 – 100 µl	Eppendorf AG, Hamburg
	Eppendorf Reference 2 – 20 µl	Eppendorf AG, Hamburg
QIAxcel	QIAxcel System	Qiagen, Hilden
Spannungsgerät	S305T	Biometra / Whatman Göttingen
Zentrifuge Rotor Becher Mikrotiterplatten-Einsatz	4K15 11150 13350 13220	Sigma Zentrifugen, Göttingen
Zentrifuge Rotor	1-15PK 15300	Sigma Zentrifugen, Göttingen

## 2.2.2 Reagenzien, Enzyme, Chemikalien, Puffer

**Tabelle 3: Chemikalien**

Reagenz	Beschreibung	Hersteller
Agarose, Seakem LE	$C_{12}H_{18}O_9$	VWR International GmbH, Darmstadt
Borsäure	$H_3BO_3$	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau Indikator	$C_{19}H_{10}Br_4O_5S$	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	$C_2H_6OS$	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	$C_{21}H_{20}BrN_3$	Sigma-Aldrich
Ethanol (EtOH)	$C_2H_6OH$	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	$MgCl_2$	Merck, Darmstadt
Trishydroxy-methyl- aminoethan (TRIS)	$C_4H_{11}NO_3$	Merck, Darmstadt
Mineral Oil		QIAGEN, Hilden
QX DNA Alignment Marker 15–500 bp		QIAGEN, Hilden

**Tabelle 4: Molekularbiologische Reagenzien**

Chemikalien	Bestellnummer	Hersteller
Desoxyribonukleosid- Triphosphat-(dNTP)-Set (jeweils 100 mM)	R0186	Fermentas, St. Leon-Roth
DNA-Ladder 100 bp (0,5 µg/µl)	SM321	Fermentas, St. Leon-Roth
Go Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	M3005	Promega, Mannheim

**2 x Stammlösungen:****10 x TBE-Puffer**

2 mM	EDTA-2 Na	0,7 g
89 mM	TRIS	10,8 g
89 mM	Borsäure	5,5 g
ad 1 l Aqua Dest		

**Gelladepuffer:**

20 % w/v	Sucrose	10 g
0,005 % w/v	Bromphenolblau	0,025 g
0,005 % w/v	Xylene Cyanol	0,025 g
ad 50 ml 1x TBE		

**2.2.3 Phenolextraktion von DNA**

Für die Phenolextraktion wurden für jede DNA-Probe vier Eppendorfgefäße mit der Probennummer beschriftet. Anschließend wurde die DNA-Lösung in ein Eppendorfgefäß pipettiert und dabei das Volumen der DNA-Probe bestimmt. Danach wurde die gleiche Menge TE-Puffer gesättigtes Phenol hinzugefügt. Durch Schütteln des Eppendorfgefäßes entstand eine homogene, trübe Flüssigkeit, die anschließend 10 min bei 17968 g zentrifugiert wurde.

Nach der Zentrifugation wurde die obere wässrige Phase sorgfältig abpipettiert und in ein weiteres Eppendorfgefäß überführt. Die untere Phase (Phenol) wurde verworfen.

Zu der oberen Phase wurde das gleiche Volumen an Chloroform hinzugefügt. Nach dem Schütteln erfolgte eine weitere Zentrifugation (10 min bei 17968 g).

Danach wurde die obere Phase in das dritte Eppendorfgefäß pipettiert. Erneut wurde das gleiche Volumen Chloroform zugegeben. Das Eppendorfgefäß wurde wiederum nach dem Schütteln 10 min in zentrifugiert. Danach wurde die obere Phase in das vierte Eppendorfgefäß pipettiert. Die untere Phase wurde aufgehoben, da aufgrund der hohen Salzkonzentration eine Phasenumkehr möglich war.

Zur Fällung der DNA wurden ein Zehntel des Volumens 3 M Natriumacetatlösung und zwei Volumenanteile eiskaltes EtOH (absolut) hinzugefügt. Das Eppendorfgefäß wurde für eine halbe Stunde bei -20 °C aufbewahrt.

Anschließend erfolgte eine Zentrifugation (20 min, 4 °C, 17968 g). Nach dem Abgießen des EtOH wurde das Pellet anschließend mit 1 ml 70 % EtOH gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation (5 min) wurde das EtOH wieder abgegossen. Anschließend

wurde das Eppendorfgefäß mit dem Pellet für 15 min bei 37 °C im Trockenschrank gelagert. Danach wurde die gewaschene DNA in der gleichen Menge sterilem 1x TE-Puffer für mehrere Minuten gelöst.

Zur Reinheitsprüfung wurde die  $OD_{230}$ ,  $OD_{260}$  und  $OD_{280}$  bestimmt (siehe Kapitel 2.3).

### 2.3 DNA-Konzentrationsbestimmung und Ansetzen der Gebrauchslösungen aus den DNA-Stammlösungen

Die Konzentration einer DNA-haltigen Lösung lässt sich photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmen. Eine Optische Dichte  $(OD)_{260} = 1$  entspricht bei einem pH von 7,0 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngige DNA. Die Proben wurden mit Wasser verdünnt.

Durch die Isolationsmethode kann die DNA-Lösung mit Proteinen, ribonucleic-acid (RNA) oder Phenolresten kontaminiert werden. Eine Verunreinigung mit Proteinen kann über eine photometrische Messung bei 280 nm bestimmt werden. Bei dieser Wellenlänge liegt das Absorptionsmaximum der aromatischen Aminosäurereste.

Die Reinheit einer DNA-Lösung kann durch das Verhältnis der  $OD_{260}$  und  $OD_{280}$  bestimmt werden. Ein  $OD_{260}/OD_{280}$ -Quotient = 1,8 spricht für eine reine DNA-Lösung. Bei einer Kontamination mit Proteinen ist dieser Wert signifikant kleiner.

Um eine Verunreinigung mit Polysacchariden nachzuweisen, wird zusätzlich der  $OD_{230}$ -Wert bestimmt. Der  $OD_{230}/OD_{260}$ -Quotient sollte im Idealfall bei 0,45 liegen [89].

Aus der DNA-Stammlösung wurden Gebrauchslösungen mit einer Konzentration von 20 ng/µl mit einem Volumen von 500 µl angesetzt. Dazu musste zunächst das einzusetzende Volumen der Stammlösung berechnet werden:

$$\frac{\text{Endkonzentration} \times \text{Endvolumen}}{\text{Konzentration der Stammlösung}} = \text{einzusetzende Volumen der Stammlösung}$$

Das berechnete Volumen der einzusetzenden Stammlösung wurde mit doppelt destilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) auf das Endvolumen eingestellt.

### 2.4 Amplifikation definierter Sequenzen durch die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Standardansatzgröße für die PCR-Ansätze betrug 10 µl. Tabelle 5 zeigt die genaue Zusammensetzung für einen PCR-Ansatz.

**Tabelle 5: Zusammensetzung des PCR-Standardansatzes**

Reagenz	Menge ( $\mu$ l)
ddH <sub>2</sub> O	2,4
Puffer (5x)	2
dNTP (1,25 mM)	1,6
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,2
Primer forward (10 mM)	0,4
Primer reverse (10 mM)	0,4
Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0,08
DNA (20 ng/ $\mu$ l)	2
Gesamt	10

Um die optimalen PCR-Bedingungen für jeden Marker zu finden, wurde jeweils ein Mastermix (62,5  $\mu$ l, Tabelle 6) hergestellt, der in sechs Ansätze mit 10  $\mu$ l zur Testung unterschiedlicher Temperaturen aufgeteilt wurde.

**Tabelle 6: Zusammensetzung eines PCR-Mastermix mit einer Ansatzgröße von 62,5  $\mu$ l**

Mastermix:	Einheit: $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	14,75
Puffer (5x)	12,5
dNTP (1,25 mM)	10
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	7,5
Primer forward (10 mM)	2,5
Primer reverse (10 mM)	2,5
Polymerase GoTaq (5 U/ $\mu$ l)	0,25
DNA (20 ng/ $\mu$ l)	12,5
Gesamt	62,5

Für die Amplifikation der Marker wurde zunächst die optimale PCR-Annealingtemperatur für jeden Marker mit einer Kontroll-DNA-Probe ermittelt. Mit dem PCR-Gradienten-Cycler wurden PCRs mit zwölf verschiedenen Annealingtemperaturen

zwischen 53 und 65 °C durchgeführt. Da die Temperaturdifferenzen maximal 1,6 °C betragen, war es ausreichend, jeden Marker nur bei jeder zweiten Temperaturstufe (entweder Temperaturstufe 1, 3, 5, 7, 9 und 11 oder Temperaturstufe 2, 4, 6, 8, 10 und 12, Tabelle 7) zu testen, weil kleine Temperaturunterschiede keine Auswirkung auf die Amplifikationseffizienz hatten.

**Tabelle 7: Temperaturstufen der Gradienten PCR**

Well	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
T [°C]	53	53,3	54,2	55,4	56,8	58,2	59,8	61,2	62,6	63,8	64,7	65

In jedem PCR-Durchlauf wurden 16 verschiedene Marker bei jeweils sechs unterschiedlichen Annealingtemperaturen amplifiziert. Die PCR wurde mit dem in Tabelle 8 beschriebenen Zyklus durchgeführt.

**Tabelle 8: Parameter der Gradienten PCR**

<b>Hot Start:</b>	94 °C	5 min
<b>Annealing:</b>	53 - 66 °C	30 - 60 s
<b>Extension:</b>	72 °C	30 s
<b>Denaturierung:</b>	94 °C	30 s
<b>Annealing:</b>	53 - 65 °C	30 - 60 s
<b>Extension:</b>	72 °C	5 min

Konnten im ersten Durchlauf keine zufriedenstellenden Amplifikationsergebnisse erzielt werden, wurde die PCR für diese DNA-Proben mit einer Zykluszeit von 60 Sekunden je Schritt wiederholt. Wenn dadurch keine Verbesserung der Amplifikation erzielt werden konnte, wurde die MgCl<sub>2</sub>-Konzentration im Ansatz verändert.

Nach der Identifikation der optimalen PCR-Bedingungen wurde jeder Marker unter den ermittelten Parametern mit einem 10 µl Standardansatz getestet.

## 2.5 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient zur Auftrennung verschieden großer DNA-Fragmente. Das Trägergel besteht aus Agarose, TBE-Puffer und Ethidiumbromid. Die Größe der Poren ist abhängig vom Vernetzungsgrad des Agarosegels und damit von der Agarosekonzentration. Die Proben werden in den Geltaschen, die sich an der einen

Seite befinden, aufgetragen. Nach Anlegen einer elektrischen Spannung wandern die DNA-Fragmente aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen von der Kathode zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit eines DNA-Fragments ist umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus seines Molekulargewichts, das heißt, kleinere Fragmente bewegen sich schneller als größere Fragmente [88].

Zur Längenbestimmung der DNA-Fragmente wurde ein DNA-Größenstandard mit Fragmenten bekannter Größe parallel zu den zu analysierenden DNA-Fragmenten in der Gelelektrophorese aufgetrennt [52].

### 2.5.1 Herstellung des Agarosegels

Da die erwartete Länge der PCR-Produkte zwischen 62 und 282 Basenpaaren (bp) lag, wurde für die Gelelektrophorese ein zweiprozentiges Gel (5 g Agarose in 250 ml 1 x TBE) verwendet, das für die Auftrennung kleiner Fragmente (0,2 – 1 kb) geeignet ist. Der Puffer mit dem Agarosepulver wurde bis zur vollständigen Lösung der Agarose aufgeköcht.

Anschließend wurde der verdunstete Teil des Puffers durch Zugabe von Ionenaustauscher ausgeglichen.

Nach dem Abkühlen auf ca. 42 °C wurden 20 µl 1 % Ethidiumbromidlösung hinzugegeben und das Gel gegossen.

Nach dem Festwerden des Gels wurde es in die Elektrophoresekammer gelegt und mit 1 x TBE-Puffer vollständig bedeckt. Dann wurden die Kämme für die Geltaschen entfernt.

Nach Verfestigung des Gels wurde dieses in die Elektrophoresekammer gelegt und mit 1 x TBE-Puffer vollständig bedeckt. Anschließend wurden die Kämme entfernt. Die Slots mussten dabei mit der Öffnung nach oben an der Kathodenseite der Elektrophorese liegen, damit die DNA Fragmente in Richtung der positiv geladenen Anode wanderten.

### 2.5.2 Auftrennung der PCR-Produkte

Von jedem PCR-Produkt wurden 5 µl in eine Geltasche pipettiert. In eine randständige Geltasche wurden 7 µl des DNA-Größenstandards pipettiert. Nach einer Stunde bei 100 Volt waren die DNA-Fragmente soweit gewandert, dass das Gel unter ultraviolettem Licht ausgewertet werden konnte.

Das im Agarosegel enthaltene Ethidiumbromid hatte sich zwischen die Doppelstränge der DNA-Fragmente eingelagert und fluoreszierte dadurch. Anhand der bekannten Fragmentgrößen des DNA-Größenstandards konnte man über die Position der Banden die Größen der PCR-Produkte abschätzen.

## 2.6 QIAxcel

Das QIAxcel-System von Qiagen ermöglicht die parallele Auftrennung von zwölf PCR-Produkten in matrixgefüllten Kapillaren. Die Vorteile dieser Methode gegenüber der Gelelektrophorese sind ein geringerer Zeitaufwand, die Durchführbarkeit mit geringerer Probenmenge und eine exaktere Bestimmung der PCR-Fragmentgrößen. Bei DNA-Fragmenten mit weniger als 500 bp ist eine Auflösung von 2–3 bp möglich. Die Datenerfassung und -analyse erfolgte standardisiert mit einer geräteeigenen Auswertesoftware. Die Daten wurden graphisch als Elektropherogramme dargestellt. Anhand der Peaks konnten die Fragmentgrößen und Mengen der PCR-Produkte ermittelt werden [91]. Ein Alignment-Marker mit Fragmenten zwischen 15 und 500 bp diente als Referenzgröße zur Berechnung der PCR-Produktlänge. Die PCR-Bedingungen wurden soweit optimiert, dass mindestens eine und maximal zwei Banden pro Marker vorlagen.

## 2.7 Gensequenzierung

Bei der Sequenzierung nach Sanger (Kettenabbruch-Methode) bewirkt der Einbau von Didesoxynukleotiden (ddNTP) den Abbruch des synthetisierten DNA-Stranges. Die Methode wird für jedes zu sequenzierende DNA-Fragment in vier parallelen Ansätzen mit Zusatz jeweils eines anderen ddNTPs durchgeführt. Dadurch liegen am Ende der entstehenden DNA-Fragmente definierte Nukleotide. Durch die Auftrennung der Fragmente nach ihrer Größe kann die Abfolge der Basensequenz ermittelt werden [46]. Die Cycle-Sequenzierung ist eine Weiterentwicklung der Sanger-Methode. Dazu führt man eine PCR, in der neben den dNTPs die vier verschiedenen, mit unterschiedlichen Farbstoffen markierten ddNTPs enthalten sind, durch. Die Basensequenz kann in einer nachfolgenden Kapillarelektrophorese mithilfe eines Fluoreszenz-Detektors direkt bestimmt werden.

Die Sequenzierungen der Kandidatengene wurden bei Seqlab in Göttingen durchgeführt.

## 2.8 Kopplungsanalyse

### 2.8.1 Definition

Bei der Kopplungsanalyse wird untersucht, ob ein potentiell krankheitsverursachendes Gen mit einer bestimmten chromosomalen Region bzw. einem Marker gekoppelt vererbt wird. Ziel der Kopplungsanalyse ist es, genetische Loci zu ermitteln, die

statistisch gesehen häufiger miteinander vererbt werden, als es aufgrund der meiotischen Teilung zu erwarten ist [71].

### 2.8.2 Das menschliche Genom

Das menschliche Genom besteht aus 46 Chromosomen, die sich in 44 Autosomen und zwei Gonosomen unterteilen. Das gesamte Genom hat eine Länge von etwa 3 Milliarden bp. Bei der Transkription werden die kodierenden Regionen der Gene in ribonucleic-acid (RNA) umgeschrieben. Aus diesem primären Transkript werden DNA-Abschnitte (Introns) ausgeschnitten. Die verbleibenden Exons (durchschnittliche Länge 122 bp), die nur etwa 2 % des menschlichen Genoms ausmachen, bilden die messenger RNA (mRNA). Die Länge der Introns übertrifft die der Exons meist um ein Vielfaches [10].

### 2.8.3 Identifizierung von pathologischen Genveränderungen

Bei der Identifikation von Genen, deren Veränderungen zu erblichen Krankheiten führen, werden vier Strategien unterschieden: die funktionsspezifische Klonierung, die positionelle Klonierung, sowie positionsunabhängige und positionsabhängige Kandidatengenverfahren [10].

Bei der funktionsspezifischen Klonierung (engl. functional cloning) ist zwar die Genfunktion, nicht aber der Gen-Lokus bzw. die DNA-Sequenz bekannt. Die Identifizierung des Gens erfolgt über die Genfunktion mithilfe spezieller Proteinantikörper oder bereits bekannter Proteinsequenzen [56].

Wenn die chromosomale Region eines Gens bekannt ist, kann dessen genaue Position mithilfe einer positionellen Klonierung ermittelt werden. Die chromosomale Region wird über eine Kopplungsanalyse bestimmt. Dieses zeitaufwändige Verfahren verliert seit dem Humangenomprojekt und mit der Weiterentwicklung von Sequenzieretechniken (Next Generation Sequencing, NGS) zunehmend an Bedeutung.

Mit dem positionsunabhängigen Kandidatengenverfahren werden potentielle krankheitsauslösende Gene ohne eine vorgeschaltete Kopplungsanalyse bestimmt. Das Verfahren basiert auf einem Vergleich der zu untersuchenden Erkrankung mit Phänotypen von Menschen oder Tieren mit bekannten Mutationen. Eine weitere Möglichkeit ist die Zuordnung des unbekanntes Gens zu einer bereits bekannten Genfamilie aufgrund der Krankheitsbefunde.

Die zurzeit vielversprechendste Methode zur Identifizierung krankheitsauslösender Gene ist das positionelle Kandidatengenverfahren. Wie bei der positionellen Klonierung muss für dieses Verfahren eine chromosomale Region, in der das krankheitsverursachende Gen liegt, bekannt sein. Diese Region wird im Vorfeld durch eine Kopplungsanalyse ermittelt. Über Datenbanken des Humangenomprojekts

(<http://www.ebi.ac.uk/embl/> oder <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), die eine Vielzahl von Informationen über verschiedene Gene enthalten, lassen sich die Gene bestimmen, die in der identifizierten Region lokalisiert sind [10].

Nach Ermittlung der Kandidatengene werden diese sequenziert und potentielle Genmutationen identifiziert [56].

#### 2.8.4 **Single Nucleotide Polymorphism (SNP)**

SNPs werden auch als „erfolgreiche Punktmutationen“ bezeichnet, weil sie bei mindestens 1 % der Population vorkommen und sich daher im Genpool durchgesetzt haben. Unter einer Punktmutation versteht man den Austausch einer Base der DNA gegen eine andere. Die Folge einer Punktmutation kann ein verändertes Genprodukt sein, wenn die betroffene Position innerhalb von kodierenden Sequenzen liegt.

Da sich rein statistisch gesehen menschliche Genome an jeder tausendsten Stelle voneinander unterscheiden, enthält ein individuelles Genom rein rechnerisch etwa drei Millionen SNPs [46].

SNPs führen nur selten zu einer Erkrankung, da sie auch außerhalb von Genen vorkommen. Im Vergleich zu Mikrosatellitenmarkern ist mithilfe von SNPs aufgrund ihrer Häufigkeit eine höhere Feinauflösung genetischer Karten möglich.

SNPs bestehen aus maximal zwei Allelen, sind wenig polymorph und eignen sich daher gut zur automatisierten Typisierung. Diese Eigenschaften prädestinieren SNPs als Marker zur Lokalisation krankheitsverursachender Gene in definierten chromosomalen Regionen [70].

In der Genomanalyse werden aktuell Oligonukleotid-Arrays angewandt, bei denen SNPs durch die Hybridisierung mit genomischer DNA charakterisiert werden [56].

#### 2.8.5 **Mikrosatellitenmarker**

Auf den Chromosomen befinden sich durchschnittlich alle 30 kb sogenannte repetitive DNA-Sequenzen. Dabei handelt es sich um kurze Sequenzen, die in Tandemwiederholungen aufeinanderfolgen [46]. Nach Größe der Wiederholungseinheit und Anzahl der Wiederholungen unterscheidet man Satelliten-DNA, Minisatelliten-DNA und Mikrosatelliten-DNA. Mikrosatelliten machen ca. 2 % des Genoms aus. Am häufigsten handelt es sich bei den wiederholten Einheiten um Dinukleotide, meist CA/TG- oder AC/GT-Repeats. Tri- und Tetranukleotide sind wesentlich seltener. Da Mikrosatelliten polymorph sind, werden sie gerne als genetische Marker in Kopplungsanalysen eingesetzt. Eine noch höhere Feinauflösung genetischer Karten erreicht man mit Einzelnukleotid-Polymorphismen, die sogenannten SNPs [10].

Mit SNPs kann man zwar eine höhere Feinauflösung genetischer Karten erzielen, sie haben aber den Nachteil, dass sie nur als zwei Allele vorkommen [10]. Mikrosatelliten

liefern aufgrund ihrer Variabilität einen höheren Informationsgehalt, weil die Genome beider Elternteile bis zu vier verschiedene Markerallele (zwei je Elternteil) aufweisen. DNA-Sequenzen, die in einer SNP-Analyse homozygot sind, können deshalb durch Mikrosatellitenmarker weiter differenziert werden. Aus diesem Grund werden nach der Kopplungsanalyse über SNPs Mikrosatellitenmarker bestimmt, die auf den durch die SNP-Analyse bestimmten Chromosomenbereichen liegen.

#### 2.8.6 **Logarithmic Odds Ratio (LOD)-Score**

Beim Erstellen der genetischen Karten untersucht man mit Hilfe der Kopplungsanalyse, mit welcher Wahrscheinlichkeit zwei Merkmale auf einem Chromosom voneinander getrennt, bzw. gekoppelt vererbt werden [10]. Für eine Familienuntersuchung muss ein Elternteil sowohl für die Genmutation als auch für den Marker heterozygot sein [73].

Über die Rate meiotischer Rekombination zwischen zwei Loci wird die Position eines Quantitative Trait Locus (QTL = Phänotyp) relativ zu einem definierten Locus bestimmt. Dabei ist ein Locus durch eine Sequenzposition im Genom definiert, die in verschiedenen Allelen vorkommt. Liegen zwei Loci auf demselben Chromosom, ist eine meiotische Rekombination nur bei einem Crossing Over zwischen den homologen Chromosomen des diploiden Chromosomensatzes im Rahmen der Keimzellbildung möglich [105]. Je größer der Abstand zweier Loci auf einem Chromosom ist, desto häufiger werden diese getrennt vererbt, weil die Wahrscheinlichkeit für ein Crossing-Over über die Distanz zunimmt. Dicht beieinander liegende Loci werden dagegen häufiger gekoppelt vererbt.

Der Abstand zwischen zwei Genen wird in Centi-Morgan (cM) angegeben. Ein Centi-Morgan entspricht einer Rekombinationshäufigkeit von 1 % und umfasst eine Sequenz von 1 Mbp.

Die Rekombinationswahrscheinlichkeit beträgt Null, wenn eine vollständige Kopplung vorliegt. Bei freier Rekombination beträgt sie 0,5. In diesem Fall liegen die beiden Loci auf verschiedenen Chromosomen oder sehr weit voneinander entfernt auf demselben Chromosom.

Die statistische Bewertung von Kopplungsanalysen erfolgt über den LOD-Score [10]. Dieser ist definiert als der Logarithmus zur Basis 10 des Quotienten aus der Wahrscheinlichkeit für eine Kopplung durch die Wahrscheinlichkeit für eine Nichtkopplung. Eine signifikante Kopplung liegt vor, wenn der LOD-Score über 3 liegt (d.h. der Quotient beträgt 1000 : 1). In diesem Fall ist die Wahrscheinlichkeit einer Kopplung beider Loci um einen Faktor 1000 höher als die Wahrscheinlichkeit einer Nichtkopplung. Die Wahrscheinlichkeit für ein falsch positives Ergebnis liegt somit bei 0,001. Ein Wert unter -2 steht für eine Nichtkopplung. Die Wahrscheinlichkeit für eine

Nichtkopplung ist dann mindestens 100 mal höher als die Wahrscheinlichkeit einer Kopplung [10, 56].

Mit einer genomweiten Kopplungsanalyse lassen sich chromosomale Regionen ausfindig machen, auf denen potentielle Kandidatengene liegen.

#### 2.8.7 **SNP-Genotyping Microarrays**

Die DNA-Proben der sieben Familienmitglieder wurden im Gene Mapping Center des Max Delbrück Center for Molecular Medicine (MDC), Berlin-Buch, mit dem Human Mapping 50K Array Xba 240 (Version 01-2007) von Affymetrix hybridisiert und detektiert. Danach wurden die Daten von Dr. Franz Rüschenhoff mit Hilfe der Software ALOHOMORA (V0.29) für die weitere Analyse in MERLIN ausgewertet (Annotation File: NA21, Xba240 map file vom 02.01.2007, Reference NCBI 36.3, Built HG18 von 03/2006 für dbSNP vom 23.10.2007) und zur Verfügung gestellt. ALOHOMORA ist eine Software, die die Kopplungsanalyse mit dem Mapping-Array kombiniert, indem sie die SNP-Daten aufbereitet und Eingabedateien für verschiedene Kopplungsanalyse- und Auswerteprogramme erstellt.

Der bei der Untersuchung verwendete Human Mapping 50K Array Xba 240 von Affymetrix ermöglicht die Genotypisierung von 50.000 SNPs.

Voraussetzung für die Durchführung der Analysen war eine DNA-Ausgangsmenge von 250 ng pro Array und eine Mindestkonzentration von 50 ng/µl. Weiter musste die DNA doppelsträngig und frei von PCR-Inhibitoren vorliegen.

#### 2.8.8 **Parametrische Analyse**

Die statistische Einschätzung für die Wahrscheinlichkeit einer Genkopplung gelingt mit einer parametrischen oder nicht-parametrischen Analyse. Anders als bei der nicht-parametrischen Analyse ist bei der parametrischen Analyse ein Krankheitsmodell vorgegeben, das bestimmte Komponenten wie ein Vererbungsmuster, die Genfrequenz, die Häufigkeit und die Penetranz des Genotyps enthält [1]. Die Struktur der in der vorliegenden Analyse untersuchten Familie erlaubte die Anwendung eines parametrischen Verfahrens.

Bei Vererbungsmustern unterscheidet man zwischen autosomal-dominant, autosomal-rezessiv, X-chromosomal dominant, X-chromosomal rezessiv, Y-chromosomal und mitochondrial [73].

Die dritte Mendelsche Regel (Unabhängigkeitsregel) beschreibt die Vererbung zweier verschiedener Merkmale mit je zwei Allelen, die auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind. In diesem Fall werden beide Merkmale unabhängig voneinander vererbt und jedes Merkmal wird für sich nach der ersten und zweiten Mendelsche Regel vererbt [70]. Die Wahrscheinlichkeit, dass zwei bestimmte Allele zweier

verschiedener Marker auf zwei unterschiedliche Tochterzellen verteilt werden, beträgt 50 %.

Liegen zwei Loci hingegen auf einem Chromosom, beträgt die Wahrscheinlichkeit einer Trennung bei der Meiose durch Rekombination unter 50 %, d.h.  $< 0,5$ . Je näher die beiden Loci auf einem Chromosom aneinander liegen, desto unwahrscheinlicher ist eine Rekombination durch Crossing Over. Bei einer chromosomalen Kopplung kann die Rekombinationsrate zwischen 0 und  $< 0,5$  liegen [56].

Unter Penetranz versteht man die Wahrscheinlichkeit, mit der sich ein bestimmter Genotyp auch phänotypisch auswirkt. Trägt eine Person eine Genveränderung, erkrankt aber nicht, hat der betreffende Genotyp eine unvollständige Penetranz [56, 73].

Für die Durchführung von parametrischen Kopplungsanalysen stehen verschiedene Softwareprogramme, wie beispielsweise MERLIN (Multipoint Engine for Rapid Likelihood Inference), zur Verfügung [1].

MERLIN errechnet die Kopplungswahrscheinlichkeiten anhand von Kopplungsdaten und verschiedenen Parametern wie Familienstruktur, Vererbungsmodell und Prävalenz der Erkrankung. Für die Durchführung der Kopplungsanalyse muss der Stammbaum der Familie des Patienten bekannt sein. Die zur Untersuchung verwendeten Marker (Mikrosatellitenmarker oder SNPs) müssen für alle Familienmitglieder genotypisiert werden.

Die Geno- und Phänotypen der Familienmitglieder wurden in einer Stammbaumdatei (pedigree file), einer Stammbaum spezifischen Parameterdatei (data file) und einer Kartierungsdatei mit den chromosomalen Positionen (map file) beschrieben.

Der Stammbaum lieferte Informationen über die Geschlechterverteilung, Familienmitglieder und Generationen. Neben der Anzahl der Erkrankten wurde auch die Anzahl der betroffenen Generationen berücksichtigt. Von Bedeutung war außerdem die Anzahl der Krankheitsüberträger.

Die berechneten LOD-Scores (siehe Kapitel 2.8.6) für jeden Marker wurden gegen die genomische Position aufgetragen. Anschließend wurde der DNA-Abschnitt mit der höchsten Wahrscheinlichkeit für die Lokalisation des Kandidatengens bestimmt [104].

## **2.9 Ermittlung geeigneter Mikrosatellitenmarker**

Gekoppelte Loci, die in kosanguinen Familien über SNP-Arrays ermittelt werden, umfassen meist einen weiten Bereich. Für die Suche nach Kandidatengenen müssen diese Regionen weiter eingegrenzt werden. Dazu eignen sich Mikrosatellitenmarker, da

sie aufgrund ihrer höheren Heterogenität innerhalb der untersuchten Familie mehr Information über die lokale Rekombinationshäufigkeit liefern [73].

Die Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 7, 8 und 14 wurden über das Datenbanktool MAPVIEW beim NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>) bestimmt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Marker gleichmäßig über die potentiellen Loci verteilt waren und eine Heterogenität von mindestens 0,7 aufwiesen. Unter der Heterogenität eines Markers versteht man die Verteilung unterschiedlicher Allele dieses Markers in der Allgemeinbevölkerung. Je gleichmäßiger die Verteilung und je höher die Heterogenität, desto besser sind die Marker für die Kopplungsanalyse geeignet.

Für Chromosom 7 und 14 wurden je zehn Marker und für Chromosom 8 neun Marker identifiziert (siehe Tabelle 9, 10, 11). Bei den ausgewählten Markern handelte es sich ausschließlich um CA-Repeats. Die Position der Marker zueinander ist in den Abbildungen 2, 3 und 4 dargestellt.

**Tabelle 9: Eingesetzte Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 7**

Marker	Chromosomale Position	Heterogenität	PCR-Produkt (bp)	UniSTS-ID	dbSNP-ID	Assembly
D7S2551	20107333..20107369	0,71	169-179	21477	rs3219769	HuRef
D7S2562	21370831..21370926	0,84	195-217	24868	rs3221991	HuRef
D7S493	21690479..21690498	0,88	194-224	51444	rs3219983	HuRef
D7S629	22697256..22697300	0,74	249-263	21583	rs3220030	HuRef
D7S673	23733299	0,86	118-148	54457	rs3221093	HuRef
D7S2493	24778644	0,75	113-145	38103	rs3220621	HuRef
D7S2525	25458530	0,77	178-198	82950	rs3221344	HuRef
D7S2440	26640649	0,76	172-194	22751	rs3222494	HuRef
D7S2556	27515926..27515967	0,69	69-89	49121	rs3219776	HuRef
D7S526	30831019	0,71	124-135	2439	rs3220738	HuRef

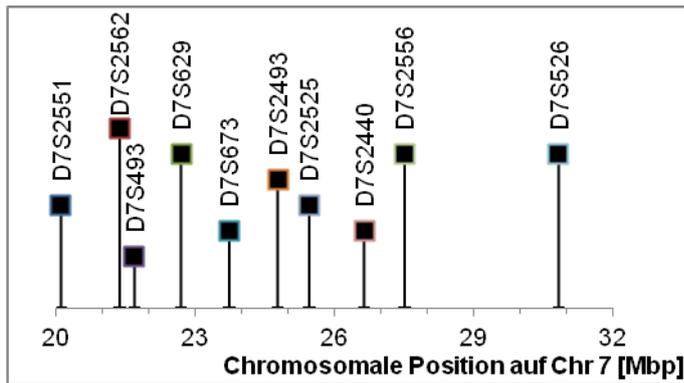


Abbildung 2: Verteilung der Marker auf Chromosom 7, 20107333 – 30831019 bp; SNP definierter Bereich: 20198898-28923785 bp

Tabelle 10: Eingesetzte Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 8

Marker	Chromosomale Position	Heterogenität	PCR-Produkt (bp)	UniSTS-ID	dbSNP-ID	Assembly
D8S1731	13781058..13781104	0,84	217-241	29402	rs3222793	HuRef
D8S258	18907593	0,7	144-154	38387	rs3219760	HuRef
D8S282	19958241	0,72	260-272	54041	rs3220594	HuRef
D8S298	20724181	0,69	155-167	15112	rs3220625	HuRef
D8S1733	21064217..21064238	0,64	217-259	24195	rs3220194	HuRef
D8S1734	21339817	0,67	98-120	49730	rs3222826	HuRef
D8S1725	23641744	0,66	158-164	7553	rs3222571	HuRef
D8S1771	23986227	0,76	218-240	81107	rs3223346	HuRef
D8S1820	26543124	0,74	103-117	14109	rs3221739	HuRef

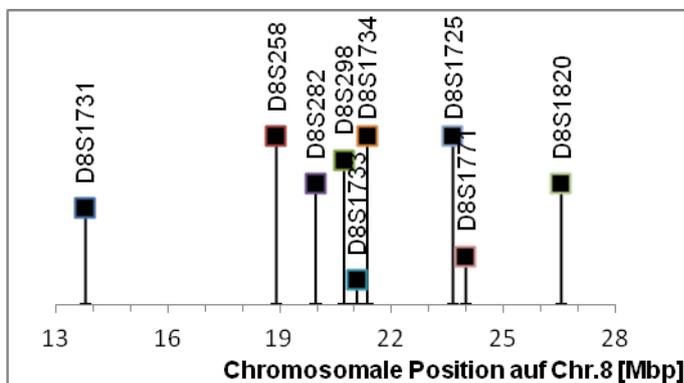


Abbildung 3: Verteilung der Marker auf Chromosom 8, 13781058 - 26543124 bp ; SNP definierter Bereich: 20347695-23045446 bp

Tabelle 11: Eingesetzte Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 14

Marker	Chromosomale Position	Heterogenität	PCR-Produkt (bp)	UniSTS-ID	dbSNP-ID	Assembly
D14S72	21371146	0,82	257-271	479968	rs3220241	GCH37
D14S1023	21442117	0,82	93-109	71727	rs3223415	GCH37
D14S283	22687564-226875	0,82	125-153	53734	rs3221322	GCH37
D14S990	23586459	0,85	135-161	57093	rs3222520	GCH37
D14S972	24347835-24347870	0,75	201-211	76329	rs3222058	GCH37
D14S64	24560330	0,75	126-136	54008	rs3219681	GCH37
D14S264	25280072-25280107	0,72	216-234	31557	rs3219695	GCH37
D14S1032	26211356	0,73	268-282	73907	rs4915421	GCH37
D14S275	26696825-26696868	0,71	194-205	62366	rs3221112	GCH37
D14S80	27724479	0,83	132-156	40831	rs3220706	GCH37

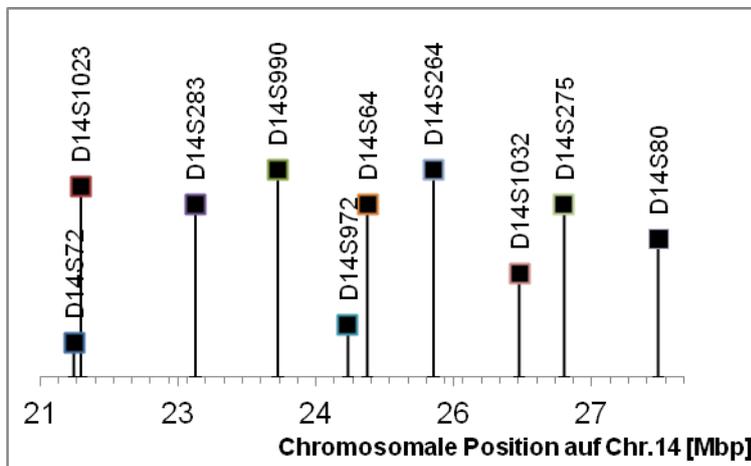


Abbildung 4: Verteilung der Marker auf Chromosom 14, 21371146 - 27724479 bp; SNP definierter Bereich: 21452992 – 26740590 bp

Nach Auswahl der Mikrosatellitenmarker wurden die Sequenzen für die PCR-Primer aus der UniSTS- und dbSNP-Datenbank entnommen. Die Primer wurden bei Metabion International GmbH (Martinsried) nach Angaben aus den Internetdatenbanken (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) synthetisiert.

## **2.10 Auswahl möglicher Kandidatengene**

Bei der Auswahl der Kandidatengene wurden verschiedene Kriterien beachtet, um die Wahrscheinlichkeit für einen Zusammenhang mit der untersuchten Erkrankung zu erhöhen.

Zuerst wurde die Funktion des Gens betrachtet und hinterfragt, ob eine Mutation in diesem Gen mit dem Phänotyp der Erkrankung in Verbindung gebracht werden konnte. Dabei wurde berücksichtigt, dass biochemische Prozesse häufig nicht unmittelbar mit den Symptomen einer Erkrankung in Verbindung gebracht werden können. Weiter wurden die phänotypischen Auswirkungen von Mutationen in homologen Genen berücksichtigt.

Anhand des Expressionsmusters wurde untersucht, ob die Kandidatengene in von der Erkrankung betroffenen Geweben exprimiert werden.

Gene, deren Mutation bei Tieren zu Erkrankungen mit einem ähnlichen Phänotyp führen, galten ebenfalls als vielversprechende Kandidaten.

Bei der Untersuchung größerer Genregionen wurde die Größe der zu untersuchenden Gene berücksichtigt. Kamen zwei Gene in Frage, die sich nur anhand ihrer Exon-Anzahl unterschieden, wurde zunächst das kleinere Gen untersucht, da der Aufwand der Analyse direkt mit der Größe des Genes korreliert [73].

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Anamnese der Familie

Von der Familie des an LCA erkrankten Kindes wurden DNA Proben aus zwei Generationen (Eltern, zwei Töchter, drei Söhne) analysiert. In der zweiten Generation war der jüngste Sohn an LCA erkrankt. In der Familie war kein weiterer Krankheitsfall bekannt. Die eineinhalb Jahre ältere Schwester litt an Neurodermitis, die anderen drei Geschwister waren, soweit berichtet, gesund. Es bestand eine Konsanguinität, da Mutter und Vater Cousin und Cousine waren. Ein Onkel mütterlicherseits war im fortgeschrittenen Alter an Diabetes mellitus Typ II erkrankt und aufgrund dieser Erkrankung erblindet.

Die Blutproben der sieben Familienangehörigen (967.01-07, Abbildung 1) wurden in Form von EDTA-Blut für die Untersuchung an das molekulargenetische Labor der Abteilung für Pädiatrische Ophthalmologie, Strabismologie und Ophthalmogenetik (KSO) des Universitätsklinikums Regensburg gesandt. Die DNA-Proben wurden aus jeweils 4 ml EDTA-Blut der Geschwister und jeweils 10 ml EDTA-Blut der Eltern extrahiert.

Die extrahierte DNA wurde zunächst im molekulargenetischen Labor der KSO auf Mutationen damals bekannter LCA-Gene untersucht. Die Untersuchungen wurden anschließend im Labor für molekulare Ophthalmologie der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Justus-Liebig-Universität in Gießen mit einer Kopplungsanalyse (die vorliegende Arbeit) fortgeführt.

Der Patient 967.01 wurde 2002 im Kinderzentrum Bielefeld, Lehrkrankenhaus der Universitätsklinik Münster, untersucht (Tabelle 12). Aus der Krankenakte ging hervor, dass den Eltern bei ihrem Sohn eine schlechte Kopfkontrolle und ein Unvermögen, Gegenstände richtig zu fixieren, aufgefallen war. Bei der Aufnahme war der vier Monate alte Säugling in einem guten Allgemein- und Ernährungszustand. Er zeigte eine auffällige Augenmotorik mit Nystagmus in wechselnder Richtung. Die Pupillen waren weit, die Pupillenreaktion stark verlangsamt und es bestand eine leichte Miosis. Erst bei längerer Lichtexposition verstärkte sich die Miosis. Eine Fixation der Augen war nicht sicher nachweisbar. Der Patient blinzelte oder erschrak nicht, wenn Gegenstände direkt auf ihn zu bewegt wurden.

Auffällig waren weiterhin die unkoordinierten Bewegungsmuster der Arme und Beine. Die Muskeleigenreflexe waren seitengleich auslösbar. Weiter zeigte der Säugling einen Moro-Reflex.

Bei einem Traktionsversuch, bei dem der Säugling an den Armen hochgezogen wurde, fiel eine schlechte Kopfkontrolle auf. Um eine Muskelerkrankung auszuschließen, wurde die gesamte Muskulatur untersucht. Der generalisierte Muskeltonus erwies sich als nicht pathologisch. Die schlechte Kopfhaltung wurde durch die mangelnde Fähigkeit, die Motorik visuell zu koordinieren, erklärt.

Auch die weitere körperliche Untersuchung ergab keine pathologischen Befunde. Das Blutbild des Patienten war unauffällig. In der Blutgasanalyse ließ sich eine leichte kompensierte metabolische Azidose nachweisen. Serologisch gab es keinen Hinweis auf eine abgelaufene Cytomegalievirus- (CMV), Röteln- oder Toxoplasma-Infektion. Im Alter von vier Monaten wurde der Säugling einem niedergelassenen Augenarzt vorgestellt. Die augenärztliche Untersuchung ergab normal brechende Medien und eine unauffällige Darstellung des Nervus opticus. Eine Fixation der Augen war nicht detektierbar. Gelegentlich bestand der Eindruck, dass eine starke Lichtquelle mit den Augen verfolgt wurde. Die Pupillenreaktion war stark eingeschränkt, da erst nach längerer Lichtexposition eine deutliche Miosis einsetzte. Der Fundus war nur schwer beurteilbar. Eine Makulahypoplasie, Optikusatrophie oder retinale Degenerationen waren nicht erkennbar. Aufgrund des klinischen Bildes wurde eine primäre Optikusatrophie angenommen.

Die Familie des Patienten stand laut Angaben des einsendenden Kinderarztes für weitere Untersuchungen nicht mehr zur Verfügung.

Tabelle 12: Zusammenfassung der klinischen Untersuchungsergebnisse des Patienten

Untersuchung	Ergebnis
Augenärztliche Untersuchung	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Keine Fixation möglich</li> <li>- Stark eingeschränkte Pupillenreaktion</li> <li>- Fundus schwer beurteilbar</li> </ul>
Visuell evozierte Potentiale (VEP)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Keine reproduzierbaren VEPs, weder seitengetreunt noch binokulär</li> <li>- Deutlicher Hinweis auf eine Netzhauterkrankung oder Leitungsstörung im Verlauf der Sehbahn</li> </ul>
Traktionsversuch	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Schlechte Kopfbalance</li> </ul>
Blutgasanalyse	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Leicht kompensierte metabolische Azidose</li> </ul>
Serologie	<ul style="list-style-type: none"> <li>- CMV / Toxoplasmose / Röteln negativ</li> </ul>
Urinstatus	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ohne pathologischen Befund</li> </ul>
Qualitative Urintests: Phenylketonurie-Screening, Reduktionsprobe, Ninhydrin, Brand'sche Probe	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ohne pathologischen Befund</li> </ul>
Sonographie Schädel	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Unauffällig</li> </ul>
Nuclear magnetic resonance-(NMR)-Spektroskopie des Neurocraniums	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Normalbefund</li> </ul>
Blutbild (inklusive Leber und Nierenwerte)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Unauffällig</li> </ul>

### 3.2 SNP Genotypisierung und Kopplungsanalyse

Mit den sieben vorliegenden DNA-Proben wurde im Gene Mapping Center des Max Delbrück Center for Molecular Medicine, wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben, mithilfe des Human Mapping 50K Array Xba 240 von Affymetrix, eine Genotypisierung der SNPs durchgeführt. Im Anschluss wurden die Daten mit ALOHOMORA aufbereitet und einer parametrischen Kopplungsanalyse in MERLIN unterzogen. Dazu wurde eine kurze Konsanguinitätsschleife in den Stammbaum eingeführt. Durch die genomweite Kopplungsanalyse konnten auffällige LOD-Scores an drei Loci auf Chromosom 7, 8 und 14 (grüne Pfeile) ermittelt werden (Abbildung 5, Tabelle 13).

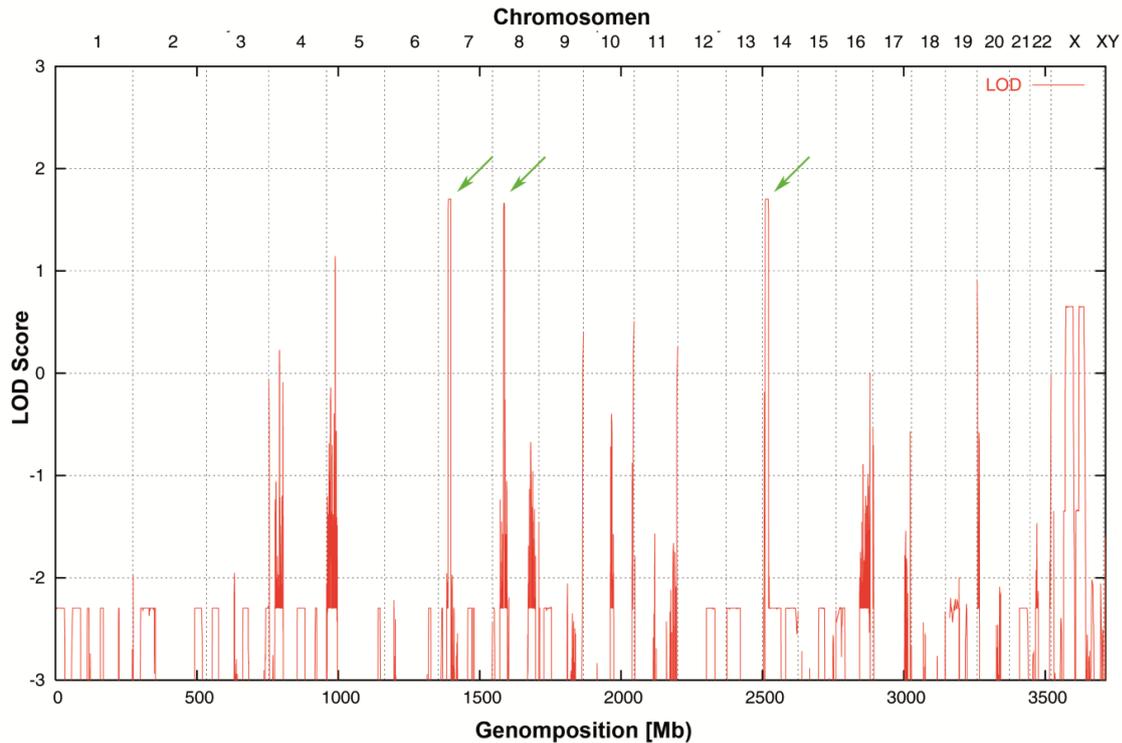


Abbildung 5: Auswertung des Human Mapping 50K Array Xba 240 von Affymetrix mit MERLIN

Tabelle 13: LOD-Scores der Kopplungsanalyse mittels SNP-Marker

Chromosom	LOD Score	Chromosomale Position	Assembly
7	1,8	20198898 – 28923785 bp	HuREF [89, 99]
8	1,7	20347695 – 23045446 bp	HuREF [100, 101]
14	1,8	21452992 – 26740590 bp	GCH37 [96, 97]

Höhere LOD-Scores waren nicht zu erwarten, da nur eine begrenzte Anzahl von Meiosen (DNA-Proben aus zwei Generationen) zur Verfügung stand, die in die Berechnung mit einbezogen werden konnten. Die Ergebnisse konnten nicht als signifikant gewertet werden, da keine LOD-Scores  $> 3$  auftraten. Daher musste eine Feinkartierung der Loci durchgeführt werden, um die möglichen Kandidatengene näher einschränken zu können.

Für die weitere Untersuchung der Chromosomenbereiche wurden Mikrosatellitenmarker benutzt, die über das MAPVIEW Tool des National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview//>) bestimmt wurden.

### **3.3 Optimierung der Mikrosatellitenamplifikation**

Zunächst wurden mit einer Kontroll-DNA (DNA 0005) die optimalen Bedingungen zur Amplifikation der Mikrosatellitenmarker bestimmt (siehe Kapitel 2.5). Variiert wurden dazu die Annealingzeit und -temperatur der PCR und die Zusammensetzung des Mastermixstandards.

Für jeden Mikrosatellitenmarker wurde eine PCR mit sechs verschiedenen Annealingtemperaturen zwischen 53 – 65 °C durchgeführt. Die optimalen Bedingungen für jeden Marker sind in der Tabelle 14 zusammengefasst.

**Tabelle 14: Abweichungen der Mastermixzusammensetzung, optimale PCR Temperatur und Annealingzeit für die Amplifikation der Mikrosatellitenmarker**

<b>Marker</b>	<b>Annealingtemperatur [°C]</b>	<b>Annealingzeit [s]</b>	<b>Änderung der Mastermixstandards</b>
D7S493	59,7	30	
D7S629	62,6	30	
D7S2493	58,2	30	
D7S2525	56,8	30	
D7S2440	56,8	60	
D7S2556	59,8	30	
D7S526	56,8	30	
D8S1731	56,8	60	
D8S258	59,8	30	
D8S282	59,8	30	
D8S298	62,6	30	
D8S1733	59,8	30	
D8S1734	59,8	30	
D8S1725	62,6	60	+ 2 µl MgCl <sub>2</sub>
D8S1771	59,8	30	
D8S1820	62,6	60	+ 2 µl MgCl <sub>2</sub>
D14S72	59,8	30	
D14S1023	54,2	30	
D14S283	53	30	
D14S990	63,8	30	
D14S972	58,2	30	
D14S64	59,8	30	
D14S264	58,2	30	
D14S1032	65	30	
D14S275	65	30	
D14S80	58,3	30	

### 3.3.1 Amplifikation der Mikrosatellitenmarker mit den DNA-Proben der Familie

Unter den optimierten PCR-Bedingungen wurde die PCR mit den sieben zu untersuchenden DNA-Proben durchgeführt.

Die DNA-Proben wurden mit einer Konzentration von 20 ng/µl angesetzt.

Für jeden Marker wurde jeweils ein PCR Ansatz für jedes Familienmitglied hergestellt.

Nach Auftrennung des PCR Produkts in der Agarosegelelektrophorese fiel auf, dass die Banden bei allen PCR Ansätzen der DNA Proben 967.06 und 967.07 sehr schwach waren. Grund dafür war ein zu hoher Proteinanteil in den DNA-Proben, der mit einer Phenolextraktion der DNA verringert wurde. Diese wurde, wie in Kapitel 2.5 beschrieben, durchgeführt. Die aufgereinigten DNA Proben wurden erneut auf 20 ng/µl konzentriert und die PCRs mit anschließender Gelelektrophorese bei beiden DNA Proben für alle Marker wiederholt.

## 3.4 Kopplungsanalyse mit den Mikrosatellitenmarkern

Nach der Amplifikation wurde die Allelgröße der Mikrosatellitenmarker mit der QIAxcel bestimmt.

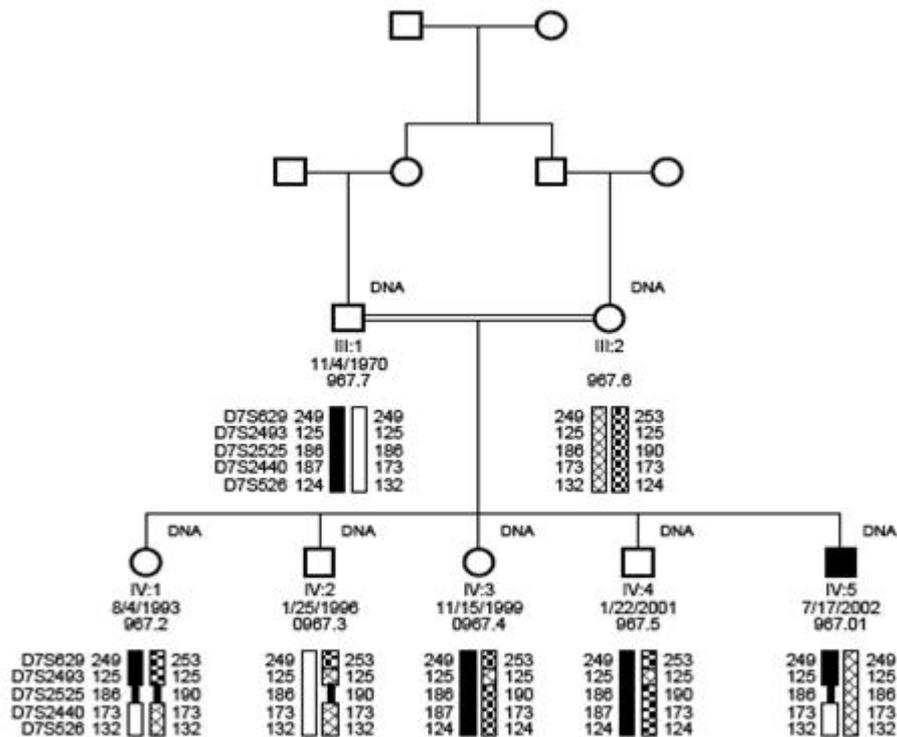
Nach Typisierung aller Allele der untersuchten Mikrosatellitenmarker der zur Verfügung stehenden DNA-Proben wurden die Haplotypen bestimmt.

Die Genotypisierungen wurden graphisch mit CYRILLIC 2.1 dargestellt. CYRILLIC 2.1 erlaubt auch eine Haplotypisierung, die für jedes Chromosom separat durchgeführt wurde (Abbildungen 6 – 8). Nicht informative Marker wurden nicht dargestellt.

Der Haplotyp des an LCA erkrankten Kindes wurde mit den Haplotypen der anderen Familienmitglieder verglichen. Dabei wurde analysiert bei welchen Mikrosatellitenmarkern Unterschiede bestanden.

### 3.4.1 Haplotypen der Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 7

Abbildung 6 zeigt den Stammbaum der Familie und die Mikrosatellitenmarkeranalyse für Chromosom 7.



**Abbildung 6: Stammbaum der Familie 967 mit den Haplotypen der Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 7**

Die Haplotypen der Mikrosatellitenmarker der Kinder waren verschiedene Konstellationen aus je einem Haplotyp der entsprechenden Marker des Vaters und der Mutter. Die Auswertung der Mikrosatellitenmarker D7S493 und D7S2556 ergab keine brauchbaren Informationen, da beide Eltern homozygote Träger des gleichen Haplotyps waren und daher keine Rückschlüsse auf das Verteilungsmuster bei den Kindern möglich war.

Sowohl der erkrankte Sohn, als auch ein gesunder Bruder und eine gesunde Schwester wiesen für den Mikrosatellitenmarker D7S2440 den gleichen Haplotyp auf, so dass eine Lage des Kandidatengens in diesem Bereich ausgeschlossen werden konnte.

Die Mikrosatellitenmarker D7S629, D7S2493, D7S2525 und D7S526 wurden weiter untersucht.

Der Vergleich der Haplotypkonstellationen der Geschwister und der Eltern ergab keine auffälligen Unterschiede zwischen dem erkrankten Kind und den gesunden Geschwisterkindern bzw. den phänotypisch gesunden Eltern.

### 3.4.2 Haplotypen der Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 8

Abbildung 7 zeigt den Stammbaum der Familie und die Mikrosatellitenmarkeranalyse für Chromosom 8.

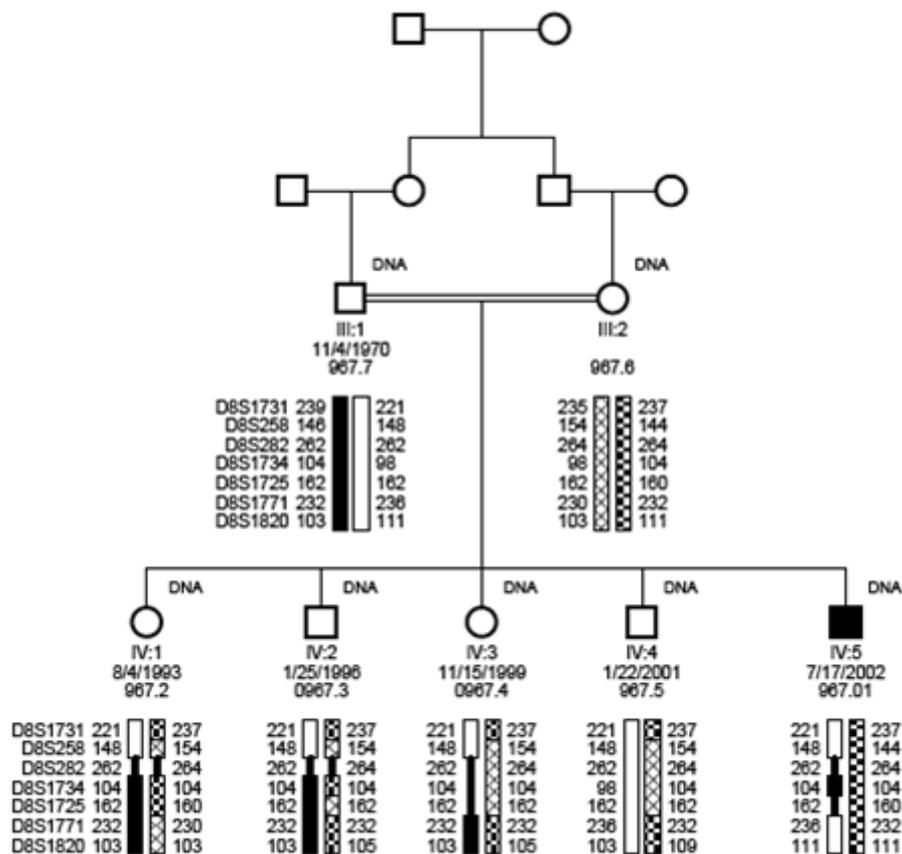


Abbildung 7: Stammbaum der Familie 967 mit den Haplotypen der Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 8

Auf Chromosom 8 wurden neun Mikrosatellitenmarker untersucht. Die Marker D8S1733 und D8S298 lieferten keine auswertbaren Informationen, weil die gesunden Geschwister und das erkrankte Kind identische Haplotypen besaßen. Auffällig war, dass das erkrankte Kind bezüglich des Mikrosatellitenmarkers D8S1820 ein homozygoter Allelträger war, während sowohl die Eltern als auch die gesunden Geschwisterkinder heterozygote Allele besaßen.

### 3.4.3 Haplotypen der Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 14

Abbildung 8 zeigt den Stammbaum der Familie und die Mikrosatellitenmarkeranalyse für Chromosom 14.

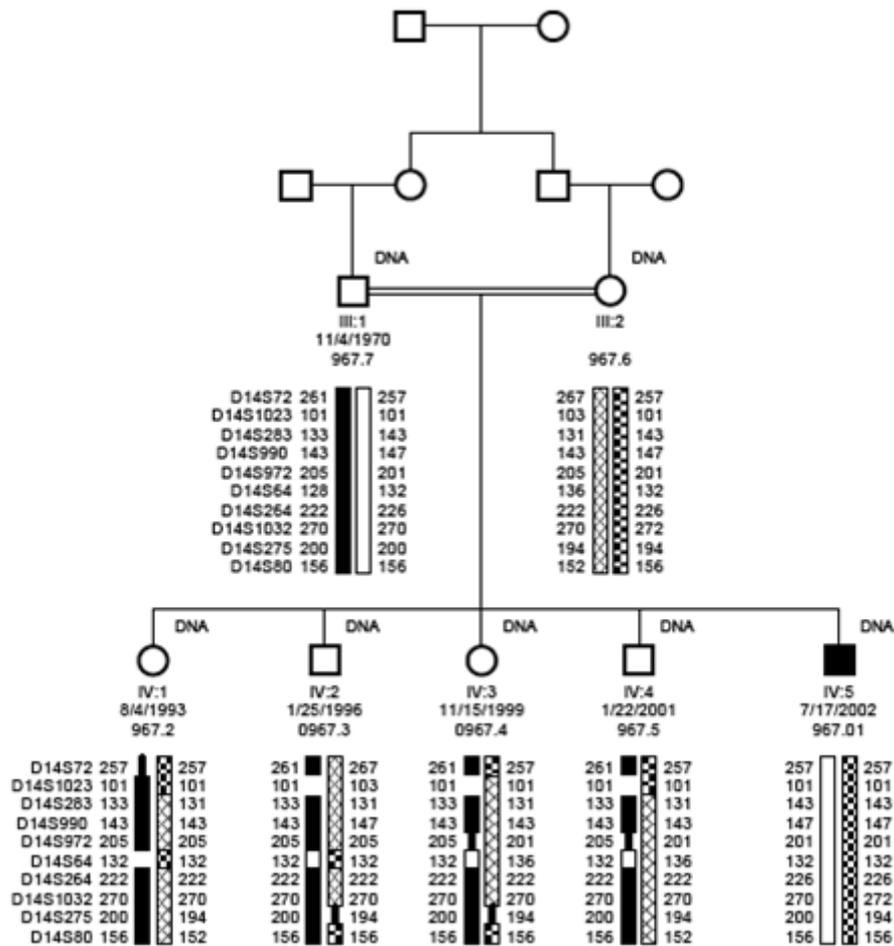


Abbildung 8: Stammbaum der Familie 967 mit den Haplotypen der Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 14

Auf Chromosom 14 wurden zehn Mikrosatellitenmarker untersucht. Die Haplotypen des Markers D14S275 waren bei allen Geschwisterkindern identisch. Alle fünf Geschwister waren homozygot für diesen Haplotyp. Die Haplotypenanalyse auf Chromosom 14 zeigte bei sechs Mikrosatellitenmarkern signifikante Unterschiede zwischen der Allelkonstellation des erkrankten Kindes und der Allelkonstellation der vier gesunden Geschwister. Das erkrankte Kind war bezüglich der Marker D14S283, D14S990, D14S972, D14S64, D14S264 und D14S1032 homozygot, während sowohl die Eltern als auch die gesunden Geschwister entweder heterozygot oder homozygot für ein anderes Allel waren.

#### 3.4.4 Ergebnis der Haplotypenanalyse

Die Haplotypenanalyse auf Chromosom 7 ergab keinen Hinweis für eine mögliche Kopplung, da sich kein Haplotyp des erkrankten Kindes bei nicht mindestens einem gesunden Geschwisterkind wiederfand.

Auf Chromosom 8 zeigte sich nur bei dem Mikrosatellitenmarker D8S1820 ein Unterschied bezüglich der Allelverteilung zwischen dem erkrankten Kind und den nicht erkrankten Geschwistern.

Die Haplotypenanalyse auf Chromosom 14 ergab für sechs Mikrosatellitenmarker (D14S283, D14S990, D14S972, D14S64, D14S264 und D14S1032) einige interessante Unterschiede bei der Allelkonstellation des erkrankten Kindes im Vergleich zu den Haplotypen der vier Geschwister. Der Chromosomenbereich, der durch diese Mikrosatellitenmarker abgedeckt wurde, erstreckte sich von 21.442.117 bp bis 26.211.356 bp auf Chromosom 14.

Eine mögliche Genkopplung auf Chromosom 7 und 8 war unwahrscheinlich, allerdings nicht ausgeschlossen.

Um eine mögliche Kopplungsregion genauer zu definieren, wurde ergänzend eine Kopplungsanalyse der Mikrosatellitenmarker mit MERLIN durchgeführt.

### **3.5 Berechnung der Kopplungswahrscheinlichkeit mit MERLIN**

Im Anschluss an die Haplotypenanalyse wurden die Daten der Genotypisierung für die Kopplungsanalyse mit MERLIN aufgearbeitet, um die Kopplung zu quantifizieren und die Kopplungsregion darüber näher einzugrenzen. Es wurden für jeden Locus vier Dateien erstellt:

1. eine Stammbaumdatei (967-xx.ped) (Tabellen 15 - 17)
2. eine Stammbaum spezifische Parameterdatei (967-xx.dat) (Tabelle 18)
3. eine Kartierungsdatei mit den chromosomalen Positionen jeden Markers (967-xx.map) (Tabelle 19)
4. eine Allelfrequenzdatei mit den Häufigkeiten der untersuchten Markerallele in der Normalbevölkerung (967-xx.fq) (Tabelle 20).

Tabelle 15: Stammbaumdatei zur Kopplungsanalyse am Chromosom 7

967	11	0	0	1	1	x x	x x	x x	x x
967	12	0	0	2	1	x x	x x	x x	x x
967	21	0	0	1	1	x x	x x	x x	x x
967	22	11	12	2	1	x x	x x	x x	x x
967	23	11	12	1	1	x x	x x	x x	x x
967	24	0	0	2	1	x x	x x	x x	x x
967	7	21	22	1	1	249 249	129 141	186 186	124 132
967	8	23	24	2	1	249 253	129 133	186 190	132 124
967	2	7	8	2	1	249 253	129 133	186 190	132 132
967	3	7	8	1	1	249 253	141 129	186 190	132 132
967	4	7	8	2	1	249 253	129 129	186 190	124 124
967	5	7	8	1	1	249 253	129 129	186 190	124 124
967	1	7	8	1	2	249 249	129 129	186 186	132 132

Tabelle 16: Stammbaumdatei zur Kopplungsanalyse am Chromosom 8

967	11	0	0	1	1	x x	x x	x x	x x	x x	x x	x x
967	12	0	0	2	1	x x	x x	x x	x x	x x	x x	x x
967	21	0	0	1	1	x x	x x	x x	x x	x x	x x	x x
967	22	11	12	2	1	x x	x x	x x	x x	x x	x x	x x
967	23	11	12	1	1	x x	x x	x x	x x	x x	x x	x x
967	24	0	0	2	1	x x	x x	x x	x x	x x	x x	x x
967	7	21	22	1	1	221	148	262	104	162	232	103
						239	148	262	98	162	236	111
967	8	23	24	2	1	235	154	264	104	162	230	103
						237	144	264	98	160	232	111
967	2	7	8	2	1	221	148	262	104	162	232	103
						237	154	264	104	160	230	103
967	3	7	8	1	1	221	148	262	104	162	232	103
						237	154	264	104	162	232	111
967	4	7	8	2	1	221	148	262	104	162	232	103
						237	154	264	98	162	232	111
967	5	7	8	1	1	221	148	262	104	162	236	103
						237	154	264	98	162	232	111
967	1	7	8	1	2	221	148	262	104	162	236	111
						237	144	264	104	160	232	111

Tabelle 17: Stammbaumdatei zur Kopplungsanalyse am Chromosom 14

967	11	0	0	1	1	xx									
967	12	0	0	2	1	xx									
967	21	0	0	1	1	xx									
967	22	11	12	2	1	xx									
967	23	11	12	1	1	xx									
967	24	0	0	2	1	xx									
967	7	21	22	1	1	261	101	133	143	205	128	222	270	200	156
						257	101	143	147	201	132	226	270	200	156
967	8	23	24	2	1	267	103	131	143	205	136	222	270	194	152
						257	101	143	147	201	132	226	272	194	156
967	2	7	8	2	1	257	101	133	143	205	132	222	270	200	156
						257	101	131	143	205	132	222	270	194	152
967	3	7	8	1	1	261	101	133	143	205	132	222	270	200	156
						267	103	131	147	205	132	222	270	194	156
967	4	7	8	2	1	261	101	133	143	201	132	222	270	200	156
						257	101	131	143	205	136	222	270	194	156
967	5	7	8	1	1	261	101	133	143	201	132	222	270	200	156
						257	101	131	143	205	136	222	270	194	152
967	1	7	8	1	2	257	101	143	147	201	132	226	270	200	156
						257	101	143	147	201	132	226	272	194	156

**Tabelle 18: Parameterdatei zur Kopplungsanalyse am A) Chromosom 7, B) Chromosom 8, C) Chromosom 14**

A	A	LCA967	B	A	LCA967	C	A	LCA967
	M	D7S629		M	D8S1731		M	D14S72
	M	D7S2493		M	D8S258		M	D14S1023
	M	D7S2525		M	D8S282		M	D14S283
	M	D7S526		M	D8S1734		M	D14S990
				M	D8S1725		M	D14S972
				M	D8S1771		M	D14S64
				M	D8S1820		M	D14S264
							M	D14S1032
							M	D14S275
							M	D14S80

**Tabelle 19: Kartierungsdatei zur Kopplungsanalyse am A) Chromosom 7, B) Chromosom 8, C) Chromosom 14**

A	7	D7S629	22697.078	B	8	D8S173	13780.985	C	1	D14S72	1492.157
					1			4			
	7	D7S249	2477.8583		8	D8S258	18907.500		1	D14S102	1563.201
		3						4	3		
	7	D7S252	2537.9498		8	D8S282	19958.427		1	D14S283	2805.161
		5						4			
	7	D7S526	30830.954		8	D8S173	21339.754		1	D14S990	3703.431
					4			4			
					8	D8S172	23641.673		1	D14S972	4464.891
					5			4			
					8	D8S177	23986.152		1	D14S64	4675.199
					1			4			
					8	D8S182	26543.094		1	D14S264	5394.043
					0			4			
								1	D14S103	6326.397	
								4	2		
								1	D14S275	6812.039	
								4			
								1	D14S80	7840.875	
								4			

Die dritte Spalte gibt die chromosomale Position in Kilobasen an.

Zu jeder Kartierungsdatei wurde eine korrespondierende Datei mit den Allelfrequenzen der gelisteten Mikrosatellitenmarker angelegt. Die Allelfrequenzen wurden der dbSNP-Datenbank am NCBI entnommen. Die Datei hatte das in Tabelle 20 dargestellte Grundformat.

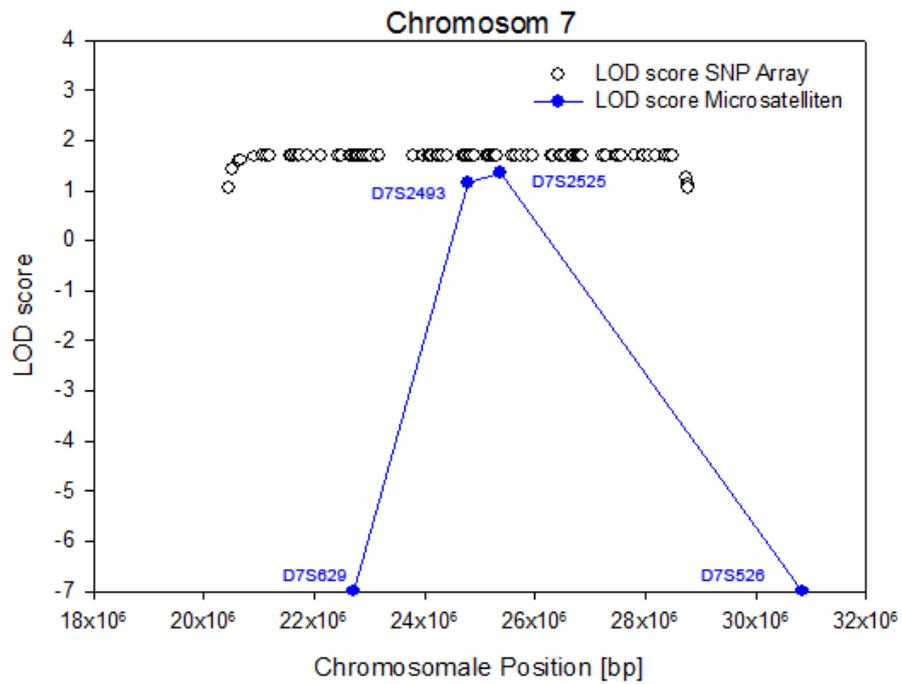
**Tabelle 20: Allelfrequenzdatei**

M	Markername		
A	Allel	1	Allelfrequenz
A	Allel	2	Allelfrequenz
...			
A	Allel	n	Allelfrequenz

Wegen des Umfangs der Dateien wird hier auf eine detaillierte Wiedergabe verzichtet. Letztlich wurde eine Modelldatei angelegt, die die Parameter des Modells für die parametrische Kopplungsanalyse definierte. Diese waren:

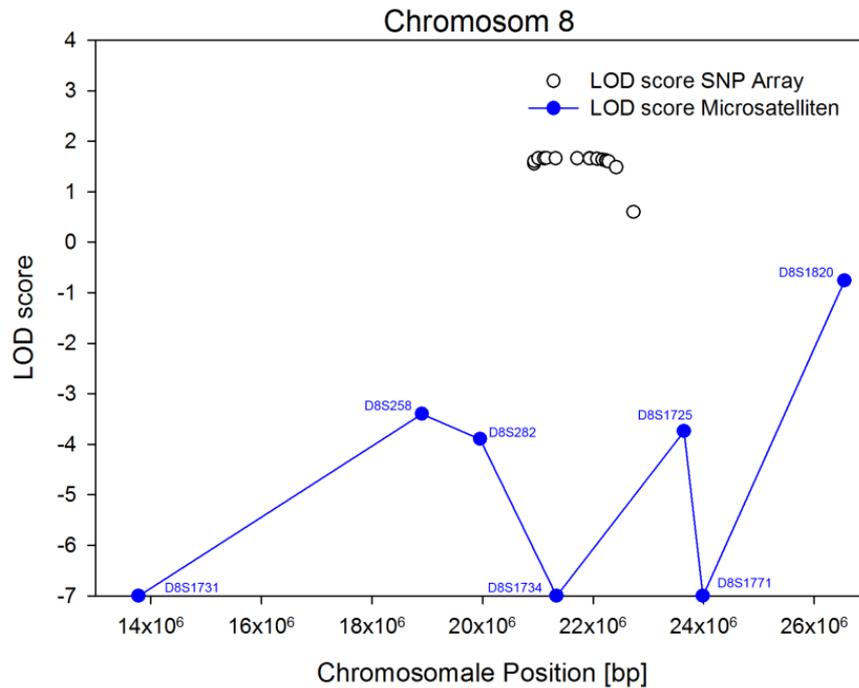
- Prävalenz 1 : 100.000
- Penetranz: vollständig
- Erbgang: autosomal-rezessiv (nur Träger mit zwei mutierten Allelen sind betroffen)

In den Abbildungen 9 – 11 sind die Ergebnisse der Kopplungsanalyse mit den Mikrosatellitenmarkern (blaue Punkte) gegen die Kopplungsanalyse mit den SNP-Markern (schwarze Kreise) als LOD-Scores an einer definierten chromosomalen Position aufgetragen. Alle drei Abbildungen decken eine vergleichbare Chromosomenlänge ab (14 Mbp), um die Größe der Kopplungsbereiche besser vergleichen zu können.



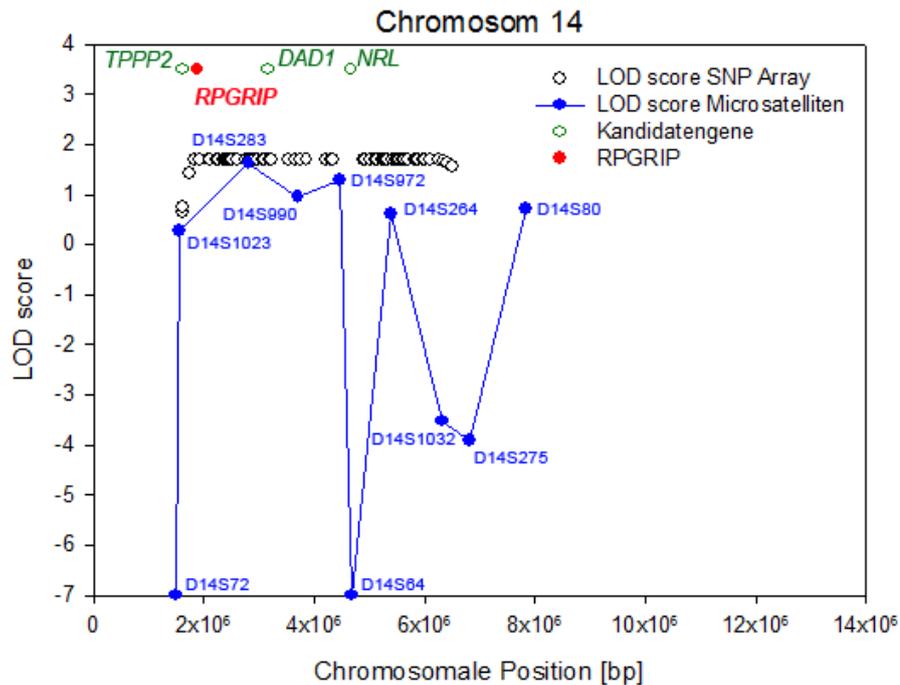
**Abbildung 9: Ergebnisse der Kopplungsanalyse mit den SNP- und Mikrosatellitenmarkern auf Chromosom 7**

Abbildung 9 stellt die Kopplungsdaten für Chromosom 7 dar. Keiner der untersuchten Mikrosatellitenmarker (blaue Punkte) erreichte einen LOD-Score ( $> 3,0$ ), der auf eine signifikante Kopplung in dieser Region hinwies. Die LOD-Scores für D7S2493 und D7S2525 schlossen eine Kopplung nicht grundsätzlich aus. Die Mikrosatellitenmarker D7S829 und D7S526 erzielten einen LOD-Score von  $-\infty$ .



**Abbildung 10: Ergebnisse der Kopplungsanalyse mit den SNP- und Mikrosatellitenmarkern auf Chromosom 8**

Abbildung 10 stellt die Kopplungsdaten für Chromosom 8 dar. Die LOD-Scores für alle Mikrosatellitenmarker (blaue Punkte) schließen eine Kopplung aus. Die Marker D8S1731, D8S1734 und D8S1771 erzielten einen LOD-Score von  $-\infty$ .



**Abbildung 11: Ergebnisse der Kopplungsanalyse mit den SNP- und Mikrosatellitenmarkern auf Chromosom 14**

Abbildung 11 stellt die Kopplungsdaten für Chromosom 14 dar. Keiner der Mikrosatellitenmarker (blaue Punkte) erreichte einen LOD-Score, der eine Kopplung in dieser Region sicher bestätigte. Die LOD-Scores für D14S283, D14S990 und D14S972 schlossen eine Kopplung in der Region nicht grundsätzlich aus. Die Marker D14S72 und D14S64 erzielten einen LOD-Score von  $-\infty$ .

Die Auswertung der Haplotypenanalyse ergab, dass eine Kopplung auf Chromosom 14 am wahrscheinlichsten war. Die Kopplungsanalyse zeigte vergleichbar gute LOD-Scores für verschiedene der Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 7 und 14. Die damit abgedeckte Region auf Chromosom 14 war mit  $> 3$  Mbp deutlich größer als auf Chromosom 7 mit  $> 1$  Mbp. Da aufgrund der Haplotypenanalyse eine Genkopplung auf Chromosom 7 als unwahrscheinlich zu bewerten war, wurde die Region auf Chromosom 14 als Kandidatengenregion definiert.

### 3.6 Evaluation möglicher Kandidatengene auf Chromosom 14

Der über die SNP-Kopplungsanalyse identifizierte und anschließend über die Haplotypen- und Mikrosatellitenmarkeranalyse eingegrenzte Locus auf Chromosom 14 enthielt einschließlich der flankierenden Chromosomenbereiche 294 Gene. Mithilfe des Ensembl Genome Browsers wurde eine Liste dieser Gene erstellt. Anschließend erfolgte eine weitere Eingrenzung nach den in Kapitel 2.10 beschriebenen Kriterien.

In die engere Auswahl kamen Gene beispielsweise aufgrund ihrer Expression im Gehirn oder in der Netzhaut oder ihrer bekannten Funktion in der Netzhaut. Zusätzlich wurden auch Gene mit unbekannter Funktion berücksichtigt, da diese nicht sicher ausgeschlossen werden konnten.

Als Kandidatengene wurden vier Gene in die engere Wahl eingeschlossen: tubulin polymerisation-promoting protein family member 2 (*TPPP2*), retinitis pigmentosa GTPase regulator interacting protein 1 (*RPGRIP1*), defender against cell death 1 (*DAD1*), und neural retina leucine zipper (*NRL*).

**Tabelle 21: Kandidatengene auf Chromosom 14**

Gen	Name	Locus (Position HUREF [bp])	GeneID (NCBI)
<i>TPPP2</i>	Tubulin polymerization-promoting protein family member 2	14q11.2 21030186..21036276bp	122664 [93]
<i>RPGRIP1</i>	Retinitis pigmentosa GTPase regulator interacting protein 1	14q11 21287977..21351301	57096 [92]
<i>DAD1</i>	Defender against cell death 1	14q11.2 22564907..22589237bp	1603 [94]
<i>NRL</i>	Neural retina leucine zipper	14q11.1-11.2 24078693..24114724bp	4901 [95]

### 3.6.1 Tubulin polymerisation-promoting protein family member 2 (*TPPP2*)

Das *TPPP2*-Gen ist auch unter den Namen *P18*, *C14orf8* oder *p25beta* bekannt [93]. Als potentiell Kandidatengene wurde *TPPP2* aufgrund seiner spezifischen Expression im Gehirn ausgewählt. Die Funktion des Gens ist bisher noch nicht vollständig entschlüsselt. Bisher ist nur bekannt, dass *TPPP2* an Tubulin binden kann. Das ebenfalls im Gehirn exprimierte und verwandte *TPPP/p25*-Gen ist an der Bündelung und der Stabilisierung der Mikrotubuli beteiligt. Eine gesteigerte Expression des Gens findet man in Lewy-Körperchen, die für Morbus Parkinson charakteristisch sind [83].

### 3.6.2 Defender against cell death 1 (*DAD1*)

Das *DAD1*-Gen (auch *OST2*) kodiert für eine Untereinheit der Oligosaccharyl-Transferase [94]. Als Kandidatengene wurde *DAD1* aufgrund seiner antiapoptischen Funktion ausgewählt. Daher könnte eine Mutation in diesem Gen zum Absterben der Photorezeptoren führen.

Die Oligosaccharyl-Transferase spielt eine wesentliche Rolle bei der N-Glykosylierung in Eukaryonten [94]. Die N-Glykosylierung findet im glatten endoplasmatischen Retikulum und abschließend im Golgi-Apparat statt. Dieser Prozess besteht aus einer Bindung von Oligosacchariden an die NH<sub>2</sub>-Gruppe des Asparagins [52]. Aufgrund der Expression in Dünndarmtumoren wird diesem Gen eine Rolle bei der Tumorgenese zugeschrieben [48].

### 3.6.3 Retinitis pigmentosa GTPase regulator-interacting Protein (*RPGRIP1*)

Das Gen *RPGRIP1* kodiert für ein Photorezeptor-Protein, das im verbindenden Zilium (engl. connecting cilium, CC) zwischen Photorezeptor-Außensegment und -Innensegment lokalisiert ist. Das RPGRIP-Protein besteht aus einer amino-terminalen Domäne, die über eine coiled-coil Struktur mit der Carboxy-(C)-terminalen Domäne verbunden ist [37]. RPGRIP spielt bei der Entwicklung der Photorezeptoren eine Rolle, wobei die genaue Funktion bis heute nicht geklärt ist. RPGRIP beeinflusst die Zilienbildung und -funktion und ist wahrscheinlich an der Disc-Morphogenese beteiligt [23, 31, 87]. In den Photorezeptoren ist RPGRIP an der Verankerung eines weiteren Photorezeptor-Proteins, des RP GTPase regulator (RPGR) im CC beteiligt [63]. Die CC sind hochspezialisierte Organellen, die für den intraflagellaren Transport (IFT) in den Photorezeptoren zuständig sind und das Außen- mit dem Innensegment verbinden [38].

*RPGRIP1*-Mutationen führen zur Degeneration der Photorezeptor-Außensegmente und zur Dislokation von Opsin-Proteinen in Stäbchen und Zapfen [63]. Mäusen, denen RPGRIP fehlt, weisen vergrößerte Außensegmente der Photorezeptoren auf und sind stärker erkrankt als Mäuse ohne RPGR. Der Verlust beider Photorezeptor-Proteine unterscheidet sich phänotypisch nicht von dem Verlust von RPGRIP alleine. Die C-terminale Domäne von RPGRIP weist Homologien zur entsprechenden Domäne der Aktin-Fragmin-Kinase auf. Dieser Befund ist möglicherweise eine Erklärung dafür, dass RPGRIP nicht nur bei der Zilienentwicklung eine Rolle spielt, sondern auch über die Regulierung des Aktin-Zytoskeletts die Morphologie der Disks der Photorezeptoren beeinflusst [87].

Klinisch äußern sich Mutationen im *RPGRIP1*-Gen in autosomal-rezessiven kongenitalen Dystrophien [92]. Meist handelt es sich um Missense-Mutationen, die in den für die C-terminalen C2-Domänen kodierenden Bereichen lokalisiert sind. An diesem Ende des RPGRIP-Proteins befindet sich auch eine Ca<sup>2+</sup>-Bindungsstelle. Modellversuche legen nahe, dass diese Ca<sup>2+</sup>-Bindungsstelle durch die Missense-Mutationen von *RPGRIP1* zerstört wird. RPGRIP steht in enger Wechselwirkung mit einem weiteren Zilienprotein namens Nephrocystin-4. D. Nephrocystin-4 bindet

spezifisch an die C2-Domäne von RPGRIP. Mutationen des *NPHP4*-Gens sind für Nephronophthosen oder das Senior-Loken Syndrom (SLSN), einer Kombination aus RP und Nierendysplasie, verantwortlich. Die Interaktion von NPHP4 und RPGRIP1 kann durch Mutationen in einem der beiden Gene gestört werden [75].

Eine weitere Wechselwirkung besteht zwischen RPGRIP1 und der Nek4-Serin/Threonin-Kinase. In den Flimmerzellen kommt diese Kinase hauptsächlich in den Basalkörperchen vor und ist Teil sowohl des RPGRIP1- als auch des RPGRIP1L-Protein-Komplexes. Mutationen im *RPGRIP1L*-Gen führen zum Meckel-Gruber oder Joubert-Syndrom. Beides sind schwere Ziliopathien. In einer Studie zur Funktion von RPGRIP1 und RPGRIP1L und zu ihrer Interaktion mit der Nek4-Serin/Threonin-Kinase führte eine verminderte Aktivität der Nek4-Serin/Threonin-Kinase zur Abnahme der Ziliensynthese. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass RPGRIP1 und RPGRIP1L die Funktion der zilienstabilisierenden Nek4-Serin/Threonin-Kinase beeinflussen [13]. Bis heute sind mehr als 70 unterschiedliche *RPGRIP1*-Mutationen bekannt [90]. Hauptsächlich handelt es sich um Basenaustausch-Mutationen in den kodierenden Sequenzen. 2014 wurde erstmals eine homozygote Deletion von Exon 17 in *RPGRIP1* beschrieben [80].

#### 3.6.4 Neural Retina Leucine Zipper (*NRL*)

Das *NRL*-Gen kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der die Entwicklung der Stäbchen steuert [95]. Mutationen dieses Gens wurden bereits bei der autosomal-dominanten und der autosomal-rezessiven RP beschrieben [7, 36]. Bei Betroffenen wird eine stark reduzierte Funktion der Stäbchen diagnostiziert; die Patienten sind seit frühester Kindheit nachtblind. In der Peripherie des Fundus auf der Ebene des RPE lassen sich große, aggregierte Pigmentablagerungen nachweisen [60].

### 3.7 Ergebnis der Kandidatengenanalyse

Bei der DNA-Probe des erkrankten Kindes wurde zunächst die *RPGRIP1*-Sequenz durch SeqLab (Sequence Laboratories, Göttingen) bestimmt, da Mutationen des *RPGRIP1* als Ursache der autosomal-rezessiven LCA bereits beschrieben wurden.

Die Sequenzierung ergab zwei Sequenzveränderungen des *RPGRIP1*-Gens: einen homozygoten c.1111C>T-Austausch in Exon 9, der für eine Nonsense-Mutation (p.R371\*) kodiert und einen heterozygoten Austausch c.3097G>C in Exon 18, der für eine Missense-Mutation (p.Q1033E) kodiert. Die Segregationsanalyse in der Familie des Patienten ergab, dass der c.1111C>T Austausch bei den Eltern und bei dreien der vier nicht betroffenen Geschwister in heterozygotem Zustand vorlag.

## 4 Diskussion

### 4.1 Bewertung des Patientenmaterials

In dieser Arbeit wurden sieben Mitglieder einer Familie mit einem an LCA erkrankten Kind untersucht. Da sowohl beide Eltern als auch die vier Geschwister nicht erkrankt waren, standen ausreichend Referenzproben für eine Kopplungsuntersuchung zur Verfügung, deren Genotypen mit dem Genotyp des Patienten verglichen werden konnten. Da nur DNA-Proben aus zwei Generationen und nur eines Betroffenen zur Verfügung standen, lag der theoretische erreichbare LOD-Score zu niedrig, um mit Hilfe einer Kopplungsanalyse allein das ursächliche Gen eindeutig zu identifizieren.

Phänotypisch zeigte das erkrankte Kind Symptome einer degenerativen Netzhauterkrankung. Aufgrund der Konsanguinität der Eltern war ein Gendefekt als Ursache der Erkrankung wahrscheinlich. Da degenerative Netzhautdegenerationen ein ähnliches klinisches Bild besitzen, war eine genaue Diagnose aufgrund des Phänotyps zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht möglich. Typisch für eine LCA war vor allem das frühe Auftreten der Symptome. Sowohl die Konsanguinität der phänotypisch gesunden Eltern als auch die Tatsache, dass nur eines der fünf Kinder erkrankt war, deutete auf eine autosomal-rezessive Erkrankung hin.

Die klinischen Untersuchungen wurden zudem dadurch erschwert, dass es sich bei dem erkrankten Kind um einen Säugling handelte. Da der Patient seine Beschwerden nicht beschreiben konnte, waren die behandelnden Ärzte bei der Diagnose auf fremdanamnestic Aussagen der Eltern bzw. auf objektive Untersuchungsmethoden angewiesen. Laut Rücksprache mit dem Kinderarzt war eine erneute Untersuchung des Kindes im fortgeschrittenen Alter nicht möglich, da die Familie für weitere Untersuchungen nicht zur Verfügung stand.

### 4.2 Bewertung der Untersuchungstechnik

Da für die Analyse nur die DNA-Proben des betroffenen Kindes, der Eltern und der vier nicht betroffenen Geschwistern und keine DNA-Proben weiterer Generationen zugänglich waren, konnten nur eine begrenzte Anzahl von Meiosen in die LOD-Score-Berechnung mit einfließen. Zudem gab es nur einen Betroffenen in der Familie. Die berechneten LOD-Scores konnten daher nur Hinweise auf mögliche Kopplungsregionen auf Chromosom 7, 8 und 14 liefern.

Die Werte betragen:

- Chromosom 7: LOD-Score 1,8

- Chromosom 8: LOD-Score 1,7
- Chromosom 14: LOD-Score 1,8.

Das initiale Ergebnis der Kopplungsanalyse mit SNP-Markern war als nicht signifikant zu werten, da kein LOD-Score  $> 3$  vorlag.

Ein Nachteil von SNP-Markern ist ihre im Vergleich zu Mikrosatelliten-Markern geringere Heterogenität. Um die potentiellen Kopplungsbereiche genauer eingrenzen zu können, wurden anschließend Kopplungsanalysen mit Mikrosatellitenmarkern durchgeführt.

Zunächst wurden zur Untersuchung der Kandidatenregionen je zehn Mikrosatellitenmarker für die Chromosomen 7, 8 und 14 ausgewählt. Da für Chromosom 7 drei Mikrosatellitenmarker und für Chromosom 8 ein Mikrosatellitenmarker aufgrund einer unzureichenden Qualität der Amplifikation nicht verwendet werden konnten, wurden für Chromosom 7 sieben Mikrosatellitenmarker, für Chromosom 8 neun und für Chromosom 14 zehn Mikrosatellitenmarker typisiert.

Die Anzahl der zur Eingrenzung des Bereichs notwendigen Mikrosatellitenmarker hängt von der Größe der Kandidatenregion und der Qualität der Mikrosatellitenmarker ab. In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst zehn Marker definiert, die die jeweilige Kandidatenregion gleichmäßig abdeckten. Die Anzahl der Mikrosatellitenmarker erwies sich für Chromosom 8 als ausreichend, da die Lage des krankheitsverursachenden Gens auf diesem Chromosom klar ausgeschlossen werden konnte.

Für den zu untersuchenden Bereich auf Chromosom 14 konnte mithilfe der zehn Mikrosatellitenmarker die Kandidatenregion deutlich eingegrenzt werden.

Lediglich für Chromosom 7 war die Anzahl der ausgewählten Mikrosatellitenmarker zu gering, da drei Marker unter den publizierten Bedingungen nicht ausreichend zu amplifizieren waren und drei weitere Marker für die folgende Typisierung keine zusätzlichen Informationen lieferten. Die verbleibenden vier Marker lagen so verteilt, dass eine engere Eingrenzung der Kandidatenregion vorgenommen werden konnte. Ein sicherer Ausschluss konnte nur im direkten Vergleich mit den anderen Kandidatenregionen geführt werden.

Im Laufe der Kopplungsanalyse ergaben sich Schwierigkeiten, die eng im Zusammenhang mit der Konsanguinität der Familie standen. Aufgrund der Verwandtschaft der Eltern bestand nur eine eingeschränkte Heterogenität zwischen den nachweisbaren Allelen der polymorphen Mikrosatellitenmarker (siehe Chromosom 7). Darüber hinaus waren die Eltern für einige Mikrosatellitenmarker zwar heterozygot, trugen aber die gleichen Allel-Kombinationen. Daher ließ sich bei den Kindern häufig nicht nachvollziehen, welches Allel vom Vater bzw. von der Mutter vererbt wurde. Die

Kinder zeigten ebenfalls eine eingeschränkte Variabilität der Mikrosatellitenmarkerallele. Diese sogenannten „nicht-informativen“ Mikrosatellitenmarker erschwerten die Kopplungsanalyse.

Dennoch erwies sich die Nutzung von Mikrosatellitenmarkern im Vergleich zu der Kopplungsanalyse mit SNP-Markern als vorteilhaft, da bei den multiallelen Mikrosatellitenmarkern, trotz der Verwandtschaft Unterschiede zu identifizieren waren. Durch die Kopplungsanalyse mit den Mikrosatellitenmarkern konnte die potentielle Kopplungsregion von ca. 5 Mbp (Ergebnis der SNP-Markeranalyse) auf ca. 3 Mbp eingegrenzt werden.

Aufgrund der rasant fortgeschrittenen Entwicklung neuer Sequenzierungstechnologien ist es aktuell möglich, zahlreiche Sequenzen in einem einzigen Lauf zu bestimmen. NGS-Techniken wurden zunächst in der Genomforschung genutzt. Wegen der hohen Qualität der NGS-Daten können diese Technologien auch in der humangenetischen Diagnostik eingesetzt werden. Durch die erfolgte Automatisierung der Techniken konnten sowohl die Untersuchungskosten als auch der Zeitaufwand deutlich reduziert werden [106]. Die Untersuchungsmethode eignet sich besonders für genotypisch und phänotypisch heterogene Erkrankungen wie die LCA.

Auf der Basis der ständigen Weiterentwicklung der Diagnostik und Forschung auf dem Gebiet der LCA wurden in den letzten Jahren zahlreiche Mutationen als Ursache der Erkrankung identifiziert. In einer Arbeit von Suzuki et al. wurden 2014 mithilfe von zwei Microarrays (Affymetrix resequencing microarrays) 33 Gene sequenziert, die im Zusammenhang mit der LCA, der autosomal-rezessiven RP und der Stargardt disease beschrieben wurden [80]. Differentialdiagnostisch werden durch dieses Verfahren phänotypisch ähnliche Augenerkrankungen mit eingeschlossen.

### 4.3 Bewertung der Kandidatengene

Die Kopplungsanalysen konnten keine eindeutige Kandidatenregion identifizieren. Die Region von 21442117 bp bis 26211356 bp auf Chromosom 14 war die erfolgversprechendste unter den potentiellen Kandidatenregionen, da hier die gekoppelten Mikrosatellitenmarker den größten zusammenhängenden Abschnitt abbildeten. In dieser Region wurden auf der Basis der Expressionsmuster und bekannten Funktionen *TPPP2*, *RPGRIP1*, *DAD1* und *NRL* als potentielle Kandidatengene ausgewählt.

Eine Mutation der Gene *DAD1* und *TPPP2* erschien eher unwahrscheinlich, da diese beiden Gene bisher nicht im Zusammenhang mit Netzhautdegenerationen beschrieben wurden. Dennoch wurde die beiden Gene aufgrund der spezifischen Expression von

*TPPP2* im ZNS bzw. der funktionellen Beteiligung von *DAD1* an der Apoptose mit in die Auswahl aufgenommen. Bei den Genen *RPGRIP1* und *NRL* ist ein Zusammenhang mit degenerativen Netzhauterkrankungen wie LCA oder RP bereits bekannt.

Aufgrund der Ergebnisse der Kopplungsanalyse der Mikrosatellitenmarker war eine Genmutation von *TPPP2* beziehungsweise *NRL* eher unwahrscheinlich. Der Marker D14S72, der auf dem Chromosom in der Nähe des *TPPP2*-Gens lag, erzielte einen LOD-Score von  $-\infty$ . Bei dem Marker D14S64, der im Bereich des *NRL*-Gens lag, betrug der LOD-Score ebenfalls  $-\infty$ . Gänzlich konnte eine Kopplung aber nicht ausgeschlossen werden, da sowohl *TPPP2* als auch *NRL* in der Nähe der Mikrosatellitenmarker D14S283, D14S990 und D14S972 lagen, deren LOD-Scores auf eine potentielle Kopplung hinwiesen.

Aufgrund ihrer Lokalisation war eine Genmutation von *RPGRIP1* oder *DAD1* wahrscheinlicher, weil beide Gene nicht im Randbereich der identifizierten Kopplungsregion, sondern zentral in der Nähe der Mikrosatellitenmarker D14S283, D14S990 und D14S972 lagen, deren LOD-Score auf eine Kopplung hindeutete.

Da bereits Mutationen im *RPGRIP1*-Gen als Ursache der autosomal-rezessiven LCA beschrieben worden waren, wurde dieses Gen als wahrscheinlichster Kandidat eingestuft.

#### 4.4 Die *RPGRIP1*-Mutation

Die Sequenzierung des *RPGRIP1*-Gens ergab bei dem erkrankten Kind einen homozygoten Basenaustausch, der für eine Nonsense-Mutation in Exon 9 kodiert [c.1111C>T (p.R371X)]. Der Austausch lag bei beiden Elternteilen und bei drei von vier Geschwistern im heterozygoten Zustand vor. Zusätzlich wurde ein heterozygoter Basenaustausch in Exon 18 bei dem erkrankten Kind nachgewiesen [c.3097G>C (p.Q1033E)]. Dieser Austausch kodiert für eine Missense-Mutation.

Daher stellte sich die Frage, ob die Erkrankung des betroffenen Kindes durch die homozygote Nonsense-Mutation in Exon 9 oder durch die heterozygote Missense-Mutation in Exon 18 ausgelöst wurde. Der c.1111C>T Basenaustausch ist zwar in der dbSNP des NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) erfasst (rs375859404), allerdings spricht eine Allelfrequenz von 0,0002 gegen einen Polymorphismus. Der c.3097G>C Basenaustausch ist mit einer Allelfrequenz von 0,2953 (rs3748361) deutlich häufiger. Daher ist der c.1111C>T Basenaustausch als ursächlich anzusehen.

Ein weiteres Indiz war die Segregation des c.1111C>T Basenaustausches, der mit den phänotypischen Befunden der Familienmitglieder übereinstimmte, auch wenn kein weiterer Betroffener zur endgültigen Bestätigung herangezogen werden konnte. Bisher

bekannte *RPGRIP1*-Mutationen sind Frameshift-Mutationen (Insertionen, Deletionen), Splice-site-Mutationen, Nonsense-Mutationen in der RPGR-interacting Domäne und Missense-Mutationen in der coiled-coil Domäne [23, 34, 80, 90, 92].

Eine Beziehung zwischen der Art der Mutation und einem bestimmten Phänotyp konnte bisher nicht gezeigt werden [45].

#### 4.5 Aussichten und Nutzen für die Familie

Da es sich bei der Erkrankung des Kindes um einen autosomal-rezessiven Erbgang handelte, waren beide Allele des *RPGRIP1*-Gens von der Mutation betroffen. Damit sind alle potentiellen Nachkommen des Erkrankten heterozygote *RPGRIP1*-Mutationsträger. Der Patient sollte daher eine Heirat in der Familie meiden, weil dann die Wahrscheinlichkeit eine Überträgerin zu ehelichen deutlich erhöht wäre. Die zukünftige Lebenspartnerin sollte sich aber generell genetisch untersuchen lassen, um eine heterozygote und damit phänotypisch unauffällige *RPGRIP1*-Mutation auszuschließen. Eine solche Untersuchung ist vor dem Hintergrund, dass *RPGRIP1*-Mutationen bei bis zu 12,5 % der LCA-Fälle ursächlich sind, von besonderer Bedeutung [24].

Ausgehend von dem Befund, dass nur die homozygote Stopp-Mutation im *RPGRIP1*-Gen eine LCA auslöste, läge die Wahrscheinlichkeit ein erkranktes Kind zu bekommen, bei einer heterozygoten Stopp-Mutation im *RPGRIP1*-Gen der Partnerin, unabhängig vom Geschlecht, bei 50 % (die anderen 50 % wären phänotypisch gesunde Überträger). Bei einer Partnerin ohne Mutation im *RPGRIP1*-Gen wären alle Kinder phänotypisch gesund, aber heterozygote Mutationsträger.

Darüber hinaus sollten auch die heterozygoten Mutationsträger der Familie beraten werden.

Die heterozygote Nonsense-Mutation wird mit einer Wahrscheinlichkeit von 50 % weitervererbt. Sollte der Partner ebenfalls Träger einer Mutation im *RPGRIP1*-Gen sein, bestände die Möglichkeit ein an LCA erkranktes Kind zu bekommen. Zudem sollte eine Aufklärung über das vermehrte Auftreten von erblichen Erkrankungen in konsanguinen Familien stattfinden.

Aktuell ist einer Heilung der LCA noch nicht möglich. Neuere gentherapeutische Ansätze (Kapitel 1.1.7) haben aber gezeigt, dass möglicherweise in Zukunft mutierte krankheitsauslösende Gene ersetzt werden können. Eine erfolgversprechende Therapie für LCA-Patienten mit einer *RPGRIP1*-Mutation ist aber aktuell noch nicht in der Entwicklung.

## 4.6 Ausblick

Die Kopplungsanalyse ist eine altbewährte und effektive Methode zur Identifizierung von ursächlich veränderten Genen bei monogenen Erkrankungen. Die Entwicklung dichter Markerkarten mit einfach zu typisierenden Markern hat dazu beigetragen die Identifikation von ursächlichen Genen zu beschleunigen. Dennoch tritt die Kopplungsanalyse seit der ersten Veröffentlichung des humanen Genoms und der Entwicklung der Hochdurchsatzsequenzierung hinter die direkte Sequenzierung des Exoms oder des gesamten Genoms zurück. Der Vorteil der Hochdurchsatzsequenzierung liegt in der Vielfältigkeit der Daten, die sowohl speziell auf Veränderungen in bekannten ursächlichen Genen für erbliche Netzhauterkrankungen untersucht werden können (Paneldiagnostik), als auch auf Veränderungen in kodierenden Sequenzen des Genoms (Whole Exome Sequencing, WES), die bislang nicht mit erblichen Netzhauterkrankungen assoziiert waren. Die Auswertung der so erhobenen Daten führt in den meisten Fällen bereits bei Einzelpersonen zur ursächlichen Veränderung [24]. So kann inzwischen je nach Form der erblichen Netzhautdystrophie in bis zu 90 % die genetische Ursache trotz der genetischen Heterogenität kostengünstig identifiziert werden.

Letztlich kann die Hochdurchsatzsequenzierung für das gesamte Genom (Whole Genom Sequenzierung, WGS) konfiguriert werden, so dass die Daten auch verwendet werden können, um Kopplungsanalysen zu initiieren, wenn der direkte Zugang zu keinem schlüssigen Ergebnis führt. Immerhin bleiben nach Paneldiagnostik und WES immer noch etwa 10 % der Familien mit erblichen frühkindlichen Netzhauterkrankungen, wo die ursächlichen Veränderungen nicht zu identifizieren sind. Die Kosten für die WGS-gestützte Kopplungsanalyse liegen derzeit allerdings noch höher, als für den in dieser Arbeit gegangenen Weg, sodass eine Kopplungsanalyse über SNP- und Mikrosatellitenmarker nach wie vor in einigen Spezialfällen der Weg der Wahl bleibt.

## 5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Mutation, die in einer siebenköpfigen konsanguinen Familie (Eltern, drei Söhne, zwei Töchter) zur Erkrankung des jüngsten Sohnes an einer Leberschen kongenitalen Amaurose (LCA) geführt hatte, mithilfe einer genomweiten Kopplungsanalyse zu identifizieren.

Durch Single Nucleotide Polymorphism-(SNP)-Kopplungsanalysen wurden mögliche Kopplungsregionen auf Chromosom 7, 8 und 14 identifiziert. Da in der Familie nur ein Kind betroffen war und nur DNA-Proben des Betroffenen, der Geschwister und der Eltern verfügbar waren, konnte nur eine verhältnismäßig geringe Zahl der Meiosen in die Logarithmic Odds Ratio-(LOD)-Score-Berechnung für diese Regionen mit einbezogen werden. Daher wurden diese Bereiche mithilfe von Mikrosatellitenmarker genauer untersucht.

Durch die SNP-Kopplungsanalyse sowie durch die Kopplungs- und Haplotypenanalyse der Mikrosatellitenmarker konnte auf Chromosom 14 ein Kandidatenlocus für den gesuchten Gendefekt eingegrenzt werden.

Die anhand ihres Expressionsmusters bzw. ihrer Funktion ausgewählten Kandidatengene tubulin polymerization-promoting protein family member 2 (*TPPP2*), retinitis pigmentosa GTPase regulator interacting protein 1 (*RPGRIP1*), defender against cell death 1 (*DAD1*) und neural retina leucine zipper (*NRL*) wurden genauer betrachtet. Die Sequenzierung von *RPGRIP1* führte bei dem erkrankten Kind zur Identifizierung zweier bekannter Mutationen. Hierbei handelte es sich um eine homozygote Nonsense-Mutation in Exon 9 (c.1111C>T; p.R371X) und um eine heterozygote Missense-Mutation in Exon 18 (c.3097G>C; p.Q1033E).

Da in der Familie von einem autosomal-rezessiven Erbgang auszugehen war, bestätigte das Segregationsverhalten der Nonsense-Mutation in Exon 9 (beide Eltern und drei Geschwister waren heterozygote Träger, phänotypisch aber gesund) diese als Ursache der Erkrankung.

Die Kopplungsanalyse ist beim Vorliegen eines ausreichend großen Stammbaums und bei der Verfügbarkeit von DNA-Proben der Familienmitglieder eine valide Technik zur Identifikation von krankheitsassoziierten Allelen. Allerdings ist die in der vorliegenden Arbeit verwendete Strategie (SNP- und nachfolgende Mikrosatellitenanalyse) in Zeiten der Hochdurchsatzsequenzierung und des Whole Exom Sequencings (WES) veraltet. Das WES liefert valide Ergebnisse und kann auch beim alleinigen Vorliegen der Patienten-DNA eingesetzt werden. Auch eine kostengünstige Paneldiagnostik, die gezielt Gene mit bekannter Assoziation zu Netzhautdegenerationen untersucht, hat im Fall der LCA eine Nachweisquote von mindestens 80 %.

## 6 Summary

The fundamental idea of this work was to identify the mutation, which inside a seven-headed consanguine family (parents, three sons, two daughters) was the cause of Leber's congenital amaurosis (LCA) disease of the youngest son, using a genome-wide linkage-analysis.

Possible linkage regions were identified through Single nucleotide polymorphism-(SNP)-based linkage-analysis on chromosome 7, 8 and 14.

Because only one child was affected and only the DNA-samples of the affected child, of the siblings and of the parents were available, only a comparatively low number of meioses could be included in the logarithm odds ratio-(LOD)-score calculation. Therefore these regions were tested with a microsatellite marker-based linkage-analysis.

The combination of SNP-based linkage-analysis and microsatellite marker-based haplotype- and linkage-analysis specified a region on chromosome 14 as the candidate locus for the gene defect.

Based on their cell-type specific expression and/or on their function tubulin polymerization-promoting protein family member 2 (*TPPP2*), retinitis pigmentosa GTPase regulator interacting protein 1 (*RPGRIP1*), defender against cell death 1 (*DAD1*) and neural retina leucine zipper (*NRL*) were selected as candidate genes. The sequencing of *RPGRIP1* identified two well-known mutations inside the genome of the affected child: one homozygous nonsense-mutation in exon 9 (c.1111C>T; p.R371X) and one heterozygous missense-mutation in exon 18 (c.3097G>C; p.Q1033E).

Because of the assumption of an autosomal recessive succession inside the family, the segregation of the nonsense-mutation in exon 9 (both parents and three siblings were heterozygous carriers but phenotypic unaffected) confirmed this mutation as the cause of the disease.

The linkage analysis is a valid technology for the identification of disease-related alleles, if an adequate large family-tree and DNA-samples of family-members are available. However the strategy used in this work (an SNP- followed by microsatellite-analysis) is rather outdated in times of high-throughput-sequencing and whole exome sequencing (WES)

The WES provides valid results while being more cost efficient and can be used, if only the DNA of the patient is available. Moreover a cost efficient panel-diagnosis, examining genes with a well-known association to retinal degeneration, shows in case of LCA at least an 80 % detection-rate.

## 7 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Stammbaum der Familie 967 .....	11
<b>Abbildung 2:</b> Verteilung der Marker auf Chromosom 7, 20107333 – 30831019 bp; SNP definierter Bereich: 20198898-28923785 bp .....	26
<b>Abbildung 3:</b> Verteilung der Marker auf Chromosom 8, 13781058 - 26543124 bp; SNP definierter Bereich: 20347695 - 23045446 bp .....	26
<b>Abbildung 4:</b> Verteilung der Marker auf Chromosom 14, 21371146 - 27724479 bp; SNP definierter Bereich: 21452992 – 26740590 bp .....	27
<b>Abbildung 5:</b> Auswertung des Human Mapping 50K Array Xba 240 von Affymetrix mit MERLIN .....	32
<b>Abbildung 6:</b> Stammbaum der Familie 967 mit den Haplotypen der Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 7 .....	36
<b>Abbildung 7:</b> Stammbaum der Familie 967 mit den Haplotypen der Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 8 .....	37
<b>Abbildung 8:</b> Stammbaum der Familie 967 mit den Haplotypen der Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 14 .....	38
<b>Abbildung 9:</b> Ergebnisse der Kopplungsanalyse mit den SNP- und Mikrosatellitenmarkern auf Chromosom 7 .....	44
<b>Abbildung 10:</b> Ergebnisse der Kopplungsanalyse mit den SNP- und Mikrosatellitenmarkern auf Chromosom 8 .....	45
<b>Abbildung 11:</b> Ergebnisse der Kopplungsanalyse mit den SNP- und Mikrosatellitenmarkern auf Chromosom 14 .....	46

## 8 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Bekannte Gene mit ursächlichen Mutationen der LCA.....	4
<b>Tabelle 2:</b> Geräte .....	12
<b>Tabelle 3:</b> Chemikalien .....	13
<b>Tabelle 4:</b> Molekularbiologische Reagenzien.....	13
<b>Tabelle 5:</b> Zusammensetzung des PCR-Standardansatzes .....	16
<b>Tabelle 6:</b> Zusammensetzung eines PCR-Mastermix mit einer Ansatzgröße von 62,5 µl.....	16
<b>Tabelle 7:</b> Temperaturstufen der Gradienten PCR .....	17
<b>Tabelle 8:</b> Parameter der Gradienten PCR.....	17
<b>Tabelle 9:</b> Eingesetzte Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 7 .....	25
<b>Tabelle 10:</b> Eingesetzte Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 8 .....	26
<b>Tabelle 11:</b> Eingesetzte Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 14.....	27
<b>Tabelle 12:</b> Zusammenfassung der klinischen Untersuchungsergebnisse des Patienten .....	31
<b>Tabelle 13:</b> LOD-Scores der Kopplungsanalyse mittels SNP-Marker .....	32
<b>Tabelle 14:</b> Abweichungen der Mastermixzusammensetzung, optimale PCR Temperatur und Annealingzeit für die Amplifikation der Mikrosatellitenmarker	34
<b>Tabelle 15:</b> Stammbaumdatei zur Kopplungsanalyse am Chromosom 7 .....	40
<b>Tabelle 16:</b> Stammbaumdatei zur Kopplungsanalyse am Chromosom 8 .....	40
<b>Tabelle 17:</b> Stammbaumdatei zur Kopplungsanalyse am Chromosom 14 .....	41
<b>Tabelle 18:</b> Parameterdatei zur Kopplungsanalyse am A) Chromosom 7, B) Chromosom 8, C) Chromosom 14 .....	42
<b>Tabelle 19:</b> Kartierungsdatei zur Kopplungsanalyse am A) Chromosom 7, B) Chromosom 8, C) Chromosom 14 .....	42
<b>Tabelle 20:</b> Allelfrequenzdatei.....	43
<b>Tabelle 21:</b> Kandidatengene auf Chromosom 14.....	47

## 9 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
2FSP	Zweifarbenschwellenperimetrie
A	Adenin
AAV-Vektor	Adeno-assoziiertes virales Vektor
<i>ADAMTS1</i>	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 18
<i>AiPL1</i>	Aryl Hydrocarbon Receptor Interacting Protein-Like 1
<i>ALMS1</i>	Alstrom syndrome protein 1
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CC	Connecting cilium
<i>C10RF36</i>	Retinal degeneration 3
<i>CEP290</i>	Centrosomal protein 290kDa
cM	centi-Morgan
<i>CNGA3</i>	Cyclic nucleotide gated channel alpha 3
<i>CRB1</i>	Crumbs family member 1
<i>CRX</i>	Cone rod homeobox
C-terminal	Carboxy-terminal
ddH <sub>2</sub> O	doppeltdestilliertes Wasser
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-Triphosphat
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
DNA	Desoxyribonucleic-acid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EOSRD	Early-Onset Severe Retinal Dystrophie
ERG	Elektroretinogramm
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FAF	Fundusautofluoreszenz
G	Guanin
g	Gramm
<i>GDF6</i>	Growth differentiation factor 6
<i>GUCY2D</i>	Guanylate-cyclase-2D

IFT	intraflagellarer Transport
<i>IMPDH1</i>	Inosine-5'-monophosphate-Dehydrogenase-1
<i>IQCB1</i>	IQ motif containing B1
kb	Kilobase
<i>KCNJ13</i>	Potassium channel, inwardly rectifying subfamily J, member13
LCA	Lebersche kongenitale Amaurose
LOD	Logarithmic Odds Ratio
<i>LRAT</i>	Lecithin retinol acyltransferase
Mbp	Megabasenpaare
MDC	Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine
<i>MERTK</i>	MER proto-oncogene, tyrosine kinase
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimol
mRNA	messenger Ribonucleic-acid
NGS	Next Generation Sequencing
nm	Nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
<i>NPHP4</i>	Nephrocystin-4
<i>NRL</i>	Neural retina leucine zipper
OCT	optische Kohärenztomographie
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase Chain Reaction
<i>PDE6C</i>	Phosphodiesterase 6C, cGMP-specific, cone, alpha prime
pH	potentia hydrogenii
PKU	Phenylketonurie
<i>PRPH2</i>	peripherin 2 (retinal degeneration, slow)
QTL	Quantitative Trait Locus
<i>RDH12</i>	retinol dehydrogenase 12
RP	Retinitis Pigmentosa
RPE	retinales Pigmentepithel
<i>RPE65</i>	Retinal pigment epithelium-specific 65 kDa protein
<i>RPG</i>	RP GTPase regulator
<i>RPGRIP1</i>	Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator Interacting Protein 1
SECORD	Severe Early Childhood Onset Retinal Dystrophy
s	Sekunde(n)
SNP	Single Nucleotide Polymorphism

<i>SPATA7</i>	Spermatogenesis Associated 7
T	Thymin
TBE	TRIS-Borat-EDTA
<i>TPPP2</i>	Tubulin polymerization-promoting protein family member 2
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<i>TULP1</i>	tubby like protein 1
u.a.	unter anderem
w/v	Weight/Volume
WES	Whole Exome Sequencing
WGS	Whole Genom Sequencing
z.B.	zum Beispiel

## 10 Literaturverzeichnis

- [1] Abecasis GR, Cherny SS, Cookson WO, Cardon LR (2002) Merlin-rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. *Nat Genet.* 30:97-101
- [2] Asai-Coakwell M, March L, Dai XH, Duval M, Lopez I, French CR, Famulski J, De Baere E, Francis PJ, Sundaresan P, Sauvé Y, Koenekoop RK, Berry FB, Allison WT, Waskiewicz AJ, Lehmann OJ (2013) Contribution of growth differentiation factor 6-dependent cell survival to early-onset retinal dystrophies. *Hum Mol Genet.* 22:1432-1442
- [3] Augustin, AJ, Collins JF (2001) *Augenheilkunde*. 2. Auflage, Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 389-394
- [4] Azadi S, Molday LL, Molday RS (2010) RD3, the protein associated with Leber congenital amaurosis type 12, is required for guanylate cyclase trafficking in photoreceptor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:21158-21163
- [5] Bainbridge JW, Tan MH, Ali RR (2006) Gene therapy progress and prospects: the eye. *Gene Ther.* 13:1191-1197
- [6] Bellingrath JS, Fischer MD (2015) Gentherapie als Behandlungskonzept für erbliche Netzhauterkrankungen. *Der Ophthalmologe* 112:720-727
- [7] Bessant DA, Payne AM, Mitton KP, Wang QL, Swain PK, Plant C, Bird AC, Zack DJ, Swaroop A, Bhattacharya SS (1999) A mutation in NRL is associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nat Genet.* 21:355-356
- [8] Bowne SJ, Liu Q, Sullivan LS, Zhu J, Spellicy CJ, Rickman CB, Pierce EA, Daiger SP (2006) Why do mutations in the ubiquitously expressed housekeeping gene IMPDH1 cause retina-specific photoreceptor degeneration? *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 47:3754-3765
- [9] Burk A, Burk R (1996) *Checkliste Augenheilkunde*. 3. überarbeitete und erweiterte Auflage, Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 41, 192, 202, 304-305, 365

- [10] Buselmaier WT, Tariverdian G (2006) Humangenetik. 4.Auflage, Heidelberg: Springer Verlag, 6-11, 56-57
- [11] Cideciyan AV, Jacobson SG, Beltran WA, Sumaroka A, Swider M, Iwabe S, Roman AJ, Olivares MB, Schwartz SB, Komáromy AM, Hauswirth WW, Aguirre GD (2013) Human retinal gene therapy for Leber congenital amaurosis shows advancing retinal degeneration despite enduring visual improvement. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110:E517-E525
- [12] Cideciyan AV, Rachel RA, Aleman TS, Swider M, Schwartz SB, Sumaroka A, Roman AJ, Stone EM, Jacobson SG, Swaroop A (2011) Cone photoreceptors are the main targets for gene therapy of NPHP5 (IQCB1) or NPHP6 (CEP290) blindness: generation of an all-cone Nphp6 hypomorph mouse that mimics the human retinal ciliopathy. *Hum Mol Genet.* 20:1411-1423
- [13] Coene KL, Mans DA, Boldt K, Gloeckner CJ, van Reeuwijk J, Bolat E, Roosing S, Letteboer SJ, Peters TA, Cremers FP, Ueffing M, Roepman R (2011) The ciliopathy-associated protein homologs RPGRIP1 and RPGRIP1L are linked to cilium integrity through interaction with Nek4 serine/threonine kinase. *Hum Mol Genet.* 20:3592-3605
- [14] Colella P, Auricchio A (2012) Gene therapy of inherited retinopathies: a long and successful road from viral vectors to patients. *Hum Gene Ther.* 23: 796-807
- [15] Conley SM, Naash MI (2010) Nanoparticles for retinal gene therapy. *Prog Retin Eye Res.* 29:376-397
- [16] Coppieters F, Casteels I, Meire F, De Jaegere S, Hooghe S, van Regemorter N, Van Esch H, Matuleviciene A, Nunes L, Meersschaut V, Walraedt S, Standaert L, Coucke P, Hoeben H, Kroes HY, Vande Walle J, de Ravel T, Leroy BP, De Baere E (2010) Genetic screening of LCA in Belgium: predominance of CEP290 and identification of potential modifier alleles in AHI1 of CEP290-related phenotypes. *Hum Mutat.* 31:E1709-1766
- [17] Cremers FP, van den Hurk JA, den Hollander AI (2002) Molecular genetics of Leber congenital amaurosis. *Hum Mol Genet.* 11:1169-1176
- [18] den Hollander AI, Roepman R, Koenekoop RK, Cremers FP (2008) Leber congenital amaurosis: genes, proteins and disease mechanisms. *Prog Retin Eye Res.* 27:391-419

- [19] den Hollander AI, Heckenlively JR, van den Born LI, de Kok YJ, van der Velde-Visser SD, Kellner U, Jurkles B, van Schooneveld MJ, Blankenagel A, Rohrschneider K, Wissinger B, Cruysberg JR, Deutman AF, Brunner HG, Apfelstedt-Sylla E, Hoyng CB, Cremers FP (2001) Leber congenital amaurosis and retinitis pigmentosa with Coats-like exudative vasculopathy are associated with mutations in the crumbs homologue 1 (CRB1) gene. *Am J Hum Genet.* 69:198-203
- [20] den Hollander AI, Koenekoop RK, Mohamed MD, Arts HH, Boldt K, Towns KV, Sedmak T, Beer M, Nagel-Wolfrum K, McKibbin M, Dharmaraj S, Lopez I, Ivings L, Williams GA, Springell K, Woods CG, Jafri H, Rashid Y, Strom TM, van der Zwaag B, Gosens I, Kersten FF, van Wijk E, Veltman JA, Zonneveld MN, van Beersum SE, Maumenee IH, Wolfrum U, Cheetham ME, Ueffing M, Cremers FP, Inglehearn CF, Roepman R (2007) Mutations in LCA5, encoding the ciliary protein lebercillin, cause Leber congenital amaurosis. *Nat Genet.* 39:889-895
- [21] den Hollander AI, Koenekoop RK, Yzer S, Lopez I, Arends ML, Voeselek KE, Zonneveld MN, Strom TM, Meitinger T, Brunner HG, Hoyng CB, van den Born LI, Rohrschneider K, Cremers FP (2006) Mutations in the CEP290 (NPHP6) gene are a frequent cause of Leber congenital amaurosis. *Am J Hum Genet.* 79:556-561
- [22] Dharmaraj SR, Silva ER, Pina AL, Li YY, Yang JM, Carter CR, Loyer MK, El-Hilali HK, Traboulsi EK, Sundin OK, Zhu DK, Koenekoop RK, Maumenee IH (2000) Mutational analysis and clinical correlation in Leber congenital amaurosis. *Ophthalmic Genet.* 21:135-150
- [23] Dryja TP, Adams SM, Grimsby JL, McGee TL, Hong DH, Li T, Andréasson S, Berson EL (2001) Null RPGRIP1 alleles in patients with Leber congenital amaurosis. *Am J Hum Genet.* 68:1295-1298
- [24] Eisenberger T, Neuhaus C, Khan AO, Decker C, Preising MN, Friedburg C, Bieg A, Gliem M, Charbel Issa P, Holz FG, Baig SM, Hellenbroich Y, Galvez A, Platzer K, Wollnik B, Laddach N, Ghaffari SR, Rafati M, Botzenhart E, Tinschert S, Börger D, Bohring A, Schreml J, Körtge-Jung S, Schell-Apacik C, Bakur K, Al-Aama JY, Neuhann T, Herkenrath P, Nürnberg G, Nürnberg P, Davis JS, Gal A, Bergmann C, Lorenz B, Bolz HJ (2013) Increasing the yield in targeted next-generation sequencing by implicating CNV analysis, non-coding exons and the overall variant load: the example of retinal dystrophies. *PLoS One.* 8:e78496
- [25] Falk MJ, Zhang Q, Nakamaru-Ogiso E, Kannabiran C, Fonseca-Kelly Z, Chakarova C, Audo I, Mackay DS, Zeitz C, Borman AD, Staniszevska M, Shukla

R, Palavalli L, Mohand-Said S, Waseem NH, Jalali S, Perin JC, Place E, Ostrovsky J, Xiao R, Bhattacharya SS, Consugar M, Webster AR, Sahel JA, Moore AT, Berson EL, Liu Q, Gai X, Pierce EA (2012) NMNAT1 mutations cause Leber congenital amaurosis. *Nat.Genet.* 44:1040-1045

[26] Freund CL, Gregory-Evans CY, Furukawa T, Papaioannou M, Looser J, Ploder L, Bellingham J, Ng D, Herbrick JA, Duncan A, Scherer SW, Tsui LC, Loutradis-Anagnostou A, Jacobson SG, Cepko CL, Bhattacharya SS, McInnes RR (1997) Cone-rod dystrophy due to mutations in a novel photoreceptor - specific homeobox gene (CRX) essential for maintenance of the photoreceptor. *Cell* 91:543-553

[27] Freund CL, Wang QL, Chen S, Muskat BL, Wiles CD, Sheffield VC, Jacobson SG, McInnes RR, Zack DJ, Stone EM (1998) De novo mutations in the CRX homeobox gene associated with Leber congenital amaurosis. *Nat Genet.* 18:311-312

[28] Friedman JS, Chang B, Kannabiran C, Chakarova C, Singh HP, Jalali S, Hawes NL, Branham K, Othman M, Filippova E, Thompson DA, Webster AR, Andréasson S, Jacobson SG, Bhattacharya SS, Heckenlively JR, Swaroop A (2006) Premature truncation of an novel protein, RD3, exhibiting subnuclear localization is associated with retinal degeneration. *Am J Hum Genet.* 79:1059-1070

[29] 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. *Nat Genet.* 26:270–271

[30] Gearhart PM, Gearhart C, Thompson DA, Petersen-Jones SM (2010) Improvement of visual performance with intravitreal administration of 9-cis-retinal in Rpe65-mutant dogs. *Arch Ophthalmol.* 128:1442-1448

[31] Gerber S, Perrault I, Hanein S, Barbet F, Ducroq D, Ghazi I, Martin-Coignard D, Leowski C, Homfray T, Dufier JL, Munnich A, Kaplan J, Rozet JM (2001) Complete exon-intron structure of the RPGR-interacting protein (RPGRIP1) gene allows the identification of mutations underlying Leber congenital amaurosis. *Eur J Hum Genet.* 9:561-571

[32] Gregory-Evans K, Kelsell RE, Gregory-Evans CY, Downes SM, Fitzke FW, Holder GE, Simunovic M, Mollon JD, Taylor R, Hunt DM, Bird AC, Moore AT (2000) Autosomal dominant cone-rod retinal dystrophy (CORD6) from heterozygous

mutation of GUCY2D, which encodes retinal guanylate cyclase. *Ophthalmology*. 107:55-61

[33] Hagstrom SA, North MA, Nishina PL, Berson EL, Dryja TP (1998) Recessive mutations in the gene encoding the tubby-like protein TULP1 in the patients with retinitis pigmentosa. *Nat Genet*. 18:174-176

[34] Hanein S, Perrault I, Gerber S, Tanguy G, Barbet F, Ducroq D, Calvas P, Dollfus H, Hamel C, Lopponen T, Munier F, Santos L, Shalev S, Zafeiriou D, Dufier JL, Munnich A, Rozet JM, Kaplan J (2004) Leber congenital amaurosis: comprehensive survey of the genetic heterogeneity, refinement of the clinical definition, and genotype-phenotype correlations as a strategy for molecular diagnosis. *Hum Mutat*. 23:306-317

[35] Heckenlively JR, Yoser SL, Friedman LH, Oversier JJ (1988) Clinical Findings and common symptoms in retinitis pigmentosa. *Am J Ophthalmol*. 105:504-511

[36] Hernan I, Gamundi MJ, Borràs E, Maseras M, García-Sandoval B, Blanco-Kelly F, Ayuso C, Carballo M (2012) Novel p.M96T variant of NRL and shRNA-based suppression and replacement of NRL mutants associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Clin Genet*. 82:446-452

[37] Hong DH, Yue G, Adamian M, Li T (2001) Retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR)-interacting protein is stably associated with the photoreceptor ciliary axoneme and anchors RPGR to the connecting cilium. *J Biol Chem*. 276:12091-12099

[38] Hosch J, Lorenz B, Stieger K (2010) RPGR: Role in the photoreceptor cilium, human retinal disease, and gene therapy. *Ophthalmic Genet*. 32:1-11

[39] Jacobson SG, Cideciyan AV, Roman AJ, Sumaroka A, Schwartz SB, Heon E, Hauswirth WW (2015). Improvement and decline in vision with gene therapy in childhood blindness. *N Engl J Med*. 372:1920-1926

[40] Jacobson SG, Cideciyan AV, Huang Y, Hanna DB, Freund CL, Affatigato LM, Carr RE, Zack DJ, Stone EM, McInnes RR (1998) Renital degenerations with truncation mutations in the cone-rod homeobox (CRX) gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 39:2417-2426

[41] Jacobson SG, Cideciyan AV, Aleman TS, Pianta MJ, Sumaroka A, Schwartz SB, Smilko EE, Milam AH, Sheffield VC, Stone EM (2003) Crumbs homolog 1

(CRB1) mutations result in a thick human retina with abnormal lamination. *Hum Mol Genet.* 12:1073-1078

[42] Janecke AR, Thompson DA, Utermann G, Becker C, Hübner CA, Schmid E, McHenry CL, Nair AR, Rüschemdorf F, Heckenlively J, Wissinger B, Nürnberg P, Gal A (2004) Mutations in RDH12 encoding a photoreceptor cell retinol dehydrogenase cause childhood-onset severe retinal dystrophy. *Nat Genet.* 36:850-854

[43] Jo DH, Lee TG, Kim JH (2011) Nanotechnology and nanotoxicology in retinopathy. *Int J Mol Sci.* 12:8288-8301

[44] Johnson CJ, Berglin L, Chrenek MA, Redmond TM, Boatright JH, Nickerson JM (2008) Technical brief: subretinal injection and electroporation into adult mouse eyes. *Mol Vis.* 14:2211-2226

[45] Khan AO, Abu-Safieh L, Eisenberger T, Bolz HJ, Alkuraya FS (2013) The RPGRIP1-related retinal phenotype in children. *Br J Ophthalmol* 97:760-764

[46] Knippers R (2006) *Molekulare Genetik.* 9. Auflage, Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 312-314, 505-514

[47] Koenekoop RK, Sui R, Sallum J, van den Born LI, Ajlan R, Khan A, den Hollander AI, Cremers FP, Mendola JD, Bittner AK, Dagnelie G, Schuchard RA, Saperstein DA (2014) Oral 9-cis retinoid for childhood blindness due to Leber congenital amaurosis caused by RPE65 or LRAT mutations: an open-label phase 1b trial. *Lancet* 384:1513-1520

[48] Kulke MH, Freed E, Chiang DY, Philips J, Zahrieh D, Glickman JN, Shivdasani RA (2008) High-resolution analysis of genetic alterations in small bowel carcinoid tumors reveals areas of recurrent amplification and loss. *Genes Chromosomes Cancer.* 47:591-603

[49] Lakowski J, Baron M, Bainbridge J, Barber AC, Pearson RA, Ali RR, Sowden JC (2010) Cone and rod photoreceptor transplantation in models of the retinopathy Leber congenital amaurosis using flow-sorted Crx-positive donor cells. *Hum Mol Genet.* 19:4545-4559

[50] Leber T (1869) Über Retinitis pigmentosa und angeborene Amaurose. *Albrecht von Graefes Arch Ophthalmol.* 15:1-25

- [51] Leber T (1871) Über anormale Formen der Retinitis pigmentosa. Albrecht von Graefes Arch Ophthalmol. 17:314-341
- [52] Lewin B (1998) Molekularbiologie der Gene. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 59, 173-174, 831-834
- [53] Lorenz B, Preising M (2003) Frühkindliche schwere Netzhautdystrophien. Aktuelle Aspekte zur Leberschen kongenitalen Amaurose. Zeitschrift für praktische Augenheilkunde & augenärztliche Fortbildung. 24:367-372
- [54] Lorenz B, Gyürüs P, Preising M, Bremser D, Gu S, Andrassi M, Gerth C, Gal A (2000) Early-onset severe rod-cone dystrophy in young children with RPE65 mutations. Invest Ophthalmol Vis Sci 41:2735-2742
- [55] Lorenz B, Wabbels B, Wegscheider E, Hamel CP, Drexler W, Preising MN (2004) Lack of fundus autofluorescence to 488 nanometers from childhood on in patients with early-onset severe retinal dystrophie associated with mutations ins RPE65. Ophthalmology 111:1585-1594
- [56] Lottspeich FE, Engels JW (2006) Bioanalytik. 2. Auflage, München: Spektrum Akademischer Verlag, 952
- [57] Louis Jeune V, Joergensen JA, Hajjar RJ, Weber T (2013). Pre-existing anti-adenovirus-associated virus antibodies as a challenge in AAV gene therapy. Hum Gene Ther Methods 24:59-67
- [58] Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, Pugh EN Jr, Mingozzi F, Bennicelli J, Banfi S, Marshall KA, Testa F, Surace EM, Rossi S, Lyubarsky A, Arruda VR, Konkle B, Stone E, Sun J, Jacobs J, Dell'Osso L, Hertle R, Ma JX, Redmond TM, Zhu X, Hauck B, Zelenia O, Shindler KS, Maguire MG, Wright JF, Volpe NJ, McDonnell JW, Auricchio A, High KA, Bennett J (2008). Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital. N Engl J Med 358:2240-2248
- [59] Marlhens F, Bareil C, Griffoin JM, Zrenner E, Amalric P, Eliaou C, Liu SY, Harris E, Redmond TM, Arnaud B, Claustres M, Hamel CP (1997) Mutations in RPE65 cause Leber's congenital amaurosis. Nat Genet. 17:139-141
- [60] Nishiguchi KM, Friedman JS, Sandberg MA, Swaroop A, Berson EL, Dryja TP (2004) Recessive NRL mutations in patients with clumped pigmentary retinal degeneration and relative preservation of blue cone function. Proc Natl Acad Sci U S A. 101:17819-17824

- [61] Papon JF, Perrault I, Coste A, Louis B, Gérard X, Hanein S, Fares-Taie L, Gerber S, Defoort-Dhellemmes S, Vojtek AM, Kaplan J, Rozet JM, Escudier E (2010). Abnormal respiratory cilia in non-syndromic Leber congenital amaurosis with CEP290 mutations. *J Med Genet.* 47:829-834
- [62] Paunescu K, Preising MN, Friedburg C, Rosenberg T, Lorenz B (2006) Variation of phenotype in patients with compound heterozygous mutations of *RetGC1* depending on the affected domains. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 47:5802
- [63] Pawlyk BS, Smith AJ, Buch PK, Adamian M, Hong DH, Sandberg MA, Ali RR, Li T (2005). Gene replacement therapy rescues photoreceptor degeneration in a murine model of Leber congenital amaurosis lacking RPGRIP. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46:3039-3045
- [64] Peluso I, Conte I, Testa F, Dharmalingam G, Pizzo M, Collin RW, Meola N, Barbato S, Mutarelli M, Ziviello C, Barbarulo AM, Nigro V, Melone MA; European Retinal Disease Consortium, Simonelli F, Banfi S (2013). The *ADAMTS18* gene is responsible for autosomal recessive early onset severe retinal dystrophy. *Orphanet J Rare Dis.* 8:16
- [65] Perrault I, Hanein S, Gerber S, Barbet F, Dufier JL, Munnich A, Rozet JM, Kaplan J (2003) Evidence of autosomal dominant Leber congenital amaurosis (LCA) underlain by a *CRX* heterozygous null allele. *J Med Genet.* 40: e90
- [66] Perrault I, Hanein S, Gerber S, Barbet F, Ducroq D, Dollfus H, Hamel C, Dufier JL, Munnich A, Kaplan J, Rozet JM (2004) Retinal Dehydrogenase 12 /*RDH12* mutations in Leber congenital amaurosis. *Am J Hum Genet.* 75:639-646
- [67] Perrault I, Rozet JM, Gerber S, Kelsell RE, Souied E, Cabot A, Hunt DM, Munnich A, Kaplan J (1998) A *retGC-1* mutation in autosomal dominant cone-rod dystrophy. *Am J Hum Genet.* 63:651-654
- [68] Perrault, I. Hanein S, Gerard X, Delphin N, Fares-Taie L, Gerber S, Pelletier V, Mercé E, Dollfus H, Puech B, Defoort-Dhellemmes S, Petersen MD, Zafeiriou D, Munnich A, Kaplan J, Roche O, Rozet JM (2010) Spectrum of *SPATA7* mutations in Leber congenital amaurosis and delineation of the associated phenotype. *Hum Mutat.* 31E1241-E1250
- [69] Perrault I, Rozet JM, Ghazi I, Leowski C, Bonnemaïson M, Gerber S, Ducroq D, Cabot A, Souied E, Dufier JL, Munnich A, Kaplan J (1999) Different functional

outcome of RetGC1 and RPE65 gene mutations in Leber congenital amaurosis. *Am J Hum Genet* 64: 1225-1228

[70] Poeggel G, Hammelehle R (2005) *Kurzlehrbuch Biologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag

[71] Preising MN, Paunescu K, Friedburg C, Lorenz B (2007) Genetische und klinische Heterogenität bei LCA-Patienten: Das Ende der Einheitlichkeit. *Der Ophthalmologe*. 104:490-498

[72] Preising, MN, Rosenberg, T., Kellner, U., Meschede, D., Brauer, U., Lorenz, B. (2001). Mutation Screening of RetGC1 and RPE65 in Patients with LCA and RP. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42:644

[73] Read A, Donnai D (2008). *Angewandte Humangenetik*. 1. Auflage, Berlin, New York: Walter de Gruyter, 13-17, 90-91, 234, 228-229, 317-319

[74] Robert B.H. , Ahmed ZM, Corrêa ZM, Sisk RA (2012) Gene therapy for Leber congenital amaurosis: advances and future directions. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 250:1117-1128

[75] Roepman R, Letteboer SJ, Arts HH, van Beersum SE, Lu X, Krieger E, Ferreira PA, Cremers FP (2005) Interaction of nephrocystin-4 and RPGRIP1 is disrupted by nephronophthisis or Leber congenital amaurosis-associated mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:18520-18525

[76] Sergouniotis PI, Davidson AE, Mackay DS, Li Z, Yang X, Plagnol V, Moore AT, Webster AR (2011) Recessive mutations in KCNJ13, encoding an inwardly rectifying potassium channel subunit, cause leber congenital amaurosis. *Am J Hum Genet*. 89:183-190

[77] Sohocki MM, Bowne SJ, Sullivan LS, Blackshaw S, Cepko CL, Payne AM, Bhattacharya SS, Khaliq S, Qasim Mehdi S, Birch DG, Harrison WR, Elder FF, Heckenlively JR, Daiger SP (2000) Mutations in a new photoreceptor-pineal gene on 17p cause Leber congenital amaurosis. *Nat Genet*. 24:79-83

[78] Sohocki MM, Perrault I, Leroy BP, Payne AM, Dharmaraj S, Bhattacharya SS, Kaplan J, Maumenee IH, Koenekoop R, Meire FM, Birch DG, Heckenlively JR, Daiger SP (2000) Prevalence of AIPL1 mutations in inherited retinal degenerative disease. *Mol Genet Metab*. 70:142-150

- [79] Stein L, Roy K, Lei L, Kaushal S (2011) Clinical gene therapy for the treatment of RPE65-associated Leber congenital amaurosis. *Expert Opin Biol Ther.* 11:429-439
- [80] Suzuki T, Fujimaki T, Yanagawa A, Arai E, Fujiki K, Wada Y, Murakami A (2014) A novel exon 17 deletion mutation of RPGRIP1 gene in two siblings with Leber congenital amaurosis. *Jpn J Ophthalmol.* 58:528-535
- [81] Swaroop A, Wang QL, Wu W, Cook J, Coats C, Xu S, Chen S, Zack DJ, Sieving PA (1999) Leber congenital amaurosis caused by a homozygous mutation (R90W) in the homeodomain of the retinal transcription factor CRX: direct evidence for the involvement of CRX in the development of photoreceptor function. *Hum Mol Genet.* 8:299-305
- [82] 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
- [83] Tirian L, Hlavanda E, Oláh J, Horváth I, Orosz F, Szabó B, Kovács J, Szabad J, Ovádi J (2003) TPPP/p25 promotes tubulin assemblies and blocks mitotic spindle formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:13976-13981
- [84] von Rückmann A, Fitzke FW, Bird AC (1997) Fundus autofluorescence in age-related macular disease imaged with a laser scanning ophthalmoscope. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 38:478-486
- [85] Wang X, Wang H, Sun V, Tuan HF, Keser V, Wang K, Ren H, Lopez I, Zaneveld JE, Siddiqui S, Bowles S, Khan A, Salvo J, Jacobson SG, Iannaccone A, Wang F, Birch D, Heckenlively JR, Fishman GA, Traboulsi EI, Li Y, Wheaton D, Koenekoop RK, Chen R (2013) Comprehensive molecular diagnosis of 179 Leber congenital amaurosis and juvenile retinitis pigmentosa patients by targeted next generation sequencing. *J Med Genet.* 50:674-688
- [86] Wang X, Wang H, Cao M, Li Z, Chen X, Patenia C, Gore A, Abboud EB, Al-Rajhi AA, Lewis RA, Lupski JR, Mardon G, Zhang K, Muzny D, Gibbs RA, Chen R (2011) Whole-exome sequencing identifies ALMS1, IQCB1, CNGA3, and MYO7A mutations in patients with Leber congenital amaurosis. *Hum Mutat.* 32:1450-1459
- [87] Zhao Y, Hong DH, Pawlyk B, Yue G, Adamian M, Grynberg M, Godzik A, Li T (2003) The retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR)- interacting protein:

subserving RPGR function and participating in disk morphogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 100:3965-3970

[88]

[http://campus.doccheck.com/uploads/tx\\_dcmestudscripts/7260\\_agarosegel\\_elektrophorese\\_folien\\_.pdf](http://campus.doccheck.com/uploads/tx_dcmestudscripts/7260_agarosegel_elektrophorese_folien_.pdf) (abgerufen am 29. 04.2010)

[89]

[http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/5/bc/vlus/gentechnik/prak\\_dna\\_isolierung.vlu/Page/vsc/de/ch/5/bc/gentechnik/methoden/reinheit\\_ns/reinheit\\_ns.vscml.html](http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/5/bc/vlus/gentechnik/prak_dna_isolierung.vlu/Page/vsc/de/ch/5/bc/gentechnik/methoden/reinheit_ns/reinheit_ns.vscml.html) (abgerufen am 29.04.2010)

[90]

<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=RPGRIP1> (abgerufen am 29.10.2015)

[91]

<http://www.laborpraxis.vogel.de/analytik/bioanalytik/elektrophorese/articles/121197>. (abgerufen am 21.05.2010)

[92]

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?taxid=9606&chr=14|HuRef&MAPS=ugHs,genes-r&cmd=focus&fill=40&query=uid%2816330499%29&QSTR=RPGRIP> (abgerufen am 05.05.2010)

[93]

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=retrieve&dopt=full\\_report&list\\_uids=122664](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=122664) (abgerufen am 05.05.2010)

[94]

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=retrieve&dopt=full\\_report&list\\_uids=1603](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=1603) (abgerufen am 05.05.2010)

[95]

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=retrieve&dopt=full\\_report&list\\_uids=4901](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=4901) (abgerufen am 05.05.2010)

[96]

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=10483315](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=10483315) (abgerufen am 12.04.2014)

[97]

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=1952517](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=1952517) (abgerufen am 12.04.2014)

[98]

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=2390287](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=2390287) (abgerufen am 12.04.2014)

[99]

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=719675](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=719675) (abgerufen am 12.04.2014)

[100]

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=7816898](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=7816898) (abgerufen am 12.04.2014)

[101]

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=9314269](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=9314269) (abgerufen am 12.04.2014)

[102]

[http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease\\_Search.php?lng=EN&data\\_id=22365&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseGroup=Severe-early-childhood-onset-retinal-dystrophy&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseType=Pat&Disease%28s%29/group%20of%20diseases=Severe-early-childhood-onset-retinal-dystrophy&title=Severe-early-childhood-onset-retinal-dystrophy&search=Disease\\_Search\\_Simple](http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=EN&data_id=22365&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=Severe-early-childhood-onset-retinal-dystrophy&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Disease%28s%29/group%20of%20diseases=Severe-early-childhood-onset-retinal-dystrophy&title=Severe-early-childhood-onset-retinal-dystrophy&search=Disease_Search_Simple) (abgerufen am 10.11.2015)

[103]

[http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease\\_Search.php?lng=EN&data\\_id=3243&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseGroup=Leber-congenital-amaurosis&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseType=Pat&Disease%28s%29/group%20of%20diseases=Leber-congenital-amaurosis&title=Leber-congenital-amaurosis&search=Disease\\_Search\\_Simple](http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=EN&data_id=3243&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=Leber-congenital-amaurosis&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Disease%28s%29/group%20of%20diseases=Leber-congenital-amaurosis&title=Leber-congenital-amaurosis&search=Disease_Search_Simple) (abgerufen am 10.11.2015)

[104]

<http://www.sph.umich.edu/csg/abecasis/merlin/tour/parametric.html> (abgerufen am 22.05.2010)

[105]

[http://www.zmb.uni-kiel.de/institute/imis/genet\\_epidem](http://www.zmb.uni-kiel.de/institute/imis/genet_epidem) (abgerufen am 21.05.2010)

[106]

[https://www.genetikum.de/de/genetikum/Aktuell/meldungen\\_detail.php?oid=254&dtl=Diagnostik+mit+Gen-Panels+am+genetikum](https://www.genetikum.de/de/genetikum/Aktuell/meldungen_detail.php?oid=254&dtl=Diagnostik+mit+Gen-Panels+am+genetikum) (abgerufen am 31.10.2015)

## 11 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## 12 Danksagung

Ein großer Dank gilt Herrn PD Dr. rer. medic. Markus Preising für die Stellung des Themas und stetige Unterstützung, Hilfsbereitschaft und Betreuung während der gesamten Zeit.

Ich danke Frau Prof. Dr. med. Birgit Lorenz für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Materialien.

Ich danke meinem Ehemann Marc, der mich immer wieder aufs Neue motiviert hat und mir auch in schwierigen Momenten zur Seite stand.

Ich danke meinem Bruder Martin und meiner lieben Freundin Annika für ihre Hilfe.

Zuletzt danke ich meinen Eltern, die mir durch ihre Unterstützung ein erfolgreiches Studium ermöglicht haben.