

Untersuchungen zur Expression des *CHM*-Gens
in immortalisierten Lymphoblastoidzellen
von Patienten und Konduktorinnen mit Sequenzvariationen im *CHM*-Gen

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

vorgelegt von

Nayyir Alavi
aus Hanau

Gießen 2025

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Aus der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde

Gutachter: PD Dr. Markus Preising

Gutachter: Prof. Dr. Peter Jedlicka

Tag der Disputation: 18.06.2026

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Aufbau des Auges	1
1.1.1	Aufbau der Netzhaut und Aderhaut	1
1.2	Chorioideremie	3
1.2.1	Geschichte	3
1.2.2	Klinik und Diagnostik	3
1.2.3	Differentialdiagnosen	5
1.3	Therapieansätze	6
1.4	Funktionen des REP 1 Gens	7
1.5	Sequenzvariationen im REP 1 Gen	9
1.6	Lyonisierung	10
1.6.1	Ausprägung der Chorioideremie bei Konduktorinnen für <i>CHM</i> -Sequenzvariation	10
1.7	Zielsetzung dieser Arbeit	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Methodischer Überblick	12
2.2	Patienten	12
2.3	Geräte und Verbrauchsmaterialien	14
2.4	Molekularbiologische Methoden	16
2.4.1	Gewinnung der Zellen	16
2.4.2	Anzüchten der Zellkulturen	16
2.4.3	Isolierung der RNA mittels QIAamp RNA Blood Mini Kit	16
2.4.4	Messung der RNA Konzentration	17
2.4.5	Polymerasekettenreaktion	17
2.4.6	Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)	18
2.4.7	Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)	18
2.4.8	Die $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode	20
2.4.9	Komponenten eines PCR-Ansatzes	20
2.4.10	Agarose Gel Elektrophorese	22

Inhaltsverzeichnis

3	Ergebnisse	24
3.1	Kultivierung der humanen Lymphozyten und RNA-Extraktion	24
3.2	Quantitative RT-PCR.....	24
3.3	Agarose Gel-Elektrophorese	29
4	Diskussion.....	30
4.1	Interpretation der Ergebnisse der RT-PCR.....	30
4.2	Allgemeine Interpretation der Ergebnisse	31
4.3	Ausblick.....	35
5	Zusammenfassung.....	37
6	Summary.....	38
7	Literaturverzeichnis	39
8	Abbildungsverzeichnis.....	45
9	Tabellenverzeichnis.....	46
10	Ehrenwörtliche Erklärung.....	47
11	Lebenslauf	48
12	Danksagung	49

1. Einleitung

1.1 Aufbau des Auges

Das menschliche Auge entspricht im Aufbau denen der meisten anderen Säugetiere. Es entsteht embryologisch aus dem Augenbecher und besteht aus drei Gefäßhäuten.

Die äußere Gefäßhaut (Tunica fibrosa bulbi oder Tunica externa bulbi) besteht aus der Sklera (Lederhaut) und der Cornea (Hornhaut). Die Uvea (Tunica vasculosa bulbi bzw. Tunica media bulbi) oder mittlere Augenhaut besteht aus der Iris (Regenbogenhaut), dem Corpus ciliare (Ziliarkörper) sowie der Choroidea (Aderhaut). Die innere Augenhaut oder Retina (Tunica interna bulbi) teilt sich weiter ein in die Pars optica retinae sowie die Pars caeca retinae. Des Weiteren schließt sich an die Retina nach innen der Glaskörper an, welcher dem Auge seine Form gibt und Stabilität verleiht. Die Linse befindet sich hinter der Iris und wird für die Fokussierung des Lichtes benötigt, um ein scharfes Bild auf der Netzhaut zu erzeugen. Der Bulbus ist in die Orbita eingebettet und wird durch eine Fettschicht gepolstert. [1]

1.1.1 Aufbau der Netzhaut und Aderhaut

Den Übergang der Netzhaut zum Glaskörper bildet die Membrana limitans interna (engl.: internal limiting membrane = ILM), welche von der Basalmembran der Müllerzellen gebildet wird und aus Kollagenfibrillen sowie Mukopolysacchariden besteht und der Netzhaut aufliegt. (siehe Abbildung 1.1) Die Netzhaut (Retina) besteht in seiner innersten Schicht aus der Nervenfaserschicht (engl. nerve fiber layer = NFL), welche durch die Axone der darunter befindlichen Ganglienzellen gebildet wird. Diese Axone führen zur Papille und bilden mit über 1,2 Mio Nervenfasern den Sehnerven. Die Zellkerne der Ganglienzellen bilden die Ganglienzellschicht (engl. ganglion cell layer = GCL), welche bei der Verarbeitung des Sehprozesses das dritte Neuron bilden. Die innere plexiforme Schicht (engl. inner plexiform = IPL) wird aus den Synapsen zwischen den Dendriten der Ganglienzellen und den Axonen der Bipolarzellen gebildet. Darauf folgt die innere nukleäre Schicht (engl. inner nuclear layer = INL), welche aus den Zellkernen der Bipolar-, Horizontal- sowie der Amakrinenzellen besteht. In der äußeren plexiformen Schicht (engl. outer plexiform layer = OPL) finden sich die Axone der Photorezeptoren sowie die Dendriten des zweiten Neurons der Sehbahn (Bipolarzellen). Die äußere nukleäre Schicht (engl. outer nuclear layer = ONL) wird durch die Zellkerne der Photorezeptoren gebildet. Im Anschluss an die ONL befindet sich die Membrana limitans externa (ELM), welche aus einer siebartigen Platte aus Gliafortsätzen der Müllerzellen besteht und von den Photorezeptoren durchbrochen wird. Diese Photorezeptoren (Stäbchen und Zapfen) bilden mit ihren Innen- sowie Außensegmenten die Photorezeptorschicht (engl. inner segment/outer segment = IS/OS). Das retinale Pigmentepithel (engl. retinal pigment epithelium

Einleitung

= RPE) bildet den Abschluss der Retina und besteht aus stark pigmentiertem einschichtig-kubischem Epithel. Die Bruch-Membran trennt schließlich die Netzhaut von der Aderhaut. [1] [2] Die Aderhaut (Choroidea), welche der mittleren Augenhaut oder Uvea zugeordnet wird, befindet sich zwischen der Retina und der Sklera. Sie versorgt die äußere Netzhautschicht mit Blut, bildet die äußere Blut-Retina-Schranke, dient der Regulierung der Temperatur und kann grob in vier Schichten eingeteilt werden. Die innerste Schicht, Lamina basilaris oder Bruch-Membran, grenzt direkt an das retinale Pigmentepithel und besteht aus insgesamt fünf Schichten. Die darauffolgende Schicht - Choriokapillaris oder Lamina choriokapillaris - besteht aus einem Gefäßgeflecht mit gefensterten Kapillaren. Die Lamina vasculosa mit ihren großen Arterien und Venen bildet die nächste Schicht. Die Lamina suprachoroidea, grenzt an die Sklera und besteht aus elastischem Bindegewebe. [3] [1]

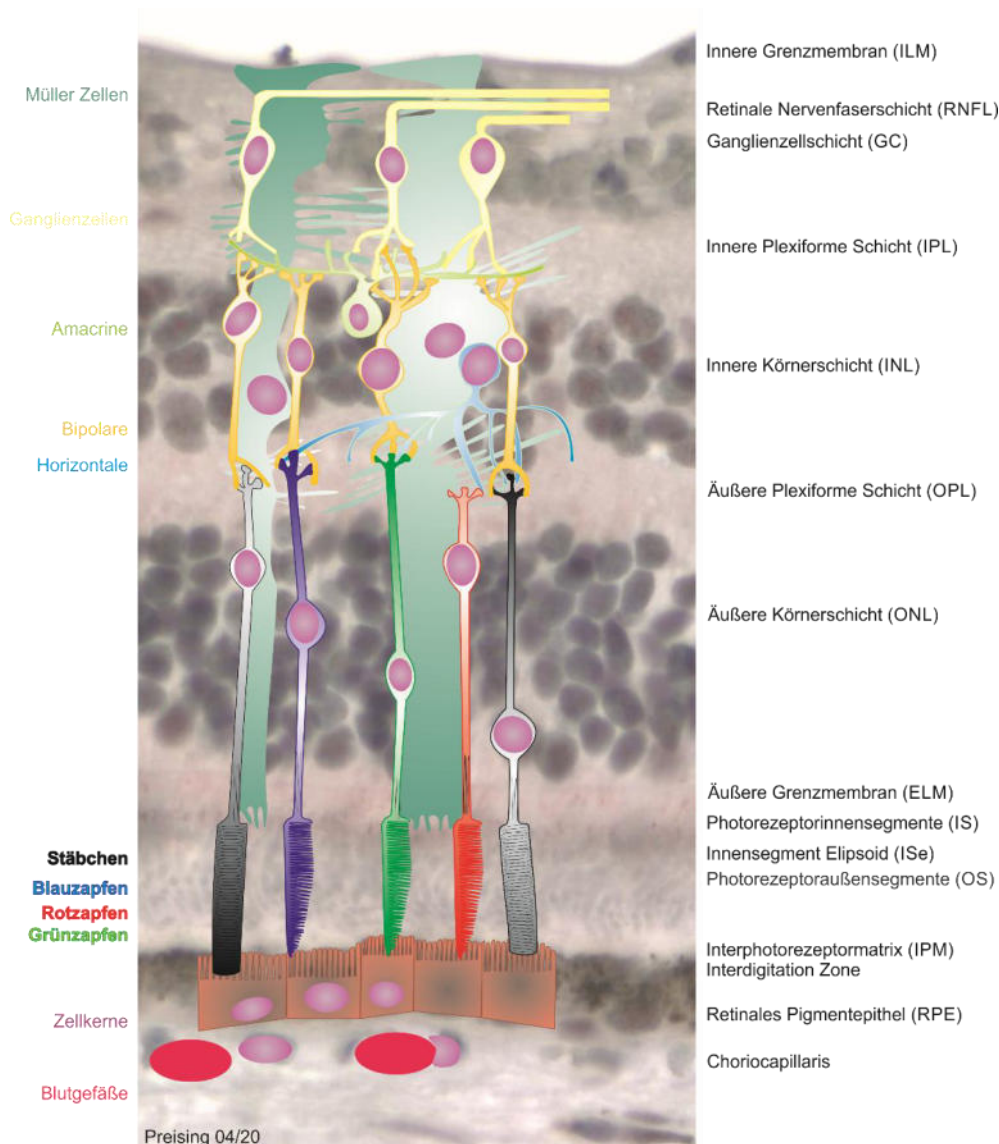


Abbildung 11.1: Schichtaufbau der Netzhaut

(mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. Dipl.-Biol. Markus Preisung)

1.2 Chorioideremie

Die Chorioideremie (syn: tapetochoroidale Dystrophie) gehört zu den hereditären Netzhaut-Aderhaut-Dystrophien. Es handelt sich um eine X-chromosomal rezessiv vererbte Erkrankung, welche langsam fortschreitend zu einer Beeinträchtigung der peripheren Sehkraft und des Dunkelsehens führt. Die Erkrankung erhielt ihren Namen vom fast vollständigen Verlust der Netzhaut und Aderhaut, was die darunterliegende Sklera zum Vorschein bringt. [4] [5]

1.2.1 Geschichte

Die Erkrankung wurde das erste Mal 1872 von Ludwig Mauthner, einem österreichischen Augenarzt, beschrieben. [5] Zunächst wurde davon ausgegangen, dass es sich hierbei um eine Anomalie in der Entwicklung des Auges gehandelt habe, da kaum chorioidale Gefäße im Fundus sichtbar waren. Nachdem aber weniger stark ausgeprägte Fälle entdeckt worden sind, ist die progressive Natur der Erkrankung ersichtlich geworden. [6] Das *CHM*-Gen, dessen Sequenzvariationen mit der Erkrankung korreliert wurden, wurde 1990 entdeckt. [7]

1.2.2 Klinik und Diagnostik

Die Prävalenz liegt bei ca. 1:50.000 bis 1:100.000. [8] Hochgerechnet auf die Bevölkerung sind das ca. 5000 Betroffene in Europa davon ca. 800 in Deutschland. Das *CHM*-Gen befindet sich auf dem X-Chromosom an Position Xq21.2. Die Chorioideremie wird X-chromosomal rezessiv vererbt. [9] Das *ChM*-Gen besteht aus 186.382 Basenpaaren. Die mRNA besteht aus 5442 Basenpaaren und erstreckt sich über 15 Exons. Das *CHM*-Gen kodiert für das REP-1 (Rab Escort Protein 1) Genprodukt, ein Protein welches aus 653 Aminosäuren besteht und 95 kDa schwer ist. [9]

Die Erkrankung kann bereits in der ersten Lebensdekade im Sinne einer Nachtsehschwäche symptomatisch werden. Darauf folgt ein zunehmender Verlust der peripheren Sehkraft mit Aussparung der zentralen Sehschärfe bis zur fünften/sechsten Lebensdekade. [10] Ab der fünften Lebensdekade beginnt auch die zentrale Sehschärfe sich zunehmend zu verschlechtern. [11] Das Farbensehen kann zum Teil bereits vor Beginn des Verlustes der zentralen Sehschärfe beeinträchtigt sein. [12] Phänotypisch kann es innerhalb einer Familie zwischen den betroffenen Männern unterschiedliche Ausprägungen geben. [13] Konduktorinnen sind in der Mehrheit asymptomatisch, zeigen aber phänotypische Auffälligkeiten, die denen der erkrankten Männer in der Familie ähneln, jedoch weniger stark ausgeprägt sind. [14]

Funduskopisch zeigen sich in der Regel als Erstmanifestation ausgedehnte zirkuläre Pigmentverklumpungen im Bereich des Äquators. Diese unterscheiden sich deutlich von den

Einleitung

sogenannten „Knochenkörperchen“, welche bei der Retinitis pigmentosa beschrieben werden. Im Verlauf entstehen vor allem außerhalb des Äquators atrophe Areale welche die darunterliegende Sklera und chorioidale Gefäße zum Vorschein bringen. Auch peri- und parapapillär sind diese Veränderungen sichtbar. [8] Relativ lange bleibt in der Fovea die Struktur der Netzhaut erhalten, bis es im Spätstadium der Erkrankung auch in diesem Bereich aufgrund von Umbauprozessen zu einer Minderung der Sehschärfe bzw. Veränderungen im Farbsehen kommt. Im Unterschied zur RP (Retinitis pigmentosa) zeigt sich bei der Chorioideremie keine wachsfarbene Papille, welche aufgrund der Atrophie des Nervus opticus bei der RP entsteht. [15] Konduktorinnen zeigen milde RPE Veränderungen und vereinzelte atrophe Areale in der Peripherie. Einige Patienten entwickeln eine subkapsuläre Katarakt; in seltenen Fällen kann es auch zu einem Makulaödem oder zu chorioidalen Neovaskularisationen kommen. [16]

In der Fluoreszenzangiographie zeigen sich hypofluoreszente Signale an Stellen an denen die Choriokapillaris bereits zugrunde gegangen ist, neben hyperfluoreszenten Arealen intakten retinalen Pigmentepithels. Obwohl nicht typisch, sind chorioidale Neovaskularisationen beschrieben, welche zu charakteristischen Leckagen führen. [17]

In der Autofluoreszenzaufnahme tritt relativ früh ein erloschenes Signal in der Peripherie auf. Diese umschriebenen Areale dienen viel eher dazu bereits betroffene Netzhautbereiche zu identifizieren, als dies durch eine rein funduskopische Betrachtung möglich wäre. Zudem könnte eine verminderte Fluoreszenz Areale vorhersagen, welche in Zukunft betroffen sein werden. [18] Eine gesprenkelte Autofluoreszenzaufnahme mit nicht betroffener Makula kann sich sowohl bei betroffenen Männern als auch bei Konduktorinnen zeigen. [19]

Im ERG zeigt sich im frühen Stadium der Krankheit das skotopische Signal abnormal reduziert im Vergleich zum photopischen Signal. Bis zum mittleren Alter ist das skotopische Signal ganz erloschen. Bei Konduktorinnen lassen sich geringe Signalveränderungen bei symptomatischem Verlauf beobachten. [20]

Im OCT lassen sich über den gesamten Krankheitsverlauf intakte innere Netzhautschichten darstellen. [8] Im Verlauf kann es zu einer Verdickung der zentralen Netzhaut kommen bei normaler Sehschärfe, welche dann aber progressiv dünner wird, parallel mit der Abnahme der zentralen Sehschärfe. [10]

In der OCT Angiographie können Läsionen in der neurosensorischen Retina, im retinalen Pigmentepithel sowie in der Choriokapillaris die Interpretation erschweren. Dennoch ist sie in der Lage die einzelnen Netzhautschichten zu segmentieren und eine Analyse über eventuelle Neovaskularisationen zuzulassen. [21]

In der Gesichtsfelduntersuchung zeigen sich Defekte entsprechend der chorioretinalen Degenerationen. Das Gesichtsfeld der mittleren Peripherie ist in der Regel als erstes betroffen. Irreguläre Skotome führen im Verlauf schließlich zum kompletten Verlust des peripheren

Einleitung

Sehens. Eine kleine Restinsel in der Fovea bleibt bis in das späte Krankheitsstadium erhalten. [10]

Die Diagnose kann klinisch an den typischen Veränderungen am Fundus sowie anhand der Familienanamnese gestellt werden. Jedoch ist die molekulargenetische Untersuchung die einzige Methode, welche die Diagnose sichern kann. Zusätzlich kann ein Immunoblot mittels Anti-REP-1 Antikörper Test erstellt werden, welcher die Abwesenheit des REP 1 Protein in Leukozyten des Blutes nachweisen kann. [22]

1.2.3 Differentialdiagnosen

Zu den möglichen Differentialdiagnosen, zählt in erster Linie die Atrophia gyrata. Diese Erkrankung, führt ebenso wie die Chorioideremie zu chorioretinalen Atrophien und zieht eine Nachtblindheit in der dritten bis vierten Lebensdekade nach sich. Sie beruht auf einer Sequenzvariation im Ornithin-Aminotransferase-Gen auf Chromosom 10 und führt zu einer Ansammlung von Ornithin im Plasma, welches Gewebeschäden verursacht. Die Erkrankung wird nicht X-chromosomal wie bei der Chorioideremie sondern autosomal-rezessiv vererbt. Eine starke Myopie ist ebenfalls mit der Atrophia gyrata assoziiert sowie das frühe Entstehen einer Katarakt. Im Unterschied zur Chorioideremie lässt sich die Progression dieser Erkrankung durch eine eiweißarme Ernährung verlangsamen. [23]

Die Retinitis pigmentosa ist die häufigste erblich bedingte Netzhautdystrophie und umfasst eine heterogene Gruppe von Gendefekten, die zu einem progressiven Verlust von Photorezeptoren führen. Im Unterschied zur Chorioideremie, finden sich typische Pigmentveränderungen in der Peripherie (sogenannte „Knochenkörperchen“) und eine wachsfarbene Papille. [24] Man unterscheidet je nach Erbgang drei verschiedene Formen: autosomal-dominante Formen (30-40%), autosomal rezessive Formen (50-60%) und X-chromosomale Formen (5-15%). [24] Die X-chromosomale RP zeichnet sich durch einen besonders schweren Verlauf aus. [25] In der Fundusautofluoreszenz-Aufnahme lassen sich Unterschiede zwischen Betroffenen der XLRP und der Choroideremie feststellen. Die XLRP zeichnet sich durch eine erhöhte Fundusautofluoreszenz aus, welche in einem radiären Muster, aufgrund von degenerierten Stäbchenzellen, auftritt. Bei der Choroideremie zeigen sich gesprenkelte Muster von geringer und hoher Dichte der Autofluoreszenz. Um den Sehnerv zeigten sich eher Muster von geringer Dichte. [19]

Das Usher Syndrom ist eine Ziliopathie. Sie ist für 10 - 20% der Retinitis pigmentosa Fälle ursächlich. Die Vererbung der Erkrankung ist autosomal rezessiv (im Gegensatz zur Chorioideremie). Die Betroffenen haben Hörprobleme (partiell oder total), welche bei der Chorioideremie nicht existieren. Typ1 des Usher Syndroms ist mit einer kongenitalen Taubheit und einer sehr früh einsetzenden RP assoziiert. An Usher Syndrom Typ 2 Erkrankte, haben

Einleitung

eine hochgradige Schwerhörigkeit und eine etwa in der Pubertät einsetzende RP. Usher Syndrom Typ 3 ist die seltenste der drei Formen und ist mit einem späteren Einsetzen der Schwerhörigkeit und der RP verbunden. Eine ursächliche Therapie ist bisher nicht etabliert. [26] [27]

Schließlich die Bietti kristalline Dystrophie, eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, welche mit einer progressiven Atrophie des retinalen Pigmentepithels, Verlust der Choriokapillaris, progressiver Nachtblindheit sowie einer Einschränkung des Gesichtsfelds vergesellschaftet ist. [28]

1.3 Therapieansätze

Zur Therapie gibt es verschiedene Ansätze. Da die Chorioideremie durch die Veränderung in einem einzigen Gen entsteht, ist sie ein vielversprechender Kandidat für eine erfolgreiche Gentherapie. [29]

Die Möglichkeit über einen adenoassoziierten Virus, welcher das *CHM*-Gen trägt, in vitro vom Gendefekt betroffene Lymphozyten und Fibroblasten zur Expression von REP-1 anzuregen, wurde im Jahre 2003 erfolgreich erprobt. [30] Diese Viren (Serotyp 2, AAV2), welche als Vektoren für das *CHM*-Gen fungieren, zeigten sich besonders affin gegenüber den Photorezeptorzellen und dem RPE und wurden bereits im Mausmodell untersucht und als „Proof of Concept“ für Gentherapien am Menschen erfolgreich im Jahre 2013 erprobt. [31] Die Menge an Genmaterial, welches durch einen Virus transportiert werden kann, ist durch die Größe des Vektors limitiert. Aber die kodierende Sequenz des *CHM*-Gens passt mit einer Größe von ca. 1,9 kb in den AAV2 Vektor hinein. [32] Die viralen Vektoren hierfür werden subretinal mit etwa 1×10^{10} pfu appliziert. [4]

Die Gentherapie mittels AAV2 Vektoren hat die Phase III der klinischen Prüfung erreicht. Bisher wurden fünf Phase I-II Studien an unterschiedlichen Standorten abgeschlossen. Insgesamt wurden hierbei über 40 Patienten eingeschlossen [33] (NCT01461213, NCT02077361, NCT02553135, NCT02671539, NCT02341807) . Es bleibt unklar, wann das geeignete Zeitfenster ist, um mit der Therapie zu beginnen. Der Vektor der in den bisherigen Studien verwendet wurde, ist identisch mit dem Vektor von Voretigene neparvovec (VN). VN ist das erste zugelassene Medikament für eine Gentherapie bei frühkindlicher schwerer Netzhautdegeneration (EOSRD) aufgrund von biallelischen Sequenzveränderungen im *RPE65*-Gen. Ein neuer Ansatz ist die intravitreale statt subretinale Gabe des AAV2 Vektors. Aufgrund der COVID-19 Pandemie sind klinische Prüfungen zu diesem neuen Therapieansatz bis 2023 noch nicht gestartet. [34] [35]

Diese Sequenzvariationsspezifischen Gentherapien sind bisher die hoffnungsvollsten Therapieansätze. Es gibt jedoch auch Gentherapien welche unabhängig von der genetischen

Einleitung

Ursache wirken. Bei dieser Gruppe versucht man auf pharmazeutische Therapiemethoden zurückgreifen, um den vorzeitigen Stopp der Translation durch Nonsense-Mutationen zu umgehen (ein Drittel aller *CHM*-Sequenzvariationen gehen hierauf zurück). Diese Methode wurde bereits mittels Ataluren in Fibroblasten und Zebrafischen getestet. Es zeigte sich eine deutliche Steigerung der Expression von REP-1 sowie ein funktioneller Anstieg der Rab Prenylisierungen. Ataluren wird derzeit an verschiedenen genetischen Störungen getestet (Aniridie, zystische Fibrose, Muskeldystrophien) und könnte auch bei der Chorioideremie angewandt werden. Sequenzvariationsunabhängige Therapien für die Chorioideremie schließen Verfahren ein welche das Überleben der Zapfen erhöhen, und nicht zuletzt optogenetische Verfahren welche verbliebene Neuronen photosensitiv machen. [35] [36]

Stammzellen sind eine alternative zukünftige Therapieform bei Chorioideremie. Es muss jedoch noch gelingen sowohl den richtigen Zelltyp zu finden (retinales Pigmentepithel, Photorezeptoren) als auch die geeigneten Stammzellen, um eine Regeneration des entsprechenden Gewebes zu erreichen. Es wurden bereits Stammzelltherapien bei altersbedingter Makuladegeneration sowie Retinitis pigmentosa mit pluripotenten Stammzellen in Phase 1 Studien erprobt. Weitere Forschung ist hier erforderlich. [34]

1.4 Funktionen des REP 1 Gens

Intrazellulärer Transport von Vesikeln erfordert die Hilfe von GTPasen. G-Proteine/ GTP-bindende Proteine oder GTPasen gehören zu einer inhomogenen Gruppe Guanin-Nucleotiden-bindender Proteine (Guanosinmonophosphat, Guanosindiphosphat und Guanosintriphosphat). Man unterscheidet bei den G-Proteinen grob zwei Gruppen. Die erste Gruppe bilden die großen G-Proteine, welche membranständig sind und meist eine heterotrimere Struktur aufweisen. Diese spielen eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion und Weiterleitung von Informationen innerhalb der Zelle [37]. Ein Beispiel hierfür wäre das G-Protein Transducin, welches in den Innen- und Außensegmenten der Photorezeptoren vorkommt und bei der visuellen Signaltransduktionskaskade eine essenzielle Rolle einnimmt. Es aktiviert das Enzym Phosphodiesterase, welches cGMP abbaut und somit zur Schließung der Natriumkanäle in den Photorezeptoraussensegmenten führt. [38] Die zweite Gruppe nehmen die kleinen G-Proteine ein, welche eine molare Masse von ca. 20 - 25 kDa aufweisen. Zu ihnen gehören Proteine der Gruppe Ras (*Rat sarcoma*), Ran, Rho und auch der Rab (*Ras-related in brain*) Familie.

Rab Proteine sind membrangebundene prenylierte GTP-bindende Proteine welche für den intrazellulären Transport zwischen den Zellorganellen benötigt werden. Aus der Familie der Rab Proteine sind derzeit mehr als 63 humane Varianten bekannt. [39] Zunächst gelang aus Pilzen das Protein zu isolieren. Daraufhin folgten Isolierungen aus Hirnzellen von Ratten,

Einleitung

welche den Rab- Proteinen ihren Namen gaben (Ras-related in brain) [40]. Rab-Proteine fungieren als Schalter, welche zwischen einem „aktiven“ Status (GTP-gebunden) und einem „inaktiven“ wechseln und damit bestimmte Zelltransportvorgänge „an-“ und „ausschalten“. Unterstützt werden sie hierbei von anderen anhängenden Proteinen wie dem REP-1 (Rab-Escort-Protein 1). [41]

Durch Lipidanker sind Proteine in der Lage mit den lipophilen intrazellulären Membranen zu interagieren. Dies geschieht zum Beispiel im Rahmen einer posttranslationalen Modifikation. Zu diesen Modifikationen gehören verschiedene Arten wie die Glykosylierung, Phosphorylierung und die Lipidierung.

Bei der Lipidierung unterscheidet man grob drei Formen: das Anfügen eines GPI (Glykosylphosphatidylinositol) Ankers, die Lipidmodifikationen durch langkettige Acylierung mit Fettsäuren sowie die Prenylierung. [42] Bei der Prenylierung wird eine Isopreneinheit angeheftet. Dies geschieht über eine Thioetherbindung am carboxyterminalen Cysteinrest. Vor allem Rab-Proteine benutzen dies für den vesikulären Transport mit Hilfe von Geranylgeranylresten. Posttranslationale Isoprenylierungen von Proteinen werden von drei verschiedenen Enzymgruppen durchgeführt:

- Farnesyltransferasen,
- Geranylgeranyltransferasen 1 und
- Rab-Geranylgeranyltransferasen (Geranylgeranyltransferasen 2).

Das REP-1 ist ein Kofaktor der Rab-Geranylgeranyltransferase. Diese verbindet eine 20 Carbon- Geranylgeranylgruppe zu Cysteinresten in Rab-Proteinen und beinhaltet eine terminale COOH Sequenz (Cys-X-Cys oder Cys-Cys; X entspricht einer beliebigen Aminosäure). Die Rab-GG-Transferase besteht aus zwei Komponenten welche sich in hohen Salzlösungen trennen lassen. Die Komponente A ist ein 95 kDa Protein; diese entspricht dem REP-1 (Rab escort Protein 1) und dem homologen REP 2. Die Komponente B ist ein Heterodimer welches aus einer 60 kDa α -Untereinheit sowie einer 38 kDa β -Untereinheit besteht. Die β -Untereinheit ist der Lipid Ankerpunkt in einer hydrophoben Höhle mit einer Zink-Bindung. Die α -Untereinheit besteht neben ihrer eigenen Struktur aus zwei zusätzlichen Strukturen, der Ig-like Domäne sowie einer LRR Domäne (leucine-rich repeat domain). [43] Die Funktionen dieser beiden Proteindomänen für das Enzym bleiben unklar. Womöglich spielen sie eine Rolle bei der Interaktion mit anderen Proteinen oder der intrazellulären Membran. Die Komponente B ist der katalytische Anteil der Transferase, welcher aber nur in der Anwesenheit der akzessorischen Komponente A funktionieren kann. [44]

Der Zyklus der Rab-Proteine sieht wie folgt aus: Neu synthetisierte Rab-Proteine aus dem endoplasmatischen Retikulum bilden mit dem REP-1 Protein einen Chaperon Komplex und

Einleitung

präsentieren diese der Rab-Geranylgeranyltransferase, welche anschließend das Rab-Protein zur Zielmembran begleiten. [41] Durch die GGTase wird die kovalente Bindung der Geranylgeranylgruppe mit dem C-terminalen Cystein Rest katalysiert. Diese Modifizierung ermöglicht die Insertion des Rab Proteins in die Zielmembran. [45] Nachdem die Zielmembran erreicht ist, wird mit Hilfe des GEF (Guanin-Nucleotide-Exchange Factor) der Austausch von GDP für GTP realisiert. Da das Rab-Protein nun „aktiviert“ ist, kann es ihren entsprechenden Stoffaustausch vornehmen. Der Prozess ist dann beendet, wenn durch das GAP (GTPase-activating protein) die Hydrolyisierung des GTP vorgenommen wurde. Durch das GDI (Guanine-nucleotide-dissociation inhibitor) wird das Rab-Protein schließlich von der Membran getrennt und „wartet“ im Zytosol – erneut an das GDP gebunden und somit „inaktiv“ – auf weitere Aufgaben. [46]

1.5 Sequenzvariationen im REP 1 Gen

Bisher sind mehr als 548 verschiedene pathogene Sequenzvariationen in Verbindung mit der Chorioideremie beschrieben (Leiden Open Variation CHM Database, <http://databases.lovd.nl/shared/genes/CHM> , Zugriff zuletzt März 2025).

Die Sequenzvariationen teilen sich in vier große Gruppen auf: Große Deletionen, welche nahezu das gesamte *CHM*-Gen oder sehr große Abschnitte davon betreffen. Diese machen bis zu 50% der Sequenzvariationen aus. [47] Des Weiteren gibt es Sequenzvariationen die zu einem vorzeitigen Translationsstopp führen. Hierzu zählen kleine Deletionen und Insertionen, welche Frameshifts verursachen, Splice Site Mutationen, welche zu einem Exon-skipping führen, sowie Nonsense Mutationen. Missense Mutation wurden nur sehr selten festgestellt und verursachten keine veränderte Funktion des Genprodukts Rab-Escort Protein 1. [48] Obwohl der klinische Phänotyp variieren kann, in Bezug auf Beginn der Symptome und die Geschwindigkeit der Progression, ließen sich bisher noch keine Rückschlüsse auf eine Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp ziehen [48] . In einer neueren Arbeit [49] wurde ein Unterschied im Phänotyp zwischen Patienten welche überhaupt keine mRNA exprimieren (zum Beispiel bei großen Deletionen), zu Patienten bei denen mRNA nachweisbar war, festgestellt. Patienten ohne Nachweis von mRNA produzierten kein Protein und hatten einen schlechteren Visus und ein eingeschränkteres Gesichtsfeld in einem jüngeren Alter (unter 30 Jahren). Da der Phänotyp je nach Sequenzvariation sehr unterschiedlich ausgeprägt sein kann, ist nicht mit einem vollständigen Verlust des Rab -Escort Protein 1 zu rechnen, sondern mit unterschiedlichen Ausprägungen auf der mRNA- sowie der Proteinebene. Davon ausgenommen sind große Deletionen, welche zu einem vollständigen Verlust des REP-1 Protein führen. Der Effekt auf der mRNA-Ebene bei betroffenen Männern soll die heterogenen Phänotypen erklären.

1.6 Lyonisierung

Die Lyon Hypothese wurde 1961 von Mary Frances Lyon postuliert. Diese besagte, dass im Verlauf der Entwicklung des weiblichen Embryos eines der beiden X-Chromosomen inaktiviert wird; Prinzipiell gehören X-Chromosomen neben den Y-Chromosomen zu den Gonosomen und sind in jeder Zelle, neben den anderen 22 Autosomen-Paaren, enthalten. Welches X-Chromosom inaktiviert wird, das väterliche oder das mütterliche, ist Zufall. [50] Diese Inaktivierung findet nur bei Frauen statt, da Männer in ihren Zellen nur ein X-Chromosom haben. Die inaktivierten X-Chromosomen in den Zellen der Frauen entwickeln sich zu Barr-Körperchen. Diese Barr-Körperchen - nach Entdecker Murray Barr benannt – auch als Sexchromatin oder Geschlechtschromatin bekannt, entstehen nur bei Frauen und sind heterochromatisierte X-Chromosomen.

Die X-Inaktivierung läuft wie folgt ab: In der Embryonalphase, genauer im Blastozystenstadium, kommt es zur Bindung einer speziellen RNA an das X-Chromosom. Diese spezielle RNA wird Xist-RNA genannt (X-inactive-specific-transcript). [51] Diese lagert sich an das X-Chromosom an und inaktiviert dieses, allerdings nicht vollständig. Einige Gene – wie das Xist Gen, welches sich auf dem Genlocus Xp13.2 befindet- sowie andere Gene im Bereich der pseudoautosomalen Region entziehen sich dieser Inaktivierung.

Die zufällige Lyonisation resultiert darin, dass es eine gleichmäßige Verteilung der Expression der mütterlichen und väterlichen X-Chromosomen gibt. Falls ein X-Chromosom zu mehr als 75% exprimiert wird, spricht man von einer Skewed Inactivation. Zudem gibt es das Phänomen der X-Inaktivierung zu entkommen, welches 15% der Gene betrifft. [52]. Aufgrund des Phänomens der Lyonisierung, ist es sehr schwer den Schweregrad der Symptome bei Konduktorinnen vorauszusehen.

Die X-Inaktivierung auf molekularer Ebene führt zu einer Methylierung der Promotoren, was dazu führt, dass die Gene ausgeschaltet und zusätzlich Histone methyliert bzw. deacetyliert werden. Hierdurch wird die DNA stärker an die Histone gebunden und es entsteht ein optisch dichteres Heterochromatin, welches man dann als Barr-Körperchen erkennt.

1.6.1 Ausprägung der Chorioideremie bei Konduktorinnen für *CHM*-Sequenzvariation

Bei den meisten Konduktorinnen ist kein herabgesetzter Visus festzustellen. Es sind jedoch Veränderungen im Fundus sichtbar. Wie stark Konduktorinnen betroffen sind, hängt davon ab, in wie vielen Zellen die funktionelle Kopie der X-Inaktivierung entkommt und somit exprimiert wird. Alle Konduktorinnen zeigen aufgrund der Lyonisierung ein genetisches Mosaik mit inaktivierten väterlichen und mütterlichen X-Chromosomen.

Einleitung

Der größte Anteil der Konduktorinnen hat je nach X-Inaktivierung wenig bis gar keine Einschränkungen. Je nach Grad der Lyonisierung entsteht im Fundus ein Mosaikbild mit betroffenen und nicht betroffenen Arealen. Es sind vor allem Bereiche mit Hypo/Hyperpigmentierung in der mittleren Peripherie des Fundus zu sehen. Im multifokalen ERG sind Mosaik entsprechend der Lyonisationsverteilung zu erkennen. Die Fundusautofluoreszenzveränderungen sind meist vor den Fundusveränderungen sichtbar und sind gut abzugrenzen von Betroffenen der X-chromosomal vererbten Retinitis pigmentosa. [50] Bestimmte Gene können der X-Inaktivierung entgehen. [53]

Dies konnte auch für Konduktorinnen für Chorioideremie gezeigt werden [54]. Frauen mit einer Missense Mutation stellten gleichmäßig sowohl den Wildtyp als auch die Sequenzvariation her.

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollte der Effekt von Sequenzvariationen im *CHM*-Gen, auf der mRNA Ebene, sowohl bei Konduktorinnen als auch bei Männern untersucht werden, um die Heterogenität im Phänotyp zu erklären. Konkret sollte gezeigt werden mit welcher Verteilungshäufigkeit Träger einer Sequenzvariation im *CHM*-Gen das Wildtyp Allel bzw. das mutierte Allel des *CHM*-Gens exprimieren. Hierfür wurden Lymphoblastoidzellen aus Blutproben von Patienten und Konduktorinnen mit mutiertem *CHM*-Gen kultiviert. Anschließend wurde die RNA aus den Zellen dieser Kulturen isoliert und mit Hilfe einer quantitativen Reverse Transkriptase PCR amplifiziert, durch Gelelektrophorese aufgetrennt und dargestellt. Als Grundlage dienten die Untersuchungen von Willer [54], der gezeigt hatte mit welcher Verteilungshäufigkeit das Wildtyp Allel bzw. das mutierte Allel bei Konduktorinnen transkribiert wird.

2 Material und Methoden

2.1 Methodischer Überblick

Um die RNA der Patienten und Konduktorinnen zu isolieren, mussten zunächst isolierte Lymphozytenzellen der Probanden, welche bereits zur Verfügung standen, in einer Zellkultur kultiviert werden. Wenn eine ausreichende Anzahl an Zellen zur Verfügung stand, wurden die Zellen abzentrifugiert und mittels eines Kits (hier QIAamp RNA Mini Blood Kit) die RNA isoliert. Anschließend wurde eine Polymerasekettenreaktion (RT-Q-PCR) mit Sequenzvariationsspezifischen Primern durchgeführt. Diese Ergebnisse wurden mit einem Housekeeping Gene verglichen. Das Housekeeping Gene ist ein Gen welches ubiquitär von allen Zellen exprimiert wird. Es wird als Referenz herangezogen, um in der qPCR die Amplifikation des Zielgens zu normieren. Aus diesen Daten wurde ermittelt, in welchem Verhältnis die unterschiedlichen Sequenzvariationen in eine mRNA transkribiert wurden.

2.2 Patienten

Insgesamt wurden die Zelllinien von 13 verschiedenen Patienten untersucht, welche aus der Biobank des Labors für Molekulare Ophthalmologie der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen stammten. Die Zellkulturen stammten von sechs betroffenen Männern und sieben Konduktorinnen. Es handelt sich hierbei um neun verschiedene Sequenzvariationen die sich wie folgt darstellen (siehe Tabelle 2.1):

Tabelle 2.1: Zusammenstellung der in dieser Arbeit untersuchten Sequenzvariationen

Sequenzvariation	Patient	Geschlecht
Intron1: c.49+5g>a	2533.1	M
Deletion Exon 2 – 12	460.1	M
Exon 2: c.368_390dup23bp (p.Thr131Leufs*3)	1740.1, 1740.2	M, W
Exon 2: c.98ins239bp (p.Val34Profs*31)	300.2	W
Exon 5: c.551_564del14bp (p.Asn181Alafs*10)	716.1	W
Exon 6: p.Arg270* ((c.838C>T)	617.1, 617.3	M, W

Material und Methoden

Exon 8: c.1099_1100insTACC (p.Arg367Leufs*52)	897.1	M
Exon 8: c.1139_1140ins36bp	673.1	W
Exon 15: p.Asn601Ser (c.1803C>A)	38.2, 38.4	W, W
Kontrolle, männlich	0005	M
Kontrolle, männlich	38.3	M

Männer:

Patient 2553.1 enthält eine Splice-Site Mutation in Intron 1

Patient 460.1 enthält eine große Deletion von Exon 2-12, welche zu keinem Genprodukt führt

Patient 1740.1 enthält eine Duplikation/Insertion in Exon 2, welche zu Amplicons mit Doppelbanden in der Elektrophorese führt

Patient 617.1 zeigt eine Punktmutation in Form eines Austausches von Cytosin gegen Thymin

Patient 897.1 zeigt eine Insertion in Exon 8

Patient 38.3 enthält eine Missense Mutation, welche nicht zu einer pathogenen Veränderung des Genprodukts führt, da Missense Mutationen im CHM Gen zu keiner Pathogenität führen.

Frauen:

Die Patientengruppe 38.2, 38.4 zeigt eine Missense Mutation in Exon 15 welche nicht zu einer pathogenen Veränderung des Proteins führt (wird als weibliche Kontrollgruppe benutzt).

Konduktorin 716.1 zeigt eine Sequenzvariation im Sinne einer Deletion in Exon 5.

Konduktorin 617.3 zeigt eine Punktmutation in Form eines Austausches von Cytosin gegen Thymin.

Konduktorin 673.1 führte eine Insertion von 36 Basenpaaren in Exon 8.

Konduktorin 1740.2 zeigt eine Insertion/Duplikation welche durch einen Frameshift zu einer pathogenen Veränderung des Proteins führt. Das Protein wird über den Nonsense-mediated Decay abgebaut.

Konduktorin 300.2 enthält eine Insertion von 293 Basenpaaren in Exon 2. Bei so einer großen Insertion kommt es zu einer pathogenen Veränderung des Proteins.

Material und Methoden

Das unten dargestellte Diagramm zeigt auf welcher Position die unterschiedlichen Sequenzvariationen auf dem *CHM*-Gen lokalisiert sind (siehe Abbildung 2.1):

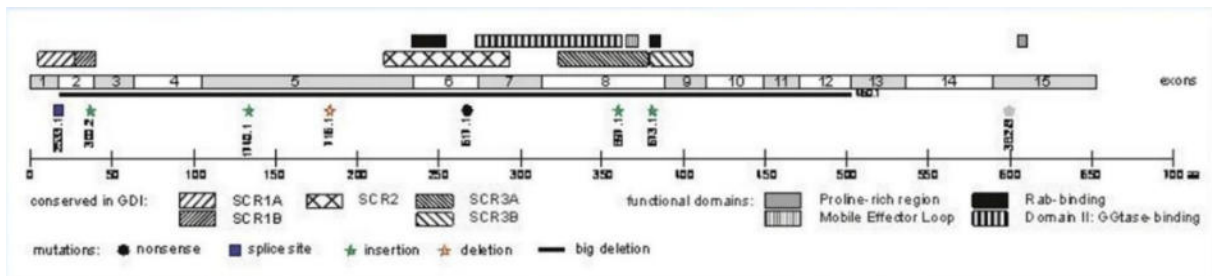


Abbildung 2.1: Lokalisation der Mutationen innerhalb des Proteins

Die Zahlen geben die Patienten an, wie in Tabelle 2.1 aufgeführt, und die Sequenzvariationen sind durch die angegebenen Symbole codiert. Die nummerierte Leiste zeigt die Exons von CHM an. Die Kästchen oben geben die Domänen von REP-1 an. Die Aminosäurenummerierung ist unter den Patienten angegeben.

2.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.2: Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Mikropipette	Transferpette S	Brand GmbH + Co KG, Wertheim
Mikropipette	Reference	Eppendorf AG, Hamburg
Vortex-Schüttler	Vortex Mixer	VWR International GmbH, Darmstadt
Tischzentrifuge	Minizentrifuge MCF-2360	LMS; Tokio, Japan
Thermocycler	T Personal	Biometra GmbH, Göttingen
Waage	Pioneer	Ohaus Europe GmbH, Nänikon, Schweiz
Photometer	Biophotometer 6131	Eppendorf AG, Hamburg
Gelelektrophoresekammer für Agarosegele	Compact M	Biometra GmbH, Göttingen
Spannungsgerät	Power Pack P25 T	Biometra GmbH, Göttingen
Spannungsgerät	Whatman PS305T	Biometra GmbH, Göttingen
UV- Illuminator	BioDocAnalyze	Biometra GmbH, Göttingen
Thermocycler	Mastercycler ep realplex	Eppendorf AG, Hamburg

Material und Methoden

Tabelle 2.3: Chemikalien

Chemikalie	Summenformel	Hersteller
Agarose Seakem LE	$C_{12}H_{18}O_9$	Biozym Scientific GmbH Hessisch Oldendorf
Dimethylsulfoxid (DMSO)	C_2H_6OS	Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn
Ethanol	C_2H_6O	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid	$C_{12}H_{20}BrN_3$	Sigma-Aldrich, Taufkirchen bei München
Ethylendiamin-tetraessigsäure	$C_{10}H_{16}N_2O_8$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid	NaOH	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Beta Mercaptoethanol	C_2H_6OS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Tabelle 2.4: Stammlösungen

Lösung	Zusammensetzung
Lymphozytenmedium	400 ml RPMI 1640 100 ml Fetales Kälberserum 5 ml 100 faches MEM 5 ml L-Glutamin 200 mM 10 ml Pennicillin/Streptomycin
10x TBE	108 g TRIS -> 0,89 M 55 g EDTA- Na ₂ -> 0,02 M 7 g Borsäure -> 0,89 M

Tabelle 2.5: Kits

Kit	Bestellnummer	Hersteller
QIAGEN OneStep RT-PCR Kit	210212	Qiagen, Hilden
QiAamp RNA Blood Mini Kit	52304	Qiagen, Hilden

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Gewinnung der Zellen

Peripheres Blut wurde bereits im Rahmen der molekulargenetischen Diagnostik nach Aufklärung und Einwilligung der 13 Patienten entnommen und in der Biobank des Labors für Molekulare Ophthalmologie der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde archiviert. Für die Biobank liegen befürwortete Ethikanträge (149/07 und 233/20) vor. Aus den Blutproben wurden Lymphodblastozyten isoliert und mittels Transformation mit dem Epstein-Barr-Virus immortalisiert. Die immortalisierten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren gelagert.

2.4.2 Anzüchten der Zellkulturen

Die eingefrorenen Zellen wurde zunächst auf Eis aufgetaut und anschließend in das Lymphozytenmedium (siehe Tabelle 2.4) überführt. Die Kultur wurde in einem Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ über kultiviert. Einmal pro Woche wurden die Zellen mit frischem Lymphozytenmedium gefüttert. 1 ml der Zellkultur wurde abpipettiert und in ein 2 ml Schnappdeckelreaktionsgefäß überführt. Daraufhin wurde das Schnappdeckelreaktionsgefäß in eine Zentrifuge eingesetzt und zentrifugiert. Die Probe wurde bei 15 °C und 300 g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand des Inhaltes wurde vorsichtig abgegossen und das Pellet weiterverwendet, um die Gesamt-RNA (gRNA) zu isolieren.

2.4.3 Isolierung der RNA mittels QIAamp RNA Blood Mini Kit

Mittels des QIAamp RNA Blood Mini Kits (siehe Tabelle 2.5) wurde die gRNA aus den Proben isoliert. Hierfür wurde zunächst das mitgelieferte Buffer RLT verwendet mit 600 µl. Der Buffer RLT, wurde vor der Anwendung mit β-Mercaptoethanol versetzt (10 µl pro 1 ml Buffer RLT). Das β-Mercaptoethanol wirkt als Reduktionsmittel und denaturiert irreversibel die Ribonukleasen. Die Pellets mit den abzentrifugierten Lymphozyten wurden mittels eines Vortex suspendiert bis keine festen Rückstände in den Tubes mehr sichtbar waren. Der Buffer RLT wurde hinzugegeben und vermischt (Ziel dieses Schrittes ist es die Zellen zu lysieren). Im Anschluss wurde das Lysat in einer QIAshredder spin column für 2 Minuten zentrifugiert. Das Lysat wurde weiterverwendet und die Zentrifugiersäule entsorgt. Ethanol (70%) wurde dem Lysat zugeführt und dieses dann mittels pipettieren vermischt. Das Lysat wurde in eine QIamp Zentrifugiersäule gegeben und für 15 s bei 8000 g zentrifugiert. Das Lysat wurde in diesem Schritt entfernt und die QIAamp spin column weiter behalten. Diese wurde in ein frisches 2 ml Schnappdeckelreaktionsgefäß überführt und anschließend mit Buffer RW1 gewaschen. Die Zentrifugiersäule und die daran gebundenen RNA-Moleküle wurde nun bei 8000 g für 15 s zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut verworfen und die QIAmp-Zentrifugiersäule in ein frisches 2 ml Schnappdeckelreaktionsgefäß gebracht. Buffer RPE (500

Material und Methoden

µl) wurde hinzugegeben und die QIAamp-Zentrifugiersäule für 15 s bei 8000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule erneut mit 500 µl Buffer RPE gespült. Diesmal wurde für 3 Minuten bei 8000 g zentrifugiert. Die QIAamp-Zentrifugiersäule wurde in ein 1,5 ml Tube eingesetzt und mit 30 - 50 µl RNA-freiem Wasser befüllt. Zuletzt wurde für 1 Minute bei 8000 g zentrifugiert und die isolierte gRNA-Lösung in einem frischen Gefäß aufgefangen.

2.4.4 Messung der RNA Konzentration

Um die Transkription der verschiedenen Sequenzvarianten miteinander vergleichen zu können, wurde die Konzentration der isolierten gRNA mittels eines Biophotometers gemessen und mit einheitlichen Ausgangswerten in die qRT-PCR eingesetzt.

Durch Photometrie ist es möglich die Konzentration gelöster Substanzen anhand ihrer Lichtabsorption zu messen. Hierbei wird die Abschwächung (Extinktion) der Lichtabsorption bestimmt. Zur photometrischen Bestimmung des gRNA-Gehaltes wurde das Bio-Photometer der Firma Eppendorf verwendet. Die gRNA wurde zunächst 1:10 verdünnt (1 µl Probe + 9 µl ddH₂O). Anschließend wurde das Gerät mit destilliertem Wasser kalibriert. Nun wurde die bereits verdünnte RNA Lösung in eine Quarzküvette eingefüllt und in die Messkammer des Photometers eingesetzt. Die Messung der Extinktion erfolgt bei 260 nm, welches dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren entspricht (RNA, DNA). Um die Reinheit der Probe von Proteinverunreinigungen zu bewerten, wurde der Quotient zwischen dem Absorptionsmaximum der gRNA (260 nm) und dem Absorptionsmaximum der Proteine bestimmt (280 nm). Bei reiner gRNA sollte der Wert bei 2,0 liegen.

2.4.5 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction = PCR) ermöglicht die gezielte Vervielfältigung (Amplifikation) spezifischer Nukleinsäurefragmente aus z.T. geringen Nucleinsäuremengen unterschiedlicher Herkunft. Die PCR beruht auf den Prinzipien der DNA Replikation. Die Replikation kopiert eine DNA Strangvorlage in zwei identische Tochterstränge während der Zellteilung. Sie lässt sich in die drei Abschnitte Initiation, Elongation und Termination unterteilen. Startpunkt der Replikation ist der Replikationsursprung. Von dort aus erfolgt die Replikation in beide Richtungen durch die DNA Polymerasen. Bevor die Replikation beginnen kann, muss die Dopphelexstruktur der DNA geöffnet werden. Während der Replikation erfolgt eine Fehlerkontrolle durch eine zweite DNA-Polymerase, die die Integrität der neuen Stränge überprüft. [55] [56]

Das Prinzip der PCR lässt sich in drei Schritte untergliedern:

1. Denaturierung
2. Annealing (Hybridisierung)

3. Elongation

Die Denaturierung erfolgt bei 95 °C. Aufgrund der Denaturierung einer doppelsträngigen DNA-Sequenz trennt sich diese in zwei Einzelstränge. Nach Absenken der Temperatur auf die primerspezifische Annealing-Temperatur binden sich freie spezifische Oligonukleotidmoleküle (Primer) an komplementäre Sequenzen der DNA-Matrize (Annealing). Die optimale Annealing Temperatur ist jedoch für jedes Oligonucleotidpaar unterschiedlich und wurde vorher bestimmt. Bei der Elongation erfolgt nun die Synthese eines weiteren Doppelstranges. Eine DNA-Polymerase verlängert (elongiert) mit Hilfe freier Desoxynucleotid-Triphosphate (dNTPs) die Oligonucleotide, bis eine Kopie der DNA Sequenz aufgebaut wurde. Eine erneute Erwärmung auf 95 °C führt zu einer erneuten Denaturierung der DNA Stränge, welche als neue Vorlage für den nächsten Zyklus dienen.

In Kombination mit einer thermostabilen DNA-Polymerase ist es möglich den gesamten Prozess in einem Reaktionsgefäß zusammenzuführen (Enzyme, dNTPs, Oligonucleotide). Die PCR Effizienz zeigt sich bereits nach ca. 25 Zyklen. Nach 30 Zyklen erhält man 1.000.000.000 Kopien. [57]

2.4.6 Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)

In dieser Arbeit wurde keine DNA, sondern gRNA als Vorlage (engl. Template) verwendet, welche zunächst über einen enzymatischen Schritt, die reverse Transkription (RT), in eine komplementäre DNA (cDNA) umgewandelt werden musste, damit die PCR durchgeführt werden konnte. Dazu wurde eine Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA Polymerase aus Retroviren eingesetzt. [58]

Verschiedene Möglichkeiten bestehen, um eine RT-PCR durchzuführen. Hier wurde die One-Step Variante genutzt, welche in einem Schritt (engl.: one step) zur Vervielfältigung des entsprechenden RNA-Abschnitts führt. Bei einer Two-Step Variante müsste zunächst die Durchführung der RT-Reaktion erfolgen, um dann im Anschluss in einem zweiten Schritt mit spezifischen Primern die PCR durchzuführen.

2.4.7 Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Zur Quantifizierung der RNA-Fragmente in Echtzeit wurde eine sogenannte „real time“ PCR (qPCR) durchgeführt, da hier mit Hilfe der Messung von Fluoreszenzsignalen eines zugesetzten Fluoreszenzfarbstoffs die Berechnung der entstandenen Produkte während der PCR möglich ist. Man kann grundsätzlich zwei verschiedene Methoden oder Ansätze unterscheiden; die farbstoffbasierte und sondenbasierte PCR.

Bei den farbstoffbasierten Methoden wird ein Molekül (z.B. SYBR Green) verwendet, welches sich spezifisch an das doppelsträngige PCR-Produkt (DNA) anlagert, welches während der

Material und Methoden

Elongation in der PCR erzeugt wurde. Während der Elongationsphase kommt es zu einer Erhöhung der Fluoreszenz, welche proportional zur Anzahl der entstandenen PCR-Produkte ist. Mithilfe einer Schmelzkurvenanalyse ist es dann möglich, deren Spezifität zu überprüfen, um unspezifische Produkte oder Primer-Dimere auszuschließen.

Die Sonden-basierte Methode nutzt den Förster-Resonanzenergietransfer aus (FRET). Als Beispiel einer Sonden-basierten Methode kann hier die Taqman Sonde genannt werden, welche auch als Hydrolyse Sonde bezeichnet wird. [59]

Der CT (Cycle-Threshold)-Wert

Ein Maß für die Quantität der vorliegenden DNA ist der sog. CT (Cycle-Threshold)-Wert der qPCR. Je niedriger der CT-Wert liegt, desto mehr DNA liegt in der Probe vor. Der CT-Wert bezeichnet hierbei den PCR-Zyklus, („Cycle“ = C) bei dem das qPCR-Signal einen festgelegten Schwellenwert („Threshold“ = T) erstmals übertrifft. Dieser Schwellenwert wird vorher festgelegt und entspricht dem Wert, an dem das Signal spezifisch erkannt wird. Dies geschieht, wenn die Kurve in eine lineare Steigung übergeht. Dies geschieht umso früher, je mehr DNA im Probenmaterial vorhanden ist. Dadurch, dass in der PCR DNA nicht linear sondern logarithmisch vermehrt wird, ist zu beachten, dass zwischen zwei CT-Werten nicht eine lineare, sondern eine exponentielle Zunahme zur Basis 2 der Anzahl der DNA-Kopien erfolgt. In jedem Zyklus verdoppelt sich die Anzahl der DNA Kopien. [59]

Quantifizierung

Eine absolute Quantifizierung ist möglich, hängt jedoch sehr stark von der Effizienz der reversen Transkription ab. Die Effizienz, das heißt die Rate der Umsetzung von mRNA in cDNA, hängt stark ab von Faktoren wie der optimalen Auswahl der Primer, und der Konzentration der PCR Komponenten im Reaktionsansatz.

Eine relative Quantifizierung, welche die Ergebnisse in mit einer Kontrolle vergleicht, ist mit Hilfe von Housekeeping Genen z.B. *GAPDH* (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, einem Glykolyse-Enzym, welches in allen Zellen vorkommt), möglich. Um das Verhältnis der reversen Transkription mit dem Ergebnis der PCR der internen Kontrolle des *GAPDH* zu vergleichen, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Eine hiervon ist die $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode. [60]

2.4.8 Die $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode

Bei dieser Methode werden die gemittelten CT-Werte von zwei Ansätzen der PCR-Produkte des Zielproduktes (in diesem Fall Fragmente des *CHM*-Gens) und des Referenzproduktes (ein Fragment eines Housekeeping Gens, in diesem Fall *GAPDH*) ins Verhältnis gesetzt.

Zunächst muss ΔCT berechnet werden. Dafür wird die Differenz des CT-Werts des Zielproduktes und dem CT-Wert des Referenzproduktes ermittelt. Man kann hierdurch unterscheiden ob das untersuchte Gen in derselben Menge exprimiert wird wie das Kontrollgen.

Anschließend wird die Differenz erstellt zwischen dem durchschnittlichen ΔCT Wert der verschiedenen Zielprodukte des hier untersuchten *CHM*-Gens berechnet und den einzelnen ΔCT Werten des Zielgens. Damit erhalten wir $\Delta\Delta CT_{\text{berechnet}}$.

Nun wird dieser Wert in die Formel $2^{-\Delta\Delta CT}$ eingefügt, und die Ergebnisse können dann miteinander verglichen werden. Bei einem Wert größer als eins, wird das Zielgen höher exprimiert als das Kontrollgen. Bei einem Wert unter eins entsprechend umgekehrt. [61]

2.4.9 Komponenten eines PCR-Ansatzes

Der PCR-Ansatz enthält folgende Komponenten:

1. die gRNA, welche die zu vervielfältigende Sequenz enthält
2. die Reverse Transkriptase, welche die Synthese der cDNA-Kopien vornimmt
3. zwei fragmentspezifische synthetische Oligonukleotide, sogenannte Primer
4. ein Gemisch aus Desoxynukleostidtriphosphaten, die als Bausteine für die neu polymerisierte DNA dienen
5. doppelt destilliertes Wasser (ddH₂O)
6. ein Reaktionspuffer (der hier Bestandteil des Enzymkits war)
7. die Q-Solution, welche das Schmelzverhalten der RNA/DNA beeinflusst
8. SYBR Green, ein Cyaninfarbstoff zum Nachweis der doppelsträngigen DNA

Material und Methoden

Der qRT-PCR Ansatz mit den gRNA-Proben setzte sich wie folgt zusammen:

Reagenz	Menge (µl)
Patienten RNA (200 ng / 50 µl)	3
RT Polymerase Mix	0,6
Primer forward (10 pM)	0,9
Primer reverse (10 pM)	0,9
dNTP (10 mM)	0,6
ddH ₂ O	2,4
Puffer	3,0
Q-Solution	3,0
SYBR II 10x (2 µl / 50 µl)	0,6
Gesamtansatz	15

Folgende Primer wurden verwendet:

Tabelle 2.6: Verwendete Oligonukleotidprimer

Primer	Sequenz	Fragment
	<i>CHM</i>	
REP 5-6a	GCGATCCAGAGAATGCGCTA	Exon 5 bis 6
REP 5-6b	CCTCGAGAATACAGCAGCTTTGAT	238 Basenpaare
REP 7-9a	AAAGACTCAAAAATTAACCCCCAAC	Exon 7 bis 9
REP 7-9b	GCAGAAACACTGGGGGAGTTC	193 Basenpaare
REP 10-13a	TGGAGGACAGTTACTTTCCTGAGAA	Exon 10 bis 13
REP 10-13b	GCAAGTCAAATGAACCAAATAGGTG	230 Basenpaare
	Housekeeping Gene	
GAPDH _a	ATGGGGAAGGTGAAGGTCGG	GAPDH
GAPDH _b	GCCATGGGTGGAATCATATTGG	162 Basenpaare

Material und Methoden

Bei dieser Arbeit wurde die PCR unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Tabelle 2.7: PCR-Zyklus

Arbeitsschritt	Temperatur (°C)	Dauer (s)
Reverse-Transkriptase Reaktion	50	900
Start	95	300
Annealing (Primeranlagerung)	60	45
Extension (Synthese)	72	30
Melting (Denaturierung)	95	15
Annealing (Primeranlagerung)	58	30
Extension (Synthese)	72	600

Es wurden insgesamt 40 Zyklen unter diesen Bedingungen durchgeführt. (siehe Tabelle 2.7)

2.4.10 Agarose Gel Elektrophorese

Die Elektrophorese ist ein elektrochemisches Verfahren um verschieden große und verschieden geladene Moleküle voneinander zu trennen. Dabei wandern geladene kolloidale Teilchen über ein elektrisches Feld. Verschiedene Materialien kommen als Trägermaterial in Frage. Zu nennen wären hier Flüssigkeiten, Gele (Agarose, Polyacrylamid) oder Feststoffe. In dieser Arbeit wurde Agarose verwendet, welches ein aus Meeresalgen gewonnenes Polysaccharid ist. Im Gegensatz zu Polyacrylamid-Gelen sind die Agarosegele mit deutlich größeren Porendurchmessern ausgestattet. Die DNA-Moleküle wandern innerhalb des Gels aufgrund ihrer negativen Ladung und der angelegten Spannung in Richtung Pluspol. Je größer das Molekül ist, desto stärker wird es zurückgehalten. Kleinere Moleküle legen eine größere Strecke unter der Spannung zurück. Die Elektrophorese wirkt hier wie ein Sieb. Moleküle, welche gleich groß sind, sammeln sich an Banden gleicher Höhe. Die Abschätzung der Größe erfolgt mit Hilfe einer „DNA Leiter“. Diese „Leiter“ ist ein Gemisch von DNA-Strängen, definierter Größe und wird als Größenmarker bei der Agarose-Gelelektrophorese (siehe Tabelle 2.2) eingesetzt. Das Agarosegel wird während der Herstellung mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Ethidiumbromid) versetzt, der an DNA-Doppelstränge bindet und unter UV-Licht ein Fluoreszenzsignal emittiert, das die PCR-Produkte als Banden sichtbar macht. [62]

Zur Durchführung der Elektrophorese wurde 2%-iges Agarose Gel verwendet. Diese Konzentration führt zu einer geeigneten Porengöße zur Visualisierung und Auftrennung der kurzen DNA-Fragmente der PCR-Produkte. 2,4 g des Agarosepulvers wurden hierbei abgewogen und mit 120 ml 1xTBE Puffer aufgefüllt. Anschließend wurde die Pufferlösung in

Material und Methoden

der Mikrowelle solange erhitzt bis sich die Agarose vollständig aufgelöst hatte. Nachdem das Gel etwas abgekühlt war (auf ca. 40 °C), wurden 8 µl einer 1% Ethidiumbromidlösung hinzugegeben (siehe Tabelle 2.3). Zur Aushärtung des Gels wurde dieses in eine dafür vorgesehene Form gegossen. Um später PCR-Ansatz in Slots im Agarose-Gel hineingeben zu können, wurden vor der Aushärtung noch Kämme in die Form eingesetzt, welche nach Aushärtung eine Tasche hinterlassen, welche als Slots für die DNA-Proben fungieren. Nach der Aushärtung wurden die Kämme herausgenommen und das fertige Gel in die Elektrophoresekammer überführt und mit 1x TBE Puffer überschichtet. In die Slots wurden jeweils 15 µl PCR-Ansatz mit einer Pipette einpipettiert. Ebenfalls wurde in einen Slot ein Größenmarker pipettiert. Eine Spannung von 100 Volt wurde angelegt und über eine Stunde aufrechterhalten. Nach Ablauf der vorgegebenen Zeit, wurde die Elektrophorese automatisch beendet und die Spannung auf 1 Volt reduziert.

Das Gel wurde anschließend aus der Elektrophoresekammer entnommen und unter UV-Licht betrachtet. Die mit Ethidiumbromid angefärbten DNA-Banden wurden dokumentiert.

3 Ergebnisse

3.1 Kultivierung der humanen Lymphozyten und RNA-Extraktion

Die Kultivierung der Lymphozytenzellen diente dem Zweck ausreichend RNA von Patienten mit Sequenzvariationen im *CHM*-Gen zur Verfügung zu haben. Das Kultivieren der Zellen dauerte in der Regel vier Wochen. Danach konnten die Zellen geerntet werden. Die entsprechende Vorgehensweise ist in den Kapiteln 2.4.1 bis 2.4.3 beschrieben. Die eingesetzten Lymphozytenzellkulturen sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst.

3.2 Quantitative RT-PCR

Um darzustellen, in welchem Verhältnis die RNA-Fragmente quantitativ zueinanderstehen, wurden die CT-Werte mittels der RT-PCR ermittelt. Jede RNA wurde mit drei unterschiedlichen Primern getestet (siehe Tabelle 2.6), um Primerpaar assoziierte Unterschiede zu vermeiden. Diese sind Tabelle 2.6 zu entnehmen. Die Transkription der *CHM*-mRNA wurde über diese PCR-Fragmenten mit GAPDH, dem Housekeeping Gene, verglichen. Anschließend wurde mit der $-\Delta\Delta CT$ Methode (siehe 2.4.80) eine entsprechende Berechnung durchgeführt.

Tabelle 3.1: Durch die qRT-PCR ermittelte CT-Werte (Mittelwerte aus drei Ansätzen) mit Duplikationen:

Patient - Primer	Cycle Threshold	Standard-abweichung	Sequenzvariation	Geschlecht
1740.1 - 1101/1102	29,60	1,21	Duplikation	Männlich
1740.1 - 1103/1104	30,84	1,81	Duplikation	Männlich
1740.1 - 1105/1106	28,91	2,3	Duplikation	Männlich
1740.1 - GAPDH a/b	17,61	4,6	Duplikation	Männlich
1740.2 - 1101/1102	25,61	2,1	Duplikation	Weiblich
1740.2 - 1103/1104	29,72	2,3	Duplikation	Weiblich
1740.2 - 1105/1106	25,00	1,9	Duplikation	Weiblich
1740.2 - GAPDH a/b	17,37	5,0	Duplikation	Weiblich

Ergebnisse

Tabelle 3.2: Durch die qRT-PCR ermittelte CT-Werte bei Sequenzvariationen mit Transitionen (Punktmutation)

Patient - Primer	Cycle Threshold	Standard-abweichung	Sequenzvariation	Geschlecht
617.1 - 1101/1102	28,45	1,21	Transition	Männlich
617.1 - 1103/1104	31,78	0,44	Transition	Männlich
617.1 - 1105/1106	28,25	0,32	Transition	Männlich
617.1 – GAPDH a/b	17,87	0,73	Transition	Männlich
617.3 - 1101/1102	29,09	2,54	Transition	Weiblich
617.3 - 1103/1104	29,44	1,04	Transition	Weiblich
617.3 - 1105/1106	30,71	3,07	Transition	Weiblich
617.3 – GAPDH a/b	21,47	1,27	Transition	Weiblich

Tabelle 3.3: Durch die qRT-PCR ermittelte CT-Werte bei Sequenzvariationen mit Insertionen

Patient - Primer	Cycle Threshold	Standard-abweichung	Sequenzvariation	Geschlecht
897.1 – 1101/1102	29,11	1,80	Insertion	Männlich
897.1 – 1103/1104	30,12	4,47	Insertion	Männlich
897.1 – 1105/1106	31,30	1,41	Insertion	Männlich
897.1 – GAPDH a/b	20,49	0,98	Insertion	Männlich
673.1 – 1101/1102	28,91	1,66	Insertion	Weiblich
673.1 – 1103/1104	31,00	2,70	Insertion	Weiblich
673.1 – 1105/1106	29,51	5,35	Insertion	Weiblich
673.1 – GAPDH a/b	18,24	1,06	Insertion	Weiblich
300.2 – 1101/1102	24,82	2,23	Insertion	Weiblich
300.2 – 1103/1104	29,68	2,60	Insertion	Weiblich
300.2 – 1105/1106	25,27	1,42	Insertion	Weiblich
300.2 – GAPDH a/b	17,65	1,45	Insertion	Weiblich

Ergebnisse

Tabelle 3.4: Durch die qRT-PCR ermittelte CT-Werte bei Sequenzvariationen mit Deletionen

Patient - Primer	Cycle Threshold	Standard-abweichung	Sequenzvariation	Geschlecht
716.1 – 1101/1102	27,63	1,32	Deletion	Weiblich
716.1 – 1103/1104	28,95	2,69	Deletion	Weiblich
716.1 – 1105/1106	27,50	0,92	Deletion	Weiblich
716.1 – GAPDH a/b	18,25	0,46	Deletion	Weiblich
460.1 – 1101/1102*	-	-	große Deletion	Männlich
460.1 – 1103/1104*	-	-	große Deletion	Männlich
460.1 – 1105/1106*	-	-	große Deletion	Männlich
460.1 – GAPDH a/b	17,74	0,41	große Deletion	Männlich

*Durch die Deletion gehen die zugehörigen Primerbindungsstellen verloren

Tabelle 3.5: Durch die qRT-PCR ermittelte CT-Werte bei Sequenzvariationen mit Splice Site Mutationen

Patient - Primer	Cycle Threshold	Standard-abweichung	Sequenzvariation	Geschlecht
2553.1 - 1101/1102	34,78	1,15	Splice Site Mutation	Männlich
2553.1 - 1103/1104	33,58	3,91	Splice Site Mutation	Männlich
2553.1 - 1105/1106	35,97	3,92	Splice Site Mutation	Männlich
2553.1 - GAPDH a/b	19,76	0,33	Splice Site Mutation	Männlich

Tabelle 3.6: Durch die qRT-PCR ermittelte CT-Werte bei Sequenzvariationen mit Missense Mutationen und bei männlichem Normprobanden

Patient - Primer	Cycle Threshold	Standard-abweichung	Sequenzvariation	Geschlecht
38.2 - 1101/1102	20,88	1,09	Missense	Weiblich
38.2 - 1103/1104	23,82	0,72	Missense	Weiblich
38.2 - 1105/1106	22,69	0,75	Missense	Weiblich
38.2 – GAPDH a/b	17,31	0,17	Missense	Weiblich
38.3 - 1101/1102	21,81	2,01	Missense	Männlich
38.3 - 1103/1104	25,20	2,27	Missense	Männlich
38.3 - 1105/1106	23,00	1,39	Missense	Männlich
38.3 – GAPDH a/b	15,84	2,39	Missense	Männlich
38.4 - 1101/1102	22,75	0,12	Missense	Weiblich

Ergebnisse

38.4 - 1103/1104	24,45	0,06	Missense	Weiblich
38.4 - 1105/1106	23,10	1,01	Missense	Weiblich
38.4 – GAPDH a/b	14,82	0,88	Missense	Weiblich
0005 - 1101/1102	19,51	0,61	-	Männlich
0005 - 1103/1104	26,67	1,41	-	Männlich
0005 - 1105/1106	24,71	0,80	-	Männlich
0005 – GAPDH a/b	18,26	1,34	-	Männlich

Tabelle 3.7: Quantitative Darstellung der Sequenzvarianten nach der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode

Patient Nr.	ΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Geschlecht
2533.1	14,55	0,005	Männlich
617.1	4,155	0,061	Männlich
1740.1	5,955	0,299	Männlich
897.1	7,43	0,120	Männlich
617.3	6,925	0,473	Weiblich
716.1	10,005	0,062	Weiblich
300.2	7,8	0,124	Weiblich
1740.2	5,465	1,065	Weiblich
673.1	10,61	0,040	Weiblich

Die Mittelwerte der CT-Werte der verschiedenen Primer wurden berechnet. Im Anschluss daran wurden diese Mittelwerte mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode berechnet, um zu einer relativen Quantifizierung zu gelangen. (siehe Tabelle 3.7)

Die Männer haben im Vergleich zu den von uns getesteten Konduktorinnen niedrigere $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Werte. Kein Mann hat einen Wert von über 0,3.

Nachstehend stellt das Diagramm (siehe Abbildung 3.1) die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Werten der Männer dar:

Nachstehend ein Diagramm (siehe Abbildung 3.2) mit den $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Werten der Konduktorinnen: Konduktorinnen haben insgesamt höhere $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werte als Männer. Betroffene Konduktorinnen hatten deutlich niedrigere Werte als nicht manifestierende Konduktorinnen.

In Abbildung 3.1 und Abbildung 3.2 werden die Werte nach Geschlecht aufgeteilt dargestellt:

Ergebnisse

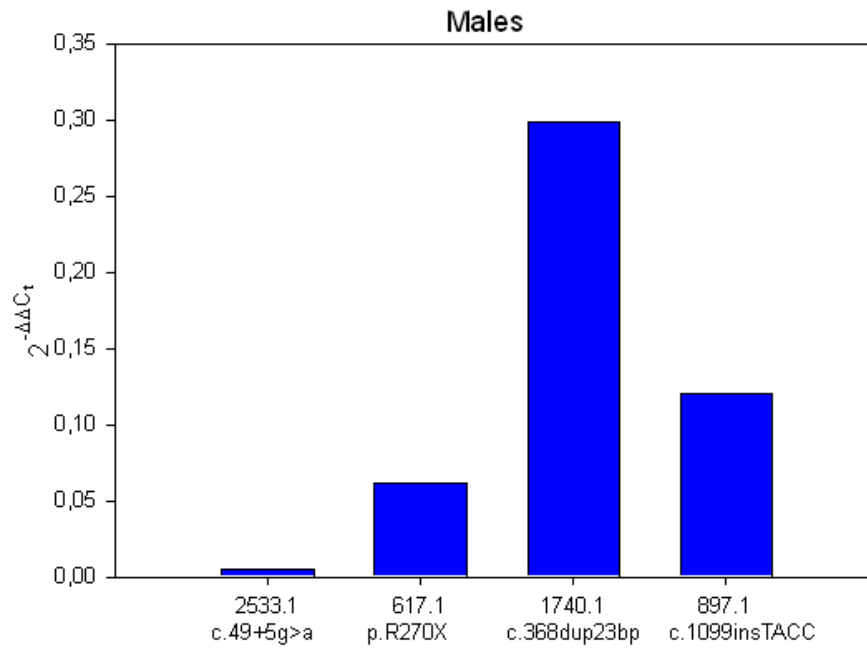


Abbildung 3.1: Quantitative Analyse der RT-PCR Produkte der männlichen Patienten

Die RT-PCR Produkte wurden mittels qPCR quantifiziert und die Transkription der mutierten Produkte wurde mittels der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode mit Kontrollproben verglichen.

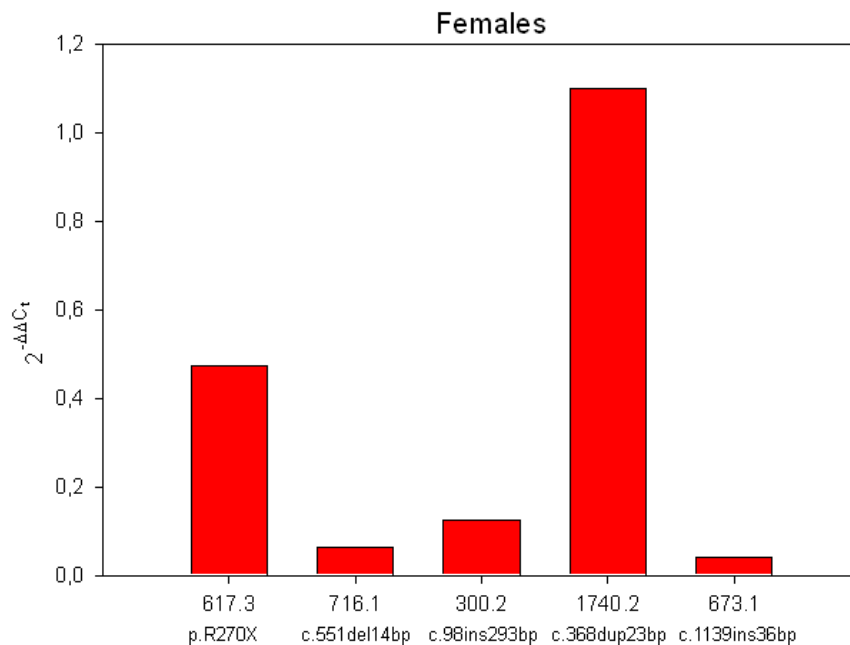


Abbildung 3.2: Quantitative Analyse der RT-PCR Produkte bei Konduktorinnen

Die RT-PCR Produkte wurden mittels qPCR quantifiziert und die Transkription der mutierten Produkte wurde mittels der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode mit Kontrollproben verglichen.

3.3 Agarose Gel-Elektrophorese

Um die Qualität der RT-PCR zu evaluieren, wurden die Transkriptionsprodukte mit der Agarose Gel-Elektrophorese analysiert.

Zunächst wurde die Gel-Elektrophorese mit Wasser und dem Patienten 460.1 (große Deletion) durchgeführt. Dies diente der negativen Kontrolle, da aufgrund der großen Deletion über 10 Exons die Primerpaare die Bindungsstellen nicht finden und die Amplifikation nicht erfolgreich ist. Wie von uns erwartet, zeigt sich bei Wasser keine Bande und bei 460.1 (große Deletion) eine positive Bande bei GAPDH, da dieses ubiquitär in jeder Zelle vorkommt und somit hier amplifiziert werden konnte.

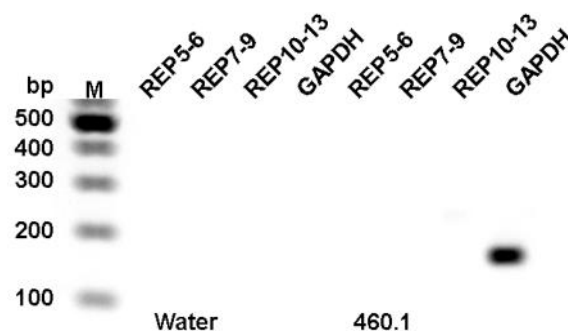


Abbildung 3.3: RT-PCR Produkte der Kontrollen

Darstellung der RT-PCR Produkte mittels Gel-Elektrophorese. Die Wasser Kontrolle und die Negativ Kontrolle (Sequenzvariation 460.1) bestätigen die Spezifität der Amplifikation. (siehe Abbildung 3.3)

Die Gel-Elektrophorese führte zu folgenden Werten:

Es konnten für alle Primerpaare Produkte nachgewiesen werden. Hervorzuheben ist hierbei die Doppelbande bei 673.1 (Exon 7-9).

673.1 trägt eine Insertion von 36 Basenpaaren. Hier wurde das Wildtyp-Allel und die Sequenzvariante exprimiert. (siehe Abbildung 3.4)

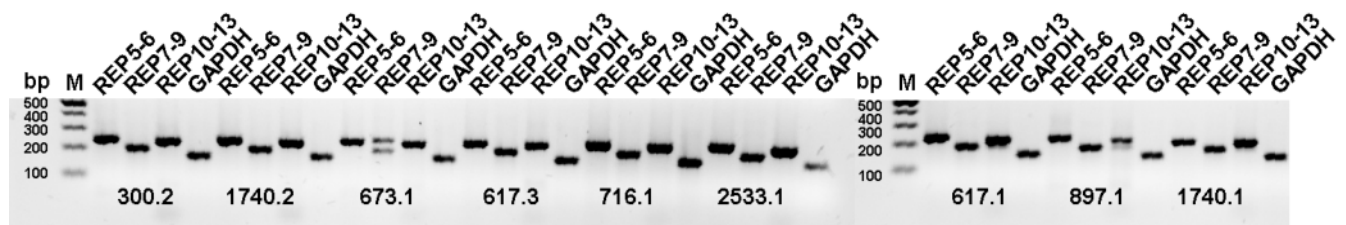


Abbildung 3.4: RT-PCR Produkte aller Sequenzvariationen

Darstellung der RT-PCR Produkte mittels Gel-Elektrophorese. Für alle Patienten konnten entsprechende PCR-Produkte nachgewiesen werden. Als Kontrolle fungierte bei jedem Lauf GAPDH (housekeeping gene). Die Patientin 673.1 zeigt eine Doppelbande, welche darauf hindeutet, dass hier sowohl der Wildtyp, als auch die Variante exprimiert wurden.

4 Diskussion

Willer [54] konnte nachweisen, dass Konduktorinnen, welche Symptome wie Nachtblindheit, Photophobie, Einschränkungen des Gesichtsfeldes und Veränderungen im Fundus, wie mottenfraß-ähnlichen Pigmentveränderungen in der Peripherie, zeigten, mRNA beider Kopien des *CHM*-Gens exprimieren. Zu untersuchen war, ob es auch für Männer Unterschiede in der Expression von mRNA gibt und welche Rückschlüsse auf den Phänotyp dies erlaubt.

4.1 Interpretation der Ergebnisse der RT-PCR

Die Spezifität der RT-PCR-Produkte wurde bestätigt mit der RNA Probe von 460.1 welche eine große Deletion trägt, die sich über 11 von 15 Exons erstreckt. Bei diesem Patienten wurde aufgrund der Größe der Deletion keine Expression erwartet. Es konnte auch keine mRNA nachgewiesen werden. (siehe Tabelle 3.4)

Eine Splice-Site-Mutation im Intron 1 des *CHM*-Gens führte zu Transkripten von *CHM*, jedoch in einem geringen Umfang, was auf die kodierende Sequenz zurückzuführen sein kann, die das verbleibende erste Intron enthält. Bei einer Mutation eines Introns zu Beginn des Leserasters, so wie bei Patient 2553.1, ist mit einer geringen Menge mRNA zu rechnen, da es zu vorzeitigen Stoppcodons führen und damit Nonsense-mediated Decay auslösen kann. Bei einer Mutation gegen Ende des Leserasters, wäre mit einer größeren Menge von *CHM* Transkripten zu rechnen gewesen. (siehe Tabelle 3.5)

Patienten 617.1/617.3, tragen eine Punktmutation (Cytosin durch Thymin ersetzt), die zu einem vorzeitigen Stoppcodon führt und produzierten mRNA des *CHM*-Gens. Patient 716.1 trägt eine Deletion, welche nach einer Verschiebung des Leserasters zu einem vorzeitigem Stoppcodon führt. Patient 897.1 zeigte nach einer Verschiebung des Leserasters durch eine Insertion ein vorzeitiges Stoppcodon. Die mRNA der Patientin 673.1 zeigte im Exon 7-9 eine Doppelbande, welche darauf hinwies, dass sowohl das Wildtyp-Allel und als auch das mutierte Allel in der Probe exprimiert wurden. Die Banden in der Gelelektrophorese entstehen durch eine Größentrennung der DNA-Fragmente und ihre Visualisierung durch einen Farbstoff; in unserem Fall Ethidiumbromid. Sie entstehen also, weil DNA-Fragmente abhängig von ihrer Größe mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch das Gel wandern und durch einen Farbstoff sichtbar gemacht werden. Es kommen verschiedene Ursachen für eine doppelte Bande infrage: Insertionen oder Deletionen können zwei unterschiedlich lange Produkte amplifizieren. Bei Insertionen wäre es ein größeres PCR Produkt und bei Deletionen ein kleineres PCR Produkt. Bei einer Mischung aus mutierter mRNA und Wildtyp-mRNA wie bei

Literaturverzeichnis

Konduktorin 673.1, kann es zu einer Bildung von unterschiedlich großen PCR-Produkten kommen, welche zu abweichender Migration in der Gelelektrophorese führen.

Ob eine doppelte Bande bei anderen Konduktorinnen unserer Untersuchung auftritt oder nicht, kann nicht direkt aus dem Genotyp geschlossen werden. Es hängt davon ab, ob die mutierte Variante stabil bleibt, oder vom Nonsense-mediated decay vorher abgebaut wird. Wenn nur eine Bande erscheint, ist dies in der Regel die Wildtyp Variante, es sei denn diese wurde durch die Lyonisierung inaktiviert und die mutierte Variante bleibt stabil. Hierbei bezeichnet die Lyonisierung die zufällige Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen in Zellen weiblicher Individuen, wodurch in bestimmten Zellen ausschließlich das X-Chromosom mit der Mutation aktiv sein kann. (siehe Tabelle 3.2. und 3.3)

Patienten 1740.1 (Mann) und 1740.2 (Frau) führen durch eine Duplikation zu einer Verschiebung des Leserasters und damit zu einem vorzeitigen Stoppcodon, Die Ergebnisse zeigten relativ gesehen die höchste Genexpression. (siehe Tabelle 3.1, Abbildung 3.1)

Patient 0005 und 38.3. tragen die Wildtyp Variante des CHM Gens. Patientinnen 38.2 und 38.4 tragen eine Missense Mutation und sind nicht betroffen, weil das Genprodukt keine funktionelle Veränderung zeigt. Es handelt sich hierbei um einen Polymorphismus oder eine stille Mutation. (siehe Tabelle 3.6)

4.2 Allgemeine Interpretation der Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es zu zeigen, dass sowohl betroffene Männer als auch Konduktorinnen mRNA des *CHM*-Gens transkribieren und dieses sich quantitativ unterscheiden und messen lässt.

Die Ergebnisse der RT-PCR zeigten, dass manifestierende Konduktorinnen relativ gesehen mehr mRNA der Sequenzveränderungen exprimieren als nicht-manifestierende Konduktorinnen.

Willer [54] konnte für zwei verschiedene Konduktorinnen die Verteilungshäufigkeit der Expression nach Wildtyp und Mutationsallel differenzieren.

Entgegen der Lyon-Hypothese, welche besagt, dass während der Embryogenese eines der beiden X Chromosomen inaktiviert wird, konnte Willer zeigen, dass bei zwei Konduktorinnen aus beiden Allelen (Wildtyp und Mutation) eine Genexpression nachweisbar war. [54]

Der Nonsense-mediated Decay ist ein komplexer multifaktorieller Mechanismus der eng mit der Translation verbunden ist. Er sorgt dafür, dass fehlerhafte mRNA, welche ein vorzeitiges

Literaturverzeichnis

Stoppcodon enthält, erkannt und abgebaut wird. Das Protein UPF1, eine RNA-Helikase, spielt die zentrale Rolle hierbei. [63]

Der Nachweis von mRNA des *CHM*-Gens in dieser Arbeit bei Sequenzveränderungen, auf die Nonsense-mediated Decay anspricht, zeigt somit eine Möglichkeit auf, funktionelle mRNA in den Translationsprozess einzuschleusen.

Ein zentraler Aspekt der Entwicklung einer Readthrough-Therapie wie Ataluren zur Behandlung der Chorioideremie ist das Vorhandensein von mRNA des *CHM*-Gens. Diese ist essenziell, um den therapeutischen Mechanismus zu ermöglichen, da Ataluren darauf abzielt, ein vorzeitiges Stoppcodon in der mRNA zu überlesen und eine vollständige Translation des Proteins zu ermöglichen.

Readthrough-Therapien zielen auf sogenannte Nonsense-Mutationen ab, die zu einem vorzeitigen Stopp der Translation führen und dadurch eine verkürzte und nicht funktionale Proteinexpression verursachen. Ataluren (PTC 124) wurde als ein potenzieller Wirkstoff entwickelt, um das Ribosom zu beeinflussen, sodass es nicht an einem vorzeitigen Stoppcodon (UAG, UAA oder UGA) terminiert, sondern stattdessen eine Aminosäure einbaut, wodurch die Translation des Proteins fortgesetzt werden kann. Dies setzt jedoch das Vorhandensein der entsprechenden mRNA voraus.

Bei Patienten mit Chorioideremie sind verschiedene Mutationen im *CHM*-Gen bekannt, darunter Frameshift-Mutationen, Splice-Site-Mutationen und große Deletionen. Während große Deletionen dazu führen, dass gar keine mRNA mehr gebildet wird, bleiben bei Nonsense-Mutationen oftmals verkürzte mRNA-Moleküle erhalten. Diese können Zielstrukturen für eine Readthrough-Therapie sein. Es gibt neben Ataluren auch andere Readthrough-Therapeutika, die ähnlich wirken. Zu diesen Substanzen gehören Aminoglykoside wie Gentamicin, welche ebenfalls in der Lage sind, das Ribosom dazu zu bringen, ein Stoppcodon zu überlesen. Diese Medikamente binden an die kleine ribosomale Untereinheit und stören die korrekte Erkennung der mRNA-Sequenz, wodurch die Wahrscheinlichkeit erhöht wird, dass eine alternative Aminosäure eingebaut werden kann. Während Gentamicin und anderen Aminoglykoside eine höhere Toxizität aufweisen, ist Ataluren speziell für den therapeutischen Einsatz entwickelt worden, um eine bessere Verträglichkeit zu gewährleisten. [64]

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass nicht alle Patienten mit *CHM* Mutationen mRNA exprimieren. Besonders Patienten mit großen Deletionen des *CHM*-Gens produzieren keinerlei detektierbare mRNA, was bedeutet, dass bei ihnen eine Readthrough-Therapie keine Wirkung haben kann. Hingegen lässt sich bei Patienten mit Nonsense-Mutationen in vielen

Literaturverzeichnis

Fällen eine reduzierte, aber vorhandene mRNA-Expression nachweisen. Dies legt nahe, dass eine Readthrough-Therapie nur für diese Untergruppe der Patienten potenziell wirksam sein kann.

Die qRT-PCR-Daten zeigen deutlich Unterschiede in der Expression der mutierten CHM-mRNA zwischen verschiedenen Mutationsarten. Patienten mit Nonsense-Mutationen in Exons, die nicht eines vollständigen Abbaus durch den Nonsense-Mediated Decay (NMD) unterliegen, zeigen messbare Mengen an mRNA.

Ein limitierender Faktor für den Erfolg von Ataluren ist der zelluläre NMD-Mechanismus. NMD erkennt mRNA-Moleküle mit vorzeitigen Stoppcodons und führt deren Abbau herbei, um die Akkumulation fehlerhafter Proteine zu verhindern. In den vorliegenden Analysen konnte festgestellt werden, dass die Expression von CHM-mRNA bei Patienten mit Nonsense-Mutationen variiert. In einigen Fällen ist die Restexpression so gering, dass eine erfolgreiche Readthrough-Therapie unwahrscheinlich erscheint.

Daher sollte in zukünftigen Studien untersucht werden, ob eine Kombinationstherapie aus Ataluren und einer NMD-Inhibition den Therapieerfolg verbessern kann. Es gibt bereits Hinweise darauf, dass die Hemmung von NMD durch pharmakologische Substanzen wie SMG1-Inhibitoren die Menge an verfügbarer CHM-mRNA erhöhen kann, wodurch Ataluren effektiver wirken könnte. [65]

Ataluren wurde bereits in anderen genetisch bedingten Erkrankungen mit Nonsense-Mutationen untersucht, darunter Duchenne-Muskeldystrophie (DMD) und zystische Fibrose. In beiden Erkrankungen konnte gezeigt werden, dass eine ausreichende Restexpression von mRNA notwendig ist, damit Ataluren eine funktionale Proteinsynthese ermöglichen kann. Dies zeigt, dass eine Präselektion der Patienten auf Basis der mRNA-Expression auch für eine potenzielle Therapie der Chorioideremie mit Ataluren essenziell ist. [66] [67]

Die vorliegenden Ergebnisse legen nahe, dass eine Therapie mit Ataluren gezielt für Patienten mit nachweisbarer *CHM*-mRNA konzipiert werden muss. Dies erfordert vor der Behandlung eine molekulargenetische Diagnostik inklusive RNA-Analysen, um Patienten zu identifizieren, die am ehesten von einer Readthrough-Therapie profitieren könnten.

Die Studie von Moosajee et al liefert wichtige Daten zur Wirksamkeit von Ataluren (PTC124) in zwei Chorioideremie-Modellen: einem Zebrafisch mit UAA-Nonsense-Mutation und humanen Fibroblasten mit UAG-Mutation. In beiden Modellen konnte durch Ataluren eine

Literaturverzeichnis

funktionelle Wiederherstellung der REP1-Aktivität erreicht werden, obwohl in den menschlichen Zellen kein REP-1 Protein nachweisbar war. Diese Ergebnisse belegen, dass bereits geringe Mengen funktionellen Proteins für eine therapeutische Wirkung ausreichen können. Zudem wurde gezeigt, dass die Effizienz vom spezifischen Stoppcodon abhängt. Darüber hinaus verdeutlichen die unterschiedlichen mRNA Level zwischen Zebrafisch (42% Restexpression) und humanen Fibroblasten (13%) die Rolle von NMD. Die Autoren schlagen eine Kombination aus Ataluren und NMD-Inhibition vor, um die mRNA-Verfügbarkeit zu erhöhen und die Wirksamkeit der Therapie zu verbessern. Ein signifikanter Unterschied zwischen behandelten Fibroblastenzelllinien sowohl mit PTC124 (Ataluren) als auch mit seinem Analogen PTC-414 und unbehandelten Zelllinien konnte jedoch nicht festgestellt werden. [68]

Die Studie von Sarkar et al. [69] untersuchte die Effizienz des Nonsense-Mediated Decay in verschiedenen Geweben und Zelllinien. Die Autoren zeigten, dass Patienten mit Nonsense-Mutationen im *CHM* Gen im Durchschnitt eine 2,8fach reduzierte mRNA-Expression aufwiesen, allerdings mit großer Streuung, selbst bei identischer Mutation. Dies deutet darauf hin, dass der NMD stark variiert und nicht ausschließlich von der Mutation oder ihrer Position abhängt. Die Studie macht zudem deutlich, dass es bislang keine klare Genotyp-Phänotyp-Korrelation hinsichtlich der mRNA-Expression oder der Effizienz des NMD gibt.

Torriano et al [70] untersuchten Effekte von Ataluren (PTC124) bei einer *CHM*-Nonsense-Mutation in Fibroblasten und aus Stammzellen gewonnenen RPE-Zellen von Patienten. Trotz messbarer mRNA-Restexpression (etwa 20% des Wildtyps) konnte weder eine signifikante Zunahme der mRNA durch Ataluren noch eine nachweisbare REP1-Proteinexpression beobachtet werden. Auch die Kombination mit einem Proteasom-Inhibitor oder einem NMD-Hemmer führte nicht zu einer erhöhten REP-1 Detektion oder zu einer Funktionsverbesserung. Dies legt nahe, dass entweder kein effektiver Read-through stattfand oder das resultierende Protein rasch abgebaut wurde bzw. funktionell nicht intakt war. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass der therapeutische Nutzen von Ataluren stark mutationsspezifisch ist.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass einige Sequenzvariationen dem Nonsense-mediated Decay entgingen. Es konnte anhand der Sequenzvariation nicht vorhergesagt werden, in welcher Menge der Nonsense-mediated Decay umgangen werden konnte.

Die Transkription von *CHM*-Allelen mit Sequenzvariationen bei Konduktorinnen kann aufgrund einer zufälligen Verteilung der abgelesenen Genkopie in Lymphozytenkulturen verzerrt sein, auch wenn das *CHM*-Gen der Lyonisierung entgeht. Dies könnte die sequenzvariationsunabhängige Verringerung der Transkripte in den Proben der

Literaturverzeichnis

Konduktorinnen erklären. Die variable Betroffenheit der Lymphozytenspenderinnen könnte mit der zufälligen X-Inaktivierung der Zellen zu tun haben, welche ein genetisches Mosaik verursacht.

Daher müssen mindestens zwei Arten von Sequenzvariationen im *CHM*-Gen in Betracht gezogen werden:

- 1) Sequenzvariationen, die eine mRNA produzieren welche translatiert werden kann, und
- 2) Sequenzvariationen, die die Produktion einer übersetzbaren mRNA verhindern (z.B. Deletionen, die mehrere Exons abdecken).

4.3. Ausblick

Als nächster logischer Schritt wäre eine Untersuchung auf Proteinebene sinnvoll, um zu klären ob und in welchem Umfang tatsächlich funktionelle REP1-Proteinprodukte gebildet werden. Dies wurde mittels Western Blot versucht, gelang jedoch aufgrund mangelnder Sensitivität der Antikörper nicht. Es konnte keine isolierte Bande des REP1-Proteins mit den zur Verfügung stehenden Antikörpern dargestellt werden. Für zukünftige Studien wäre daher der Einsatz von sensitivierten, validierten Antikörpern oder alternativ massenspektrometrische Methoden, mit denen selbst geringe Mengen Protein detektiert und quantifiziert werden können, empfehlenswert. Nur durch zuverlässige Proteinanalysen lässt sich auch u.a. das therapeutische Potenzial von Readthrough Therapien bewerten.

Ebenso könnten die Auswirkungen der posttranslationalen Qualitätskontrollmechanismen untersucht werden.

Hierfür könnten die Proteine mit entsprechenden Inhibitoren behandelt werden um herauszufinden an welcher Stelle der Proteinqualitätskontrolle es zum Abbruch bzw. zur Apoptose kommt.

Hierfür sollten zwei Prozesse überprüft werden:

1. Der ERAD (Endoplasmatic reticulum associated protein degradation), ist ein spezifischer Mechanismus, der fehlerhafte oder falsch gefaltete Proteine im endoplasmatischen Retikulum erkennt und abbaut. Da REP1 posttranslational modifiziert wird und zum Teil durch das ER geschleust wird, ist es möglich, dass durch Readthrough entstandene Varianten fehlerhaft gefaltet werden und über diesen Weg abgebaut werden, bevor sie aktiv werden können. Um diesen Prozess experimentell zu analysieren, bietet sich die Verwendung von Eeyarestatin I (ESI), einem ERAD Inhibitor, an. [71]

Literaturverzeichnis

2. Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) dient hauptsächlich dem Abbau von fehlerhaften, beschädigten oder nicht mehr benötigten Proteinen. Es ist der zentrale Mechanismus für den Abbau von zytosolischen Proteinen. Dies geschieht in einem Prozess, der als ubiquitinabhängiger Proteinabbau bezeichnet wird. Das Proteasom besteht aus zwei Hauptkomponenten und befindet sich sowohl im Zellkern als auch im Zellplasma. Die Behandlung von Zellen mit Proteasom-Inhibitoren wie MG132 könnte helfen zu klären, ob REP1 überhaupt produziert, aber anschließend eliminiert wird. [72]

Nicht nur die Erzeugung des Proteins durch Readthrough-Therapien sondern auch das Stabilisieren, Falten und der Schutz des Abbaus spielen eine große Rolle und könnten so für zukünftige Therapienentwicklungen in Betracht gezogen werden.

Ein Teil der Ergebnisse dieser Arbeit wurde als Poster auf der ISER (International Society for Eye Research) 2012 in Berlin vorgestellt. Die Gesamtergebnisse wurden als Poster auf der ARVO (Association for Research and Vision in Ophthalmology) 2013 in Seattle vorgestellt. [73]

5 Zusammenfassung

Chorioideremie ist eine x-chromosomal rezessiv vererbte Netzhautdegeneration, die durch Mutationen im *CHM*-Gen verursacht wird. Ziel der Arbeit war es die Expression des *CHM*-Gens auf mRNA-Ebene in Lymphozytenkulturen von betroffenen männlichen Patienten sowie Konduktorinnen mit verschiedenen *CHM*-Sequenzvariationen zu untersuchen.

Mittels quantitativer Real-Time-PCR (qRT-PCR) und Gelelektrophorese wurden Expressionsmuster analysiert. Es zeigte sich, dass Konduktorinnen – abhängig von der X-Inaktivierung (Lyonisierung) - sowohl mutierte als auch Wildtyp-Allele exprimieren können. Manifestierende Konduktorinnen wiesen dabei eine tendenziell höhere Expression des mutierten Allels auf. Bei männlichen Patienten wurden je nach Mutationsart unterschiedliche Mengen an mRNA nachgewiesen. Insbesondere bei Nonsense-Mutationen konnte trotz des Nonsense-mediated Decay (NMD) in vielen Fällen reduzierte, aber nachweisbare mRNA-Expression festgestellt werden. Hingegen produzierten Patienten mit großen Deletionen keine detektierbare mRNA.

Ein Ziel war die Bewertung zur Eignung einer Readthrough-Therapie mit Ataluren. Diese zielt darauf ab, vorzeitige Stoppcodons zu überlesen um eine vollständige Translation zu ermöglichen. Nur bei Patienten mit nachweisbarer mRNA kommt dies in Frage. Studienergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass der therapeutische Effekt stark von der spezifischen Mutation, der mRNA-Stabilität sowie dem Ausmaß des NMD abhängt. Zudem könnten zelluläre Proteinqualitätskontrollsysteme wie ERAD und das Ubiquitin-Proteasom-System die Effektivität durch den Abbau von partiell funktionellen Proteinen zusätzlich begrenzen.

Diese Arbeit leistet einen Beitrag zum Verständnis der molekularen Grundlagen der Chorioideremie und zur Entwicklung mutationsspezifischer Therapieansätze

Für zukünftige Studien wird eine Untersuchung auf Proteinebene empfohlen, um die tatsächliche Produktion funktioneller REP-1 Proteine vor und nach Readthrough-Therapie zu verifizieren.

6 Summary

Choroideremia is an X-linked recessive retinal degeneration caused by mutations in the *CHM* gene. The aim of this study was to investigate the expression of the *CHM* gene at the mRNA level in lymphocyte cultures from affected male patients and female carriers with various *CHM* gene sequence variants.

Expression patterns were analyzed using quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and gel electrophoresis. It was shown that female carriers – depending on the degree of X-chromosome inactivation (lyonization) - can express both mutated and wild-type alleles. Symptomatic carriers tended to express the mutated allele at a higher level. In male patients, varying levels of mRNA were detected depending on the mutation type. Particularly in cases of nonsense mutations, reduced but still detectable mRNA expression was often observed despite the presence of nonsense-mediated decay (NMD). In contrast, patients with large deletions did not produce any detectable mRNA.

One of the study's objectives was to evaluate the suitability of readthrough therapy using Ataluren. This therapy aims to bypass premature stop codons to allow full-length protein translation. It is only applicable to patients with detectable mRNA. However, study results suggest that therapeutic efficacy is highly dependent on the specific mutation, mRNA stability, and the extent of NMD. Additionally, cellular protein quality control mechanisms such as ERAD and the ubiquitin-proteasome system may further limit efficacy by degrading partially functional proteins.

This work contributes to a better understanding of the molecular basis of choroideremia and the development of mutation-specific therapeutic approaches. For future studies, protein-level analysis is recommended to verify the actual production of functional REP1 proteins before and after readthrough therapy.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Lang, G., Augenheilkunde, Stuttgart, 2008.
- [2] Grehn, F., Augenheilkunde, Würzburg: Springer, 2006.
- [3] Nickla, D.L. Wallman, J., The multifunctional choroid, (2010) Prog Retin Eye Res.; 29(2): 144–168.
- [4] Maclaren, R., Retinal gene therapy in patients with choroideremia: initial findings from a phase 1/2 clinical trial, (2014) Lancet 383:1129-37.
- [5] Barnard, A.R., Gene Therapy for Choroideremia using an adeno-associated viral (AAV) vector, 5 (3): a017293 Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, .
- [6] Sorsby, A., Franceschetti, A, Joseph, R. et al., Choroideremia - Clinical and Genetic Aspects, British Journal of Ophthalmology, 1952 Oct; 36(10): 547–581. Oktober 1952.
- [7] Cremers, F.P., Brunsmann, F., Berger, W., et al. , Cloning of the breakpoints of a deletion associated with choroideremia, (1990) Hum.Genet 86: 61-64,.
- [8] Khan, K.N., Islam, F., Moore, A.T., et al. , Clinical and Genetic Features of Choroideremia in Childhood, (2016) Ophthalmology 123 (10): 2158-65
- [9] Furgoch, M.J., Mewes-Ares, J., Radziwon, A., et al. , Molecular genetic diagnostic techniques in choroideremia, (2014) Molecular Vision 20: 535–544
- [10] Heon, E., Alabduljalil, T., McGuigan, D., et al. , Visual Function and Central Retinal Structure in Choroideremia, (2016) Investigative ophthalmology & visual science 57 (9): 377 - 387
- [11] Coussa, R.G., Kim, J, Traboulsi, E. Choroideremia: Effect of age on visual acuity in patients and female carriers, (2012) Ophthalmic Genetics 33 (2): 66-73.,
- [12] Jolly, K.J., Groppe, M, Birks, J., et al. , Functional Defects in Color Vision in Patients with Choroideremia, (2015) American Journal of Ophthalmology, 160(4):822-31
- [13] Schatz, P., Ponjavic, V., Andreasson, S. et al. , Clinical Phenotype in a Swedish Family with a Mutation in the IMPDH1 Gene, (1995) Ophthalmic Genetics, 16(4):143-50
- [14] Kärnä, J., Choroideremia. A clinical and genetic study of 84 Finnish patients and 126 female carriers, (1986) Acta Ophthalmol Suppl, 1986:176:1-68.
- [15] Renner, A.B., Flebig, B.S., Cropp, E., et al. , Progression of Retinal Pigment Epithelial Alterations During Long-term Follow-up in Female Carriers of Choroideremia and Report of a Novel CHM Mutation, (2009) Archives of Ophthalmology, 127(7):907-12.
- [16] Macdonald, I.M., Hume, S, Zhai, Y., et al. , Choroideremia, (2021) in GeneReviews [Internet],

Literaturverzeichnis

- [17] Sawa, M., Tamaki, Y, Klancnik, J., et al. , Intraretinal foveal neovascularization in choroideremia (2006) *Retina*, 26(5):585-8.
- [18] Jolly, J.K., Edwards, T., Moules, J., et al. , A Qualitative and Quantitative Assessment of Fundus Autofluorescence Patterns in Patients with Choroideremia, (2016) *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, ;57(10):4498-4503
- [19] Preising, M.N., Wegscheider, E., Friedburg, C., et al. , Fundus autofluorescence in carriers of choroideremia and correlation with electrophysiologic and psychophysical data., (2009) *American Journal of Ophthalmology*, 116(6):1201-9.e1-2
- [20] Renner, A.B., Kellner, U., Cropp, E., et al. , Choroideremia: variability of clinical and electrophysiological characteristics and first report of a negative electroretinogram. *Ophthalmology.*, (2006) *American Journal of Ophthalmology*, 113(11):2066.e1-10
- [21] Patel, R.C., Gao, S., Zhang, M. et al. , OPTICAL COHERENCE TOMOGRAPHY ANGIOGRAPHY OF CHOROIDAL NEOVASCULARIZATION IN FOUR INHERITED RETINAL DYSTROPHIES, (2016) *Retina*, 36(12):2339-2347
- [22] Macdonald, I.M., Mah, D., Ho, Y., et al. , A practical diagnostic test for choroideremia., (1998) *American Journal of Ophthalmology*, Volume 105, Issue 9, Pages 1637–1640,
- [23] Sergouniotis, P.I., Davidson, A., Lenassi, E., et al. , Retinal Structure, Function, and Molecular Pathologic Features in Gyrate Atrophy, (2012) *American Journal of Ophthalmology*, 119(3):596-605
- [24] Hartong, D.T., Berson, E.L., Dryja, T.P. , Retinitis pigmentosa, (2006) *The Lancet*, Volume 368, No. 9549, p1795–1809,
- [25] Tsang, S.H., Sharma, T., (2018) X-Linked Retinitis pigmentosa, (2018) *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2018:1085:31-35
- [26] Ahmed, Z.M., Riazuddin, S., Wilcox, E.R. , (2003) The molecular genetics of Usher syndrome, *Clinical genetics*, 63(6):431-44.
- [27] Tsang, S.H., Aycinena, A., Sharma, T. , Ciliopathy: Usher Syndrome, (2018) *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2018:1085:167-170
- [28] Halford, S., Liew, G., Mackay, D.S., Detailed Phenotypic and Genotypic Characterization of Bietti Crystalline Dystrophy, (2014) *American Journal of Ophthalmology*, Volume 121, Issue 6, Pages 1174–1184,
- [29] Lukashev, A.N. , Zamyatnin, A. , Viral Vectors for Gene Therapy: Current State and Clinical Perspectives, (2016) *Biochemistry (Moscow)*, 81(7):700-8,
- [30] Anand, V. , Barral, D.C. , Zeng, Y. et al., Gene therapy for choroideremia: in vitro rescue mediated by recombinant adenovirus, (2003) *Vision Research* Pages 919-926,

Literaturverzeichnis

- [31] Tolmachova, T., Tolmachov, O., Barnard, A.R., et al., Functional expression of Rab escort protein 1 following AAV2-mediated gene delivery in the retina of choroideremia mice and human cells ex vivo, (2013) *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 91(7):825-837.
- [32] Zinkernagel, R., MacLaren, R. , Recent advances and future prospects in choroideremia, (2015) *Clinical Ophthalmology*, 9: 2195–2200
- [33] Lam, B.L., Davis, J.L., Gregori, N.Z., Choroideremia Gene Therapy, (2021) *International Ophthalmology Clinics*, 61(4): 185–193
- [34] Abbouda, A., Avogaro, F., Moosajee, M. , et al. , Update on Gene Therapy Clinical Trials for Choroideremia and Potential Experimental Therapies,(2021) *Medicina*, 57(1): 64
- [35] Kapetanovic, J. C., Patricio, M.I., Maclaren, R.E., Progress in the development of novel therapies for choroideremia,(2019) *Expert Rev Ophthalmol*, 14(6):277-285
- [36] Busskamp, V., Duebel, J., Balya, D. et al., Genetic reactivation of cone photoreceptors restores visual responses in retinitis pigmentosa, (2010) *Science*23;329(5990):413-417
- [37] Hamm, H., The Many Faces of G Protein Signaling, (1988) *Journal of Biological Chemistry*, 9;273(2):669-672
- [38] Kalra, D., Elsaesser, R., Gu, Y. et al. , Transducin in Rod Photoreceptors: Translocated When not terminated, (2007) *Journal of Neuroscience*, 27 (24) 6349-6351,
- [39] Colliceli, J., Human RAS superfamily proteins and related, (2004) *Sci STKE*, 2004(250):RE13.
- [40] Touchot, N. , Chardin, P., Tavitian, A., Four additional members of the ras gene superfamily isolated by an oligonucleotide strategy: molecular cloning of YPT-related cDNAs from a rat brain library.,(1987) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(23): 8210–8214,
- [41] Kelly, E.E., Horgan, C. P., Goud, B. et al. , The Rab family of proteins: 25 years on, (2012) *Biochemical Society Transactions*, 1;40(6):1337-1347
- [42] Ferguson, M. , Lipid anchors on membrane proteins, (1991) *Current Opinion in Structural Biology*, Volume 1, Issue 4, August 1991, Pages 522-529
- [43] Guo, Z. , Wu, Y. , Das, D. et al. , Structures of RabGGTase–substrate/product complexes provide insights into the evolution of protein prenylation, (2008) *The Embo Journal* 27(18): 2444–2456. , 2008.
- [44] Leung, K.F. , Baron, R. , Seabra, M.C. , Thematic Review Series: Lipid Posttranslational Modifications; Geranylgeranylation of Rab GTPases, (2006) *Journal of Lipid Research*, 47:467–475

Literaturverzeichnis

- [45] Alexandrov, K., Horiuchi, H., Steele-Mortimer, O. et al. , Rab escort protein-1 is a multifunctional protein that accompanies newly prenylated Rab proteins to their target membranes., (1994) The EMBO Journal, 13(22): 5262–5273
- [46] Stenmark, H., Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic., (2009) Nature Reviews Molecular Cell Biology, pages 513–525 .
- [47] van den Hurk, J. A. , Schwartz, M. , van Bokhoven, H. et al. , Molecular Basis of Choroideremia (CHM): Mutations involving the Rab Escort Protein-1 (REP-1) Gene, (1997) Human Mutation, 9:110–117
- [48] Simunovic, S.P. , Jolly, J.K. , Xue, K. et al. , The Spectrum of CHM Gene Mutations in Choroideremia, (2016) Investigative Ophthalmology & Visual Science, 57(14): 6033–6039
- [49] Di, Iorio V. , Esposito, G. , De Falco, F. et al. , CHM/REP1 Transcript Expression and Loss of Visual Function in Patients Affected by Choroideremia, (2019) Investigative Ophthalmology & Visual Science, 60(5):1547-1555
- [50] Wuthisiri, W., Lingao, M.D., Capasso, J.E. et al. , Lyonization in Ophthalmology, (2013) Current Opinion in Ophthalmology 24(5):389-399
- [51] Brown, C. J. , Ballabio, A. , Rupert, J. L. et al. , A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome, (1991) Nature, 349(6304):38-44
- [52] Carrel, L., Willard, H. F. , X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females, (2005) Nature, pages 400–404
- [53] Carrel, L., Willard, H.F. , Heterogeneous gene expression from the inactive X chromosome: An X-linked gene that escapes X inactivation in some human, (1999) Proceedings of the National Academy of Sciences, 6 (13) 7364-7369,
- [54] Willer, M. , Molekulargenetische Untersuchungen zur Expression von Sequenzveränderungen im REP-1 Gen bei heterozygoten Trägerinnen, (2009) Dissertation, Universität Regensburg
- [55] Horn, F. , Biochemie des Menschen, 8. Auflage, 2020
- [56] Bartlett, J. M. , Stirling, D. , A short history of the polymerase chain reaction, (2003) Methods in Molecular Biology, 2003:226:3-6
- [57] Müller, H. J. , Prange, D. R. , "PCR - Polymerase Ketten Reaktion", Springer Verlag, 2016
- [58] Baltimore, D. , RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses, (1970) Nature, 226(5252):1209-1211
- [59] Dorak, M.T. , "Real-time PCR", BIOS Advanced Methods, 2006

Literaturverzeichnis

- [60] Harshitha, R., Arunraj, D. R. , Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification, (2021) *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 49(5):800-812
- [61] Livak, K. J. , Schmittgen, T. D. , Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2DeltaDelta CT Method, (2001) *Methods* , El Sevier.
- [62] Voytas, D., Agarose Gel Electrophoresis, (2001) *Current Protocols in Immunology*, Chapter 10:10.4.1-10.4.8.
- [63] Karousis, E.D. , Nasif, S. , Mühlemann, O. , Nonsense-mediated mRNA decay: novel mechanistic insights and biological impact, (2016) *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 7(5):661–682
- [64] Du, L. , Damoiseaux, R. , Nahas, S. et al. , " Nonaminoglycoside compounds induce readthrough of nonsense mutations," (2009) *The Journal of Experimental Medicine*, 206(10):2285-2297
- [65] Kurosaki, T. , Popp M.W., Maquat L.E. , "Quality and quantity control of gene expression by nonsense-mediated mRNA decay" (2019) *Nat Rev Mol Cell Biol.* 20(7):406–20
- [66] Bushby, K. , Finkel, R. , Wong, B. , et al. , "Ataluren treatment of patients with nonsense mutation dystrophinopathy" (2014) *Muscle Nerve* 50(4):477–487
- [67] Sermet-Gaudelus, I. , Boeck, K.D. , Casimir, G., et al., "Ataluren (PTC124) induces cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein expression and activity in children with nonsense mutation cystic fibrosis". (2010) *Am J Respir Crit Care Med.* 182(10):1262–72
- [68] Moosajee, M. , Tracey-White, D., Smart, M. , et al. , „Functional rescue of REP1 following treatment with PTC124 and novel derivative PTC-414 in human choroideremia fibroblasts and the nonsense-mediated zebrafish model," (2016) *Hum.Mol.Genet.* 25(16):3416-3431
- [69] Sarkar, H. , Mitsios, A. , Smart, M. , et al. , „Nonsense-mediated mRNA decay efficiency varies in choroideremia providing a target to boost small molecule therapeutics“ (2019) *Hum.Mol.Genet*, 28(11): 1865-1871
- [70] Torriano, S. , Erkilic, N. , Baux, D. , et al. , "The effect of PTC 124 on choroideremia fibroblast and iPSC-derived RPE raises considerations for therapy," (2018) *Scientific Reports* ,8 (1): 8234-26481 2018.
- [71] Benyair, R., Ron, E., Lederkremer G.Z., „Protein Quality Control, Retention and Degredation at the Endoplasmatic Reticulum“ (2011) *International Review of Cell and Molecular Biology*, Volume 292, Pages 197-280

Literaturverzeichnis

[72] Tanaka, K. , „The proteasome: Overview of structure and functions,“ (2009) Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 85(1):12–36

[73] Preising, M. , Alavi, N. , Lorenz, B., "Impact of CHM Mutations at the mRNA level" (2013) Investigative Ophthalmology & Visual Science, Vol 54, 1330

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schichtaufbau der Netzhaut.....	2
Abbildung 3.1: Quantitative Analyse der RT-PCR Produkte der männlichen Patienten.....	28
Abbildung 3.2: Quantitative Analyse der RT-PCR Produkte bei Konduktorinnen	28
Abbildung 3.3: RT-PCR Produkte der Kontrollen	29
Abbildung 3.4: RT-PCR Produkte aller Sequenzvariationen	29

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Zusammenstellung der in dieser Arbeit untersuchten Sequenzvariationen.....	12
Tabelle 2.2: Geräte.....	14
Tabelle 2.3: Chemikalien	15
Tabelle 2.4: Stammlösungen	15
Tabelle 2.5: Kits.....	15
Tabelle 2.6: Verwendete Oligonukleotidprimer	21
Tabelle 2.7: PCR-Zyklus.....	22
Tabelle 3.1: Durch die qRT-PCR ermittelte CT-Werte (Mittelwerte aus drei Ansätzen) mit Duplikationen:	24
Tabelle 3.2: Durch die qRT-PCR ermittelte CT-Werte bei Sequenzvariationen mit Transitionen (Punktmutation).....	25
Tabelle 3.3: Durch die qRT-PCR ermittelte CT-Werte bei Sequenzvariationen mit Insertionen	25
Tabelle 3.4: Durch die qRT-PCR ermittelte CT-Werte bei Sequenzvariationen mit Deletionen	26
Tabelle 3.5: Durch die qRT-PCR ermittelte CT-Werte bei Sequenzvariationen mit Splice Site Mutationen	26
Tabelle 3.6: Durch die qRT-PCR ermittelte CT-Werte bei Sequenzvariationen mit Missense Mutationen und bei männlichem Normprobanden	26
Tabelle 3.7: Quantitative Darstellung der Sequenzvarianten nach der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode	27

10 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, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. 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.“

Schwetzingen den 22.04.2025

Nayyir Emil Alavi

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.

The curriculum vitae was removed from the electronic version of the paper.

12 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. Markus Preising für die vertrauensvolle Betreuung, die stets wertvolle wissenschaftliche Unterstützung sowie die Möglichkeit, meine Arbeit im Rahmen des Labors für molekulare Ophthalmologie der Augenheilkunde durchführen zu dürfen. Ebenso danke ich dem ganzen Team des Labors für die fachliche Begleitung, die kollegiale Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima.

Meinen Eltern gilt mein Dank für ihre langjährige Unterstützung und ihren Rückhalt über all die Jahre.

Meiner Ehefrau Katharina danke ich von Herzen für ihre Geduld, ihr Verständnis und ihre beständige Ermutigung.