

**Funktionelle Untersuchungen zur Aktivität von Sequenzvarianten im Promotor
des *PRDM13*-Gens**

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

vorgelegt von Zlobin, Christian
aus Gelnhausen

Gießen 2025

**Funktionelle Untersuchungen zur Aktivität von Sequenzvarianten im Promotor
des *PRDM13*-Gens**

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

vorgelegt von Zlobin, Christian
aus Gelnhausen

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. Andreas Bräuninger

Tag der Disputation: 27.04.2026

Inhaltsverzeichnis

Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	<i>Genetische Grundlagen</i>	1
1.1.1	Das Genom	1
1.1.2	Transkription	1
1.1.3	Translation.....	2
1.2	<i>Grundlagen der Genregulation</i>	3
1.2.1	Genregulation.....	3
1.2.2	Promotor	4
1.2.3	Transkriptionsfaktoren.....	4
1.2.4	Enhancer	5
1.2.5	Silencer.....	6
1.3	<i>Genomvariationen</i>	6
1.4	<i>Die Makula des Auges</i>	8
1.5	<i>North-Carolina Macular Dystrophie (NCMD).....</i>	8
1.5.1	Grundlagen der NCMD.....	8
1.5.2	Unterteilung der NCMD nach ihrem Phänotyp.....	9
1.5.3	Weitere hereditäre makuläre Dystrophien	10
1.5.4	Genetische Grundlagen der NCMD.....	12
1.5.5	Das <i>PRDM13</i> -Gen.....	13
1.6	<i>Zielsetzung.....</i>	15
2	Material und Methoden.....	16
2.1	<i>Geräte und Verbrauchsmaterialien</i>	16
2.1.1	Chemikalien	16
2.1.2	Enzyme.....	17
2.1.3	Stammlösungen	18
2.1.4	Wirtszellen.....	19
2.1.5	Verbrauchsmaterialien.....	19
2.1.6	Geräteliste	21
2.1.7	Computerapplikationen	23
2.1.8	Primer.....	23
2.1.9	pGL4- <i>PRDM13</i> -PROM Reporter (PROM-Plasmid).....	26
2.1.10	pGL4- <i>PRDM13</i> -PROM-Promotor-Kontroll-Region (PPKR) (WT-Plasmid).....	27

Inhaltsverzeichnis

2.1.11	pGL4-PRDM13-PROM-Promotor-Kontroll-Region mit klonierter PKR Klon 2K3 und 3K4.....	28
2.2	Molekularbiologische Methoden	30
2.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	30
2.2.2	Ortsspezifische Mutagenese.....	33
2.2.3	Elektrophorese	34
2.2.4	Agarosegel	35
2.2.5	Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese	35
2.2.6	Nucleinsäureisolation aus Agarose-Gel.....	36
2.2.7	Messung von Konzentrationen mittels Spektralphotometer	38
2.2.8	Ligation.....	38
2.2.9	Bakterienzellkulturen.....	39
2.2.10	Transformation	40
2.2.11	Durchführung der Elektrotransformation von Bakterien	41
2.2.12	Isolation der Bakterienkolonie.....	41
2.2.13	Isolation von Plasmiden aus den E. coli Kolonien	42
2.2.14	Prinzip der DNA-Sequenzierung.....	45
2.2.15	Bakterienstammkulturen	46
2.2.16	Zellkultur mit HEK-293 Zellen	46
2.2.17	Transfektion der HEK-293 Zellen	47
2.2.18	RNA-Isolation aus HEK-293 Zellen.....	48
2.2.19	Kapillarelektrophorese	50
2.2.20	Durchführung der RNA-Analyse nach QIAxcel® RNA Handbuch	51
2.2.21	Reverse Transkriptase Reaktion.....	51
2.2.22	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion: (qPCR)	52
2.2.23	Farbstoffbasierte qPCR.....	53
2.2.24	$\Delta\Delta$ CT-Methode zur Auswertung der qPCR.....	54
3	Ergebnisse.....	56
3.1	Kontrolle der hergestellten Primer	56
3.2	Nachweis von Sequenzvariationen in den hergestellten Plasmiden	57
3.3	Auswertung der Stichproben für die Transfektion.....	58
3.4	Auswertung der RNA-Isolierung und Analyse	60
3.5	Auswertung der RT-Reaktion zur Herstellung von dsDNA	62
3.6	Auswertung der qPCR zur Messung der Plasmidexpressivität	63
4	Diskussion.....	68

Inhaltsverzeichnis

4.1	<i>Einleitung: die Relevanz</i>	68
4.2	<i>Bewertung des Versuchsansatzes</i>	69
4.3	<i>Bewertung der verwendeten Methodik</i>	69
4.4	<i>Interpretation der Ergebnisse</i>	78
4.4.1	Bewertung der Qualität der Plasmide.....	78
4.4.2	Interpretation der qPCR der jeweiligen Sequenzvariationen.....	79
4.4.3	Beurteilung der Signifikanz der Ergebnisse.....	82
4.4.4	Beurteilung der Promotor-Kontroll-Region des <i>PRDM13</i> -Gens.....	84
4.5	<i>Aktueller Forschungsstand zu NCMD</i>	85
4.5.1	Bewertung des Einflusses von <i>PRDM13</i> auf die Entwicklung der NCMD.....	85
4.5.2	Weitere Sequenzvariationen im und um das <i>PRDM13</i> -Gen.....	86
4.6	<i>Zukünftige Forschungsansätze – Ein Ausblick</i>	87
4.6.1	Forschungsansätze im Hinblick auf die untersuchten Sequenzvariationen.....	87
4.6.2	Ausblicke hinsichtlich diagnostischer und therapeutischer Maßnahmen der NCMD.....	89
5	Zusammenfassung	92
6	Summary	93
7	Tabellenverzeichnis	94
8	Abbildungsverzeichnis	95
9	Abkürzungsverzeichnis	96
10	Literaturverzeichnis	98
11	Publikationsverzeichnis	108
12	Ehrenwörtliche Erklärung	109
13	Danksagungen	110

1 Einleitung

1.1 Genetische Grundlagen

1.1.1 Das Genom

Die Gesamtheit aller genetischen Informationen von Viren, Bakterien und mehrzelligen Organismen wird in der Genetik als Genom zusammengefasst (25). In Eukaryonten ist die genetische Information im Zellkern, den Mitochondrien und in Plasmiden lokalisiert, während in Prokaryonten das Genom frei im Zytoplasma flottiert. Prokaryonten besitzen zudem extrachromosomale DNA-Fragmente, welche unabhängig von der genomischen Replikation repliziert werden können. Der Träger der vollständigen Erbanlagen wird hierbei als Desoxyribonukleinsäure (kurz: DNA) zusammengefasst. Sie ist aus Nukleotiden aufgebaut welche einen definierten Abschnitt des DNA-Stranges ausmachen. Nukleotide bestehen dabei aus drei Bestandteilen: Einem Monosaccharid, einer von vier Basen (Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin) und einem Phosphatrest. Die spezifische Abfolge der Nukleotide in den DNA-Strängen ist für die Erbinformation und die Herstellung von RNA-Molekülen entscheidend. Hierzu werden die Nukleotide im Rahmen der Transkription in ihrer Anordnung abgelesen (77).

1.1.2 Transkription

Der Prozess der RNA-Synthese wird als Transkription bezeichnet. In eukaryotischen Zellen gibt es nach aktuellem Wissensstand mehrere Arten von RNA, welche synthetisiert werden (25). Die drei bekanntesten Arten der RNA, welche eine wesentliche Rolle in der Proteinbiosynthese spielen, werden als Messenger-RNA (mRNA), Transfer-RNA (tRNA) und ribosomale RNA (rRNA) bezeichnet (109). Die RNA liegt in Form eines Einzelstranges vor. Die Einzelstrangstruktur der RNA ermöglicht es ihr, sich einfacher zu falten und somit variable Konformationen anzunehmen (95). Gleichzeitig geht die Einzelstrangstruktur mit einer verminderten thermodynamischen Stabilität der RNA im Vergleich zur DNA-Doppelhelix einher (25). Deswegen werden RNA-Moleküle mittels Bildung von Sekundärstrukturen, post-transkriptionaler Modifikation oder Bindung an Proteine stabilisiert, um sie und die darin enthaltene genetische Information vor einem enzymatischen Abbau durch RNasen zu schützen. Dabei wird die DNA als Vorlage in mRNA umkopiert und enthält die genetische Information, die für die Synthese eines Proteins benötigt wird (109). Sie wird während der Transkription im Zellkern synthetisiert,

1. Einleitung

modifiziert und verlässt dann den Zellkern, um in das Zytoplasma der Zelle zu gelangen, wo die Proteinsynthese stattfindet (25). Dort dient sie als Vorlage zur Herstellung des entsprechenden Proteins.

Entscheidendes Enzym der RNA-Synthese ist die RNA-Polymerase. Diese benötigt, anders als die DNA-Polymerase, keine Primer für den Synthesebeginn, sondern kann mittels Bindung an eine Promotorsequenz des DNA-Stranges direkt mit der Synthese beginnen (25). Dennoch sind neben der Promotorsequenz noch weitere Proteinfaktoren für die Initiation der Transkription bedeutend. Die RNA-Polymerase transkribiert den DNA-Strang in 3'→5' Richtung, bis sie ein Terminationssignal erreicht. An der Terminationssequenz beendet die RNA-Polymerase die RNA-Synthese.

1.1.3 Translation

Ziel der Translation ist die Umschreibung der genetischen Information einer mRNA in ein Protein. Für den Prozess der Translation sind Ribosomen erforderlich, die die Nukleotidsequenz in eine Aminosäuresequenz übersetzen können (25). Ribosomen bestehen neben Proteinen aus rRNA-Partikeln und kommen vorwiegend im Zytoplasma der Zellen vor. Dabei bestehen Ribosomen aus einer kleinen und einer großen Untereinheit (77). Für die Translation werden neben den Ribosomen noch Elongationsfaktoren, tRNA-Moleküle, Guanosintriphosphat und insbesondere die mRNA benötigt (25). Die mRNA ist in Codons aufgebaut. Ein Codon besteht aus drei aufeinanderfolgenden Basen und enthält die genetische Information für eine entsprechende Aminosäure (76). Die spezifische Abfolge dieser Codons führt zu einer entsprechenden Reihenfolge an Aminosäuren, die während der Translation in ein Protein eingebaut werden. Die Anordnung der Codons wird als Leseraster bezeichnet. Bei der tRNA handelt es sich um ein RNA-Molekül, welches zur Aufgabe hat, Codons der mRNA zu erkennen und diesen in die entsprechende Aminosäure umzucodieren. Dies ist durch das spezifische Anticodon, einer Region in der tRNA, möglich (25, 76). Dabei handelt es sich um ein Element aus drei Nukleotiden, welche spezifisch an die komplementären Basen der mRNA binden. Grundsätzlich erkennt und bindet jede tRNA spezifisch für eine Aminosäure. Diese Aminosäure wird im Ribosom von der tRNA auf die wachsende Polypeptidkette übertragen. Die Translation wird durch das Erkennen der Startcodon-Sequenz AUG (Basentriplett aus Adenin, Uracil und Guanin) mittels des Präinitiationskomplexes initiiert (77). Der Präinitiationskomplex ist dabei ein molekulares Konstrukt aus mRNA, tRNA und den ribosomalen Untereinheiten. Sobald das Startcodon vom Translationskomplex erkannt wurde, beginnt die Elongation. Im

1. Einleitung

Wechsel binden nun mit unterschiedlichen codonspezifischen Aminosäuren beladene tRNAs an den Translationskomplex. Unter Energieverbrauch wird die Aminosäure der tRNA an der P-Stelle im Ribosomen an die synthetisierte Peptidkette übertragen und diese somit verlängert. Dieser Schritt läuft so lange ab, bis eine der drei Stopcodon-Sequenzen (UAA, UGA, UAG) abgelesen wird. Die Translation wird terminiert.

Während in Prokaryoten der Prozess der Translation gleichzeitig mit der Transkription im Zytoplasma der Zelle stattfindet, muss in Eukaryoten der mRNA-Strang zunächst aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert werden (76). Über den Kernporenkomplex des Zellkerns gelangt die mRNA in das Zytoplasma, wo sie dann von Ribosomen abgelesen und in ein Protein übersetzt wird. Die Transkription und Translation laufen jeweils in unterschiedlichen Zellkompartimenten eukaryotischer Zellen ab. Durch diese Trennung können die Zwischenprodukte dieser Prozesse besser kontrolliert und Fehler erkannt werden (25).

1.2 Grundlagen der Genregulation

1.2.1 Genregulation

Unterschiedliche Zellen eines Organismus besitzen prinzipiell dieselbe DNA (45). Worin sich jedoch verschiedene Zelltypen unterscheiden, ist die Menge an synthetisierter mRNA (Transkriptom) und der Proteinmenge (Proteom). Es liegt also eine zellspezifische Genregulation in den unterschiedlichen Zelltypen vor. Sind diese regulatorischen Elemente gestört, können Krankheiten entstehen.

Der größte Einfluss auf die Genregulation von eukaryotischen Zellen findet während der Transkription statt (44). Hier wird am stärksten reguliert, welche mRNA aus dem Genom transkribiert wird und folglich welche Proteine hergestellt werden sollen. Die Steuerung der Transkription kann entweder über die Aktivität der RNA-Polymerase II oder über die Chromatinstruktur der DNA erfolgen. Die Aktivität der RNA-Polymerase kann dabei durch regulatorische Moleküle förderlich oder hinderlich beeinflusst werden. Regulatorische Moleküle können beispielsweise Transkriptionsfaktoren (Enhancer, Silencer) oder Mediatoren in Form von Proteinkomplexen sein (45).

Auch die Chromatinstruktur der DNA spielt eine wesentliche Rolle bei der Transkriptionsrate der DNA und der Herstellung von Proteinen (45). Dies wird durch die Histonmodifikation beeinflusst. Histone sind für die Verpackung der DNA in Chromatin

1. Einleitung

zuständig (25). Durch Modifikation dieser Proteine, wird die Transkription reguliert. Werden Histone mittels des Enzyms Histonacetyltransferase acetyliert, so lockern sich die Bindungen zwischen Histonen und Chromatin (44). Dadurch wird es der RNA-Polymerase ermöglicht, DNA-Sequenzen in RNA zu transkribieren. Liegen die Histone hingegen methyliert vor, können sich diese sowohl förderlich als auch hemmend auf die Transkription der DNA in RNA auswirken.

Im folgenden Absatz wird auf einige Faktoren eingegangen, welche die Genregulation beeinflussen können:

1.2.2 Promotor

In unmittelbarer Nähe zu einem Gen befindet sich ein Bereich der DNA, welcher für die Initiierung der RNA-Synthese verantwortlich ist (25). Dieser Bereich wird als Promotor bezeichnet. Der Promotor besteht dabei aus bestimmten Basenabfolgen, welche von Transkriptionsfaktoren erkannt und gebunden werden. Durch das Anheften von Bindungsproteinen an die Promotorsequenz wird eine Konformationsänderung der DNA erreicht und die RNA-Polymerase an den Ort der Transkription geleitet (25). Jedes Gen hat seinen genspezifischen Promotor, der sich von seiner Länge und Sequenzabfolge von anderen Promotoren anderer Gene unterscheidet (77). In Bakterien sind Promotoren wesentlich kürzer und beinhalten lediglich die Sequenzabfolge, die für die Bindung der entsprechenden RNA-Polymerase erforderlich ist. Promotoren in Eukaryoten sind hingegen deutlich länger und bestehen aus mehreren Elementen. Ein Element ist der Core-Promotor, welcher für die Funktion des Promotors essenziell ist (77). Zusätzlich besteht der Promotor eukaryotischer Zellen aus Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren (25). Beispiele hierfür sind die TATA-Box oder die CAAT-Box, die bei der Initiierung der Transkription von wesentlicher Bedeutung sind. Eukaryotische Promotoren sind also deutlich komplexer aufgebaut als Promotoren von Prokaryoten (77).

1.2.3 Transkriptionsfaktoren

Proteine, welche für die Bindung der RNA-Polymerase an die entsprechende DNA-Sequenz verantwortlich sind, werden als Transkriptionsfaktoren bezeichnet. Transkriptionsfaktoren binden dabei an spezifische DNA-Abschnitte, wie die TATA-Box und können dadurch die Genexpression regulieren (45). Dies erreichen Transkriptionsfaktoren, indem sie der RNA-Polymerase helfen sequenzgenau an die

1. Einleitung

Initiationssequenz des DNA-Stranges zu binden und die Transkription zu initiieren. Dadurch haben Transkriptionsfaktoren einen wesentlichen Einfluss auf die differenzielle Genregulation von eukaryotischen Zellen (45, 25). Transkriptionsfaktoren fördern jedoch nicht nur die Transkription, sondern können diese auch abschwächen. Die abschwächenden Effekte auf die Transkription werden durch Blockierung der transkriptionsfördernden Faktoren, wie Enhancer oder Promotoren erreicht. Bekannte Transkriptionsfaktoren sind die Helix-Turn-Helix-Proteine, die Leucin-Zipper-Proteine, die Zinkfinger-Proteine sowie die Homöodomänen-Proteine (25, 69). Es gibt jedoch noch viele weitere Transkriptionsfaktoren, die die Gen-Regulation von Eukaryoten beeinflussen. Transkriptionsfaktoren spielen auch bei der Entstehung von Krankheiten eine wesentliche Rolle (45). Mutationen in Transkriptionsfaktoren können in eine Überaktivität, Unteraktivität und Inaktivität der RNA-Synthese resultieren und somit zu einem Ungleichgewicht der Genregulation führen.

1.2.4 Enhancer

Enhancer sind spezifische DNA-Elemente und fungieren als Verstärker der Transkription bei Eukaryoten. Die Lokalisation der Enhancer in der DNA ist von Gen zu Gen variabel. Das bedeutet, dass Enhancer sowohl upstream, als auch downstream einer Gensequenz lokalisiert sein können. Enhancer können auch an anderen Chromosomen oder Genabschnitten liegen und dennoch das entsprechende Gen beeinflussen. Die verstärkende Wirkung der Enhancer ist dabei unabhängig von der Lokalisation des Enhancers zum Promotor. Entscheidend ist die Wechselwirkung zwischen dem Enhancer und seinem Promotor. Wichtig hierbei ist, dass der Enhancer nur einen spezifischen Promotor verstärkt und nicht mit mehreren Promotoren interagiert (25). Zu der verstärkenden Wirkung des Enhancers tragen auch Transkriptionsfaktoren bei. Diese binden an spezifische Sequenzen des Enhancers und interagieren mit anderen Bindungsproteinen. Durch diese Bindung werden Enhancer in räumliche Nähe zum Promotor gebracht, wodurch sie in Wechselwirkung treten. Die verstärkte Transkription kann auch damit erklärt werden, dass Enhancer die Fähigkeit besitzen, die repressive Wirkung des Chromatins auf die Transkription teilweise aufzuheben (25). Somit beeinflussen Enhancer die Transkription von Genen und können folglich auch die Expression von Genen wesentlich beeinflussen.

1. Einleitung

1.2.5 Silencer

Silencer sind das Pendant zu Enhancern. Sie reduzieren die Transkriptionswahrscheinlichkeit von Genen und führen zu einer verminderten Expression der Gene (25). Es handelt sich bei Silencern ebenfalls um DNA-Sequenzen, die die Bindung von Transkriptionsfaktoren blockieren können. Sie enthalten spezifische Bindungsstellen für repressive Transkriptionsfaktoren, die in der Lage sind, die Aktivität der RNA-Polymerase und anderer regulatorischer Proteine zu dämpfen. Bei Bindung von repressiven Transkriptionsfaktoren an den Bindungsstellen in den Silencer-Sequenzen können Bindungen von transkriptionsfördernden Transkriptionsfaktoren mit dem Promotor verhindert werden, wodurch die Transkription vermindert erfolgt. Genau wie Enhancer können Silencer weit stromabwärts oder stromaufwärts vom Promotor liegen und diesen dennoch beeinflussen (77). Silencer können neben der verminderten Bindung von Transkriptionsfaktoren an den Promotor auch anderweitig die Transkription modulieren. Einerseits werden sie von Proteinen gebunden, welche dann die Aktivität der RNA-Polymerase einschränken, andererseits können sie die Chromatinstruktur von Genen beeinflussen. Die Chromatinstruktur liegt dann kondensiert vor und erschwert es Transkriptionsfaktoren sowie weiteren an der Transkription beteiligten Proteinen, an die DNA zu binden und die Transkription zu initiieren (43). Silencer sind dabei nicht immer aktiv, sondern können aktiviert werden.

1.3 Genomvariationen

Man spricht von Sequenzvariationen, wenn es zu Veränderungen der Nukleotid-Abfolge in einem DNA-Abschnitt kommt. Durch jede Sequenzvariation kann die Genfunktion, aber auch die Genregulation verändert werden. Dies kann sowohl als stille Mutation verlaufen und somit keine Symptome äußern, aber auch zu schweren Krankheiten führen (76).

Die Ursachen von Sequenzvariationen sind mannigfaltig und hängen nicht immer mit sporadischen externen Einflussfaktoren zusammen, da sie auch genetische Ursachen haben können (25). Externe Faktoren können Umweltfaktoren, Strahlung, chemische Faktoren oder auch Viren sein. Diese können durch ihren Einfluss Sequenzvariationen verursachen. Oft ist das Zusammenspiel mehrerer Faktoren Auslöser von Sequenzvariationen.

1. Einleitung

Es gibt mehrere Mutationsformen, die bei einer Sequenzvariation auftreten. Die Punktmutation ist eine Mutationsform, die lediglich ein Nukleotid betrifft und am häufigsten beobachtet wird (25). Ihr kann eine Insertion, Deletion oder eine Basensubstitution zugrunde liegen. Bei der Missense-Mutation wird aufgrund einer Nukleotidveränderung in einem kodierenden Gen eine andere Aminosäure in das Genprodukt eingebaut. Die Folgen können von keiner Beeinträchtigung der Aktivität bis hin zum kompletten Funktionsverlust eines Proteins reichen.

Wird durch eine Punktmutation in einem kodierenden Gen ein vorzeitiges Stopcodon erzeugt, spricht man von einer Nonsense-Mutation (76). In der Regel kommt es beim vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese zu einem vollständigen Funktionsverlust des Proteins. In manchen Fällen können jedoch auch Teilfunktionen des Proteins erhalten bleiben. Dies ist abhängig von der Lokalisation der Mutation und der Länge des synthetisierten Proteins.

Frameshift-Mutationen treten auf, wenn das Leseraster eines Gens durch die Insertion oder Deletion von Nukleotiden verschoben wird. Dabei ist die Anzahl der Nukleotide nicht durch drei teilbar, was zu einem fehlerhaften Einbau von Aminosäuresequenzen führt. Zwar bleibt das Leseraster gültig, jedoch kann durch dessen Verschiebung die gewünschten Aminosäuresequenzen nicht mehr erhalten werden.

Mutationen können auch in regulatorischen Bereichen, wie dem Promotor vorliegen. Diese Sequenzveränderungen können dann zu Veränderungen in der Expression von Genen führen. Insgesamt kann sich der Einfluss von Sequenzveränderungen im Genom sehr unterschiedlich auf die Funktionalität, Stabilität und die Sinnhaftigkeit der synthetisierten Proteine auswirken (76). Dadurch kann die Funktion zahlreicher Organe des menschlichen Körpers eingeschränkt und beeinflusst werden. Darunter zählt auch die Funktionalität unserer Augen. In der Vergangenheit konnten einige Genomvariationen untersucht werden, welche die Funktion der Augen beeinträchtigt haben. Dabei ist die Netzhaut des Auges ein wichtiges Gewebe, welches durch Genomvariationen beeinflusst wird.

1.4 Die Makula des Auges

Unter der Makula versteht man eine hochspezialisierte Region der Netzhaut, in der das höchste Auflösungsvermögen des menschlichen Auges verortet ist. Sie ist gefäßfrei und wird aufgrund ihres gelben Pigments oft auch als Makula lutea bezeichnet (27). Im Zentrum der Makula liegt die Fovea centralis welche von einer parafovealen retinalen Zone umgeben ist (57). Die Fovea centralis hat einen Durchmesser von etwa 1,5 mm. Aufgrund von ihrer hohen Konzentration an Zapfenzellen, welche für das Farbsehen des menschlichen Auges zuständig sind, wird die Fovea centralis auch als Ort des schärfsten Sehens bezeichnet (27). Neben der hohen Konzentration der Zapfenzellen spielt auch die Verschaltung dieser mit Gliazellen eine entscheidende Rolle bei der Funktion der Makula (57). Die Zapfen werden hierbei, anders als in der restlichen Netzhaut, auf genau eine Zapfenbipolare und folglich auf genau eine Gliazelle umgeschaltet. Dies ermöglicht das hohe Auflösungsvermögen mit einer Sehschärfe von 0,8 bis 1,0 Winkelminuten (27).

1.5 North-Carolina Macular Dystrophie (NCMD)

1.5.1 Grundlagen der NCMD

Die North-Carolina Macular Dystrophie ist eine bekannte, selten auftretende Erkrankung der Makula. Sie folgt einem autosomal-dominanten Vererbungsmuster und tritt typischerweise symmetrisch an beiden Augen auf (90). Sie wird der Gruppe der hereditären makulären Dystrophien zugeordnet und mit Sequenzvariationen auf dem fünften und sechsten Chromosom in Verbindung gebracht.

1971 wurde die NCMD erstmals phänotypisch beschrieben. Dabei wurde die Erkrankung bei einer Familie im US-Bundestaat North-Carolina untersucht (48). Heute wird angenommen, dass drei irische Brüder, welche die Mutation im Gen trugen, im 19. Jahrhundert genau in diesen Ort ausgewandert sind und dort Familien gegründet haben (22). Dadurch kam es zu einer vermehrten Prävalenz der NCMD in dieser Gegend. Bereits in der Erstbeschreibung wurde festgestellt, dass die NCMD eine starke phänotypische Variabilität besitzt (48). Während einige Betroffene starke makuläre Läsionen besaßen, hatten andere lediglich Pigmentablagerungen oder Drusen an der Makula aufzuweisen. Die Ausprägung der NCMD ist dabei von Fall zu Fall individuell. Dies machte es besonders schwer Betroffene, mit anderen Symptomen mit der NCMD in Verbindung zu bringen (85). Insgesamt wurde der Visus der Betroffenen trotz

1. Einleitung

makulärer Degenerationen größtenteils als normwertig beschrieben. Neben dem Visus sind auch die Farbwahrnehmung, die Dunkeladaptation sowie die Ergebnisse des Elektroretinogramms und des Elektrokulogramms normwertig (22). Die von Lefler et al. untersuchten Familie wurde weiterführend untersucht, um mögliche Entwicklungen der Erkrankung zu analysieren. Während anfangs vermutet wurde, dass die NCMD progressiv verläuft, konnte 1991 von K. Small diese Annahme widerlegt werden (86). Dabei ging Small et al. davon aus, dass die NCMD entweder bereits in utero oder zum Zeitpunkt der Geburt vollständig phänotypisch manifestiert ist (86). Grundsätzlich wird der Verlauf der NCMD also nicht als progressiv beschrieben und weist eine starke variable Expressivität des Phänotyps auf (84). Nicht nur im US-Bundestaat North-Carolina wurde die NCMD in Patientengruppen gefunden, sondern weltweit sind inzwischen Fälle bekannt (89). Einige davon in England, Spanien, Frankreich, Brasilien und auch in Deutschland, wobei sich die genetische Ursache dieser stark unterscheiden können.

1.5.2 Unterteilung der NCMD nach ihrem Phänotyp

Um das phänotypische Ausmaß der Makuladegeneration der NCMD zu beschreiben, wurden Grade verwendet (78). Dabei wird sowohl das Ausmaß der Makuladegeneration, als auch die phänotypische Ausprägung beachtet. Insgesamt werden drei Grade unterschieden. Trotz dieser Unterteilung ist die phänotypische Ausprägung von Patient zu Patient variabel und zeigt unterschiedliche Krankheitsverläufe.

Grad 1 ähnelt phänotypisch einer altersbedingten Makuladegeneration (= AMD) (90). Dabei treten drusenartige Flecken auf der Netzhaut des betroffenen Auges auf. Betroffene Patienten sind meistens asymptomatisch und zeigen wenig Einschränkung des Visus. Grad 1 gilt als milde Form der NCMD (90).

Auch Grad 2 der NCMD ähnelt stark der AMD, jedoch ist der Visus nicht so stark eingeschränkt, wie man es vergleichsweise bei der AMD erwarten würde. Es sind phänotypisch konfluente Drusen in der Netzhaut sichtbar (90). Zusätzlich können in seltenen Fällen Läsionen choroidaler neovaskulärer Membranen auftreten, die den Visus stark beeinträchtigen können (89). Sie wird als moderate Form der NCMD angesehen, denn die Makuladegeneration ist etwas ausgeprägter im Vergleich zu Grad 1 (89).

1. Einleitung

Grad 3 der NCMD ähnelt hingegen nicht der AMD. Es werden phänotypisch Staphylome oder Kolobome in der Funduskopie beschrieben, welche eine erhebliche Läsion darstellen (78). Trotz der vergleichsweise großen Läsion ist der Visus oft deutlich besser als anfangs vermutet (89). Dennoch ist die Makuladegeneration deutlich ausgeprägter als in Grad 1 und 2, weshalb Grad 3 auch als fortgeschrittene Form der NCMD bezeichnet wird.

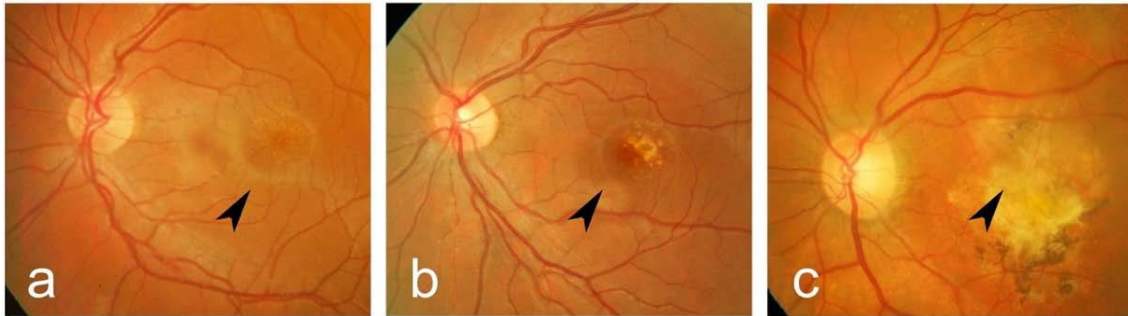


Abbildung 1.1: NCMD Grad 1-3 in der Fundusfotografie

(a) Zeigt die Fundusfotografie eines linken Auges mit mehreren Drusen. Die Darstellung entspricht Grad 1 der NCMD-Klassifikation. (b) Fundusfotografie des linken Auges mit mehreren konfluente Drusen. Entspricht Grad 2 der NCMD-Klassifikation. (c) Fundus-fotografie eines linken Auges mit makulären Läsionen. Dies entspricht Grad 3 der NCMD-Klassifikation. Aus: (69)

1.5.3 Weitere hereditäre makuläre Dystrophien

Unter dem Begriff der hereditären makulären Dystrophien versteht man eine genetisch bedingte krankhafte Veränderung von Zellen der Makula im Auge. Während grundsätzlich genetische Dysfunktionen ursächlich für all diese makulären Dystrophien sind, unterscheiden sich die Erkrankungen in ihrem Phänotyp von der in dieser Arbeit beschriebenen North-Carolina Makuladystrophie. Dabei können die Erkrankungen eine variable Penetranz, eine vielfältige Expressivität oder eine unterschiedliche Auswirkung auf den Visus zeigen. Im folgenden Abschnitt werden einige dieser Erkrankungen differentialdiagnostisch zur NCMD genauer beschrieben.

Die Best'sche vitelliforme Makuladystrophie ist eine hereditäre Makuladystrophie, die ähnlich wie die NCMD autosomal-dominant vererbt wird. M. Best kann dabei in fünf Stadien eingeteilt werden, welche alle eine variable Penetranz und Expressivität haben können (55). Dabei hängt phänotypisch die Gravität der Erkrankung vom jeweiligen Stadium ab. M. Best zeigt zu Beginn häufig wenig Einfluss auf das Sehvermögen der Erkrankten, trotz der bereits auffälligen Morphologie. In der Funduskopie können in der Makula gelblich-runde Läsionen erkannt werden, welche oftmals bilateral und in beiden

1. Einleitung

Augen vorliegen. Die Best'sche vitelliforme Makuladystrophie verläuft anders als die NCMD chronisch-progredient und kann in späteren Stadien zu starken Visusminderungen führen. Als Hauptursache für die Erkrankung werden Sequenzveränderungen im *VMD2*-Gen beschrieben (36, 55).

Morbus Stargardt, auch als juvenile Makuladegeneration bezeichnet, ist eine weitere hereditäre Makuladegeneration, die mit einer Inzidenz von etwa 1 zu 10.000 Personen eher selten auftritt (42). Es handelt sich hierbei um eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, welche auf Sequenzvariationen im *ABCA4*-Gen zurückzuführen ist und chronisch progredient verläuft (100). Die progrediente Sehverschlechterung tritt insbesondere zwischen der 1. und 2. Lebensdekade auf und geht vom retinalen Pigmentepithel aus (42). Es kommt zu einem progredienten Verlust der zentralen Sehschärfe. Funduskopisch sind weißlich-gelbliche Flecken in der Makula sichtbar, die zunächst noch keine Symptomatik in der Sehschärfe der Erkrankten zeigen müssen. Zusätzlich kommt es zu einer Atrophie der Makula (100). Diese Flecken nehmen mit der Zeit zu und können konfluieren.

Eine weitere autosomal-dominant vererbte Form der Makuladegeneration ist die Sorsbysche Fundusdystrophie (13). Klinisch kommt es dabei zu einem raschen zentralen Sehverlust, welcher häufig erst in der vierten Lebensdekade bemerkbar wird (24). Die NCMD hingegen ist in der Regel als nicht progredient beschrieben und wird bereits in der 1. Lebensdekade symptomatisch (89). Zusätzlich kann es bei der Sorsbyschen Fundusdystrophie auch zu einem peripheren Sehverlust kommen (94). Patienten berichten oft über Probleme mit dem Sehvermögen in verschiedenen Lichtverhältnissen und bei der Wahrnehmung von Objekten im zentralen und peripheren Gesichtsfeld (35). Die Sorsbysche Fundusdystrophie kann bis zur vollständigen Erblindung führen (94). Eine Atrophie des retinalen Pigmentepithels in der Makula ist in der Fundoskopie bei der Sorsbyschen Fundusdystrophie charakteristisch (13). Aktuell wird davon ausgegangen, dass Mutationen des *TIMP3*-Gens für die Sorsbysche Fundusdystrophie ursächlich sind (111).

1.5.4 Genetische Grundlagen der NCMD

Im Jahr 1992 wurde eine Familie in North Carolina, die von der autosomal-dominanten NCMD betroffen war, mittels Kopplungsanalyse auf die genetische Ursache untersucht (90). Dabei wurde zunächst der Bereich von 6q13-q21 auf dem langen Arm des sechsten Chromosoms als Genlocus der NCMD identifiziert. Später konnte der für die Erkrankung relevante Bereich auf 6q14-q16.2 weiter eingegrenzt werden (89). Für diesen genetischen Abschnitt des sechsten Chromosoms wurde von der Human Genome Organisation der Name *MCDR1* eingeführt (85). Der Begriff bedeutet im Deutschen eine retinale Makuladystrophie, welche als erste makulaspezifische Erkrankung im Genom lokalisiert werden konnte (89). In den untersuchten Familien zeigten zahlreiche Betroffene Sequenzvariationen im *MCDR1*-Genabschnitt. Auch von weiteren Wissenschaftlern konnten Variationen dieses Genabschnitts bei betroffenen Familien weltweit nachgewiesen werden (68, 85, 116, 84). Der *MCDR1*-Locus beinhaltet Gene, welche die Manifestation der NCMD wesentlich beeinflussen können. Darunter zählen das *PRDM13*-Gen, das *CCNC*-Gen und zahlreiche weitere Gene (84). Insbesondere das *PRDM13*-Gen, einschließlich seiner Promotor-Kontroll-Region (PKR), wird aktuell als Ursache für die Entstehung der NCMD diskutiert.

2003 konnte in einer britischen Familie ein weiterer Genabschnitt identifiziert werden, welcher zu einem ähnlichen Phänotyp wie der NCMD führen kann (60). Der betroffene Genabschnitt lag auf dem kurzen Arm des fünften Chromosoms und konnte in den Bereich 5p13.1-p15.33 genauer eingegrenzt werden. Dieser Abschnitt wurde als *MCDR3* klassifiziert und beinhaltet das *IRX1*-Gen. In einer aktuellen Studie konnte festgestellt werden, dass Sequenzvariationen im Bereich nach dem *IRX1*-Gen ursächlich für die Entwicklung der NCMD sein können (16).

2016 gelang es den *MCDR1*- und *MCDR3*-Locus genomisch zu analysieren (84). Es konnten vier Sequenzvariationen definiert werden, die in der PKR des *PRDM13*-Gens gefunden wurden.

Die Variante V1 mit einer Sequenzvariation an der Position g.6:100040906G>T. Diese Sequenzvariation wurde in den untersuchten Familien am häufigsten gefunden. Bei der Variante V2 ist eine Sequenzvariation an Position g.6:100040987G>C identifiziert worden. Die Sequenzvariation V3 wurde an Position g.6:100041040C>T gefunden. In V4 lag eine 123 kb lange Tandemduplikation (g.6:100020205-100143306) vor, welche das *PRDM13* Gen beinhaltet hatte. Somit lag das *PRDM13*-Gen durch die Duplikation dieser Gensequenz doppelt vor. Neben den Sequenzvariationen in *MCDR1* wurden in

1. Einleitung

einer Familie auch Sequenzvariationen im *MCDR3*-Locus beschrieben. Diese Variante wurde als V5 bezeichnet und auf dem fünften Chromosom in g.5:3587901-4486027 lokalisiert. Zu diesen fünf Varianten konnten später noch weitere Varianten gefunden werden (8, 59, 82, 88).

2020 wurde eine Studie durchgeführt, in der ein Patientenkollektiv der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Justus-Liebig-Universität in Gießen auf das Vorhandensein von Sequenzvariationen im *MCDR1*-Locus untersucht wurde (69). Dabei konnten neben den bereits bekannten Varianten fünf weitere Varianten (M1-M5) in der PKR des *MCDR1*-Locus gefunden werden.

Tabelle 1.1: Varianten mit Sequenzvariationen des Gießener Patientenkollektivs in der PKR des *MCDR1*-Locus

Variante	Chromosomale Lokalisation	Nukleotidvariation
M1	g.6:100040510	A>C
M2	g.6:100040453	G>C
M3 (≡ V2)	g.6:100040987	G>C
M4	g.6:100041011	T>A
M5	g.6:100041341	C>A

Es ist wichtig anzumerken, dass die entdeckte Variante M3 mit der seit 2016 bekannten Variante V2 übereinstimmt (69).

1.5.5 Das *PRDM13*-Gen

Beim *PRDM13*-Gen handelt es sich um ein Gen, welches für ein regulatorisches Protein kodiert und sich im Genlocus *MCDR1* auf dem langen Arm des sechsten Chromosoms befindet (84). Das *PRDM13* Gen gehört dabei der PRDM-Familie an, welche eine PR-Domäne (engl. positive regulatory domain) besitzt (31). Dieser Sequenz kann eine variable Anzahl an Zinkfinger-Domänen folgen (11). Zinkfingerdomänen finden sich in Transkriptionsfaktoren und bestehen aus einer spezifischen Anordnung von Aminosäuren. Die spezifische Anordnung kann Zinkionen binden (46). Aufgrund ihrer strukturellen Anordnung können Zinkfinger an DNA- oder RNA-Sequenzen binden und die Genexpression bestimmter Gene regulieren (15). Des Weiteren besitzen einige Proteine der PRDM-Familie die intrinsische Fähigkeit die Genexpression mittels Histon-

1. Einleitung

Methyltransferase zu beeinflussen (31). Andere können hingegen die Genexpression mithilfe der Aktivierung von histon-modifizierenden Enzymen steuern. Somit kann dem *PRDM13*-Gen eine Funktion als Transkriptionsfaktor zugesprochen werden.

Durch umfangreiche Forschungen an der Entwicklung von Mäuseembryonen konnte nachgewiesen werden, dass *PRDM13* in verschiedenen Geweben und Organen exprimiert wird (114). Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass das *PRDM13*-Gen insbesondere in Strukturen des Nervensystems und des Auges vorhanden ist (98, 114). Es stellt sich heraus, dass dieser Transkriptionsfaktor auch eine bedeutende Rolle in der Embryogenese und der Reifung von Organen spielt (114). Außerdem wurde nachgewiesen, dass *PRDM13* die Neurogenese von exzitatorischen und inhibitorischen Neuronen in der Rückenmarksentwicklung reguliert (11, 62). Auch postnatal trägt *PRDM13* zu einer ordnungsgemäßen Entwicklung des Nervensystems und insbesondere des Cerebellums bei (112). Kommen hingegen Mutationen im *PRDM13*-Gen vor, wurden perinatale Dysfunktionen des Nervensystems festgestellt (17).

In der Retina wird *PRDM13* hauptsächlich in Amakrinenzellen synthetisiert (110). Hierbei spielt der Transkriptionsfaktor eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung und Funktion dieser Zellpopulation. Eine Überexpression oder eine verminderte Expression des *PRDM13*-Transkriptionsfaktor kann die Bildung der Amakrinenzellen beeinflussen.

1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss bereits bekannter Sequenzvariationen im *PRDM13*-Gen hinsichtlich der Expression des *PRDM13*-Gens mithilfe eines Reportergen-Assays genauer zu untersuchen. Dabei wurden sowohl die drei Varianten untersucht, die von K. Small 2016 beschrieben wurden (V1, V2 und V3), als auch jene Sequenzvarianten, die in der Arbeit von Marc Platschek 2020 in einem Gießener Patientenkollektiv gefunden wurden (M1, M2, M3 (\equiv V2), M4 und M5).

Hierzu wurden zunächst mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und site-directed mutagenesis Plasmide des *PRDM13*-Gens hergestellt, die die jeweiligen Sequenzvariationen beinhalten. Diese wurden dann in bakterielle Wirte transformiert und das jeweilige Plasmid mit der gewünschten Mutation isoliert. Im Anschluss wurde das entsprechende Plasmid in eukaryotische HEK-293 Zellen transformiert, um die mRNA, die über die Plasmide transkribiert wurde zu isolieren. Abschließend wurde die isolierte mRNA in cDNA revers transkribiert und mittels einer quantitativen PCR (= qPCR) die Wirkung der Sequenzvariationen auf die Amplifikationshäufigkeit des *PRDM13*-Gens im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ermittelt.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 2.1: Chemikalien

Chemikalien	Artikelnummer	Hersteller, Ort
25 mM MgCl ₂	A351H	Promega GmbH, Mannheim
SERVA DNA Stain Clear G	39804.01	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
dNTP Mix	N0447S	New England BioLabs, Frankfurt
DMSO	F-515	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Taq Polymerase Ladepuffer	RO611	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Ampicillin	K29.01	Carl Roth GmbH& Co KG, Karlsruhe
EDTA-Na ₂ * 2H ₂ O p.a.	8043.2	Carl Roth GmbH& CO KG, Karlsruhe
Agarose LE	M3044.0500	Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm
Select Agar	30391023	Invitrogen, Darmstadt
Luria Broth	12795027	Invitrogen, Darmstadt
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	SM0321	MBI Fermentas, St. Leon Rot
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	SM0311	MBI Fermentas, St. Leon Rot
Ethanol (absolut)	8006	J.T. Baker, Schwerte
TRIS Puffer	U885.2	Carl Roth GmbH& CO KG, Karlsruhe
SOC-Medium	15544-034	Invitrogen, Darmstadt

2. Material und Methoden

Borsäure	1.001.655.000	Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn
dATP 100 mmol	N0440S	New England BioLabs, Frankfurt
dCTP 100 mmol	N0441S	New England BioLabs, Frankfurt
dGTP 100 mmol	N0442S	New England BioLabs, Frankfurt
dTTP 100 mmol	N0443S	New England BioLabs, Frankfurt
LC Green Plus	081015A	BioFire Diagnostics
SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain	11988131001	Boehringer, Mannheim
RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	K1632	MBI Fermentas, St. Leon Rot
QIAGEN Plasmid Mini Kit	12123	QIAGEN
QIAamp RNA Blood Mini Kit	52304	QIAGEN
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	740609.250	Marcherey-Nagel

2.1.2 Enzyme

Tabelle 2.2: Enzyme

Enzym	Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller, Ort
DNA- Polymerase	GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase	M780B	Promega GmbH, Madison, WI USA
DNA- Polymerase	Phusion DNA Polymerase	F-530S	New England BioLabs, Frankfurt
Ligase	T4 DNA Ligase	M0202S	New England BioLabs, Frankfurt
Accutase	Accutase Sterile Filtered	AC-EZ-0001	Anprotec, Bruckberg

2. Material und Methoden

Reverse Transkriptase	RevertAid H Minus RT	K1632	MBI Fermentas, St. Leon Rot
-----------------------	----------------------	-------	-----------------------------

2.1.3 Stammlösungen

Tabelle 2.3: Stammlösungen

Stammlösung	Reagenzien	Menge
10x TBE- Puffer	1 M Tris	121,1 g/l
	0,83 M Borsäure	51,36 g/l
	10 mM EDTA 2H ₂ O + 2 Na	3,72 g/l
LB- Medium	Luria Broth (Miller's LB Broth Base)- Pulver	25 g/l
	H ₂ O	1 l
Agar-Lösung für Zellkulturschale	Select Agar	15 g/l
	H ₂ O	500 ml
Nährbodenmedium für Plattenkulturen	LB- Medium	500 ml
	Agarose	15 g/l
DMEM +/+/+	DMEM	500 ml
	10% FCS	50 ml
	2 mM Glutamin	5 ml
	10.000 U/ml Penicillin	5 ml
TE-Puffer	0,01 M Tris HCl	1,211 g/l
	0,005 M EDTA	1,86 g/l
	ddH ₂ O	96,84 ml
0,125 mM dNTP- Lösung	100 mM dATP	12,5 µl
	100 mM dCTP	12,5 µl
	100 mM dGTP	12,5 µl
	100 mM dTTP	12,5 µl
	ddH ₂ O	950 µl
PEI-Mix	PEI	0,1 g
	150 mM NaCl	1 l
DEPC-Wasser	DEPC	1 ml
	ddH ₂ O	1 l

2. Material und Methoden

2.1.4 Wirtszellen

Tabelle 2.4: Wirtszellen

Wirtszelle	Produktnummer	Hersteller
XL1-Blue E. coli	200249	Stratagene, Heidelberg
HEK-293 T	ATCC-CRL-1573	LGC Standards GmbH, Wesel

Die XL1-Blue Zellen gehören zu einem K12-Stamm der E. coli Bakterien, die in der Molekularbiologie oder in der Genetik häufig zum Klonieren von Plasmiden verwendet werden (113). Die Vorteile dieser Zelllinie sind dabei ein schnelles Wachstum, die unkomplizierte Handhabung und die einfache Transformation mit DNA (25). Der Genotyp von XL1-Blue Zellen ist dabei *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* (113). Dieser Genotyp ist mit dem in dieser Arbeit verwendeten Plasmid kompatibel.

1973 wurden menschliche embryonale Nierenzellen (human embryonic kidney = HEK) der Zelllinie 293 (HEK-293) mittels Transformation der ursprünglich isolierten HEK-Zellen mit menschlichen DNA-Fragmenten des Adenovirus Typ 5 erzeugt (51). Dabei wächst die Zelllinie adhärent und kann in Zellkulturflaschen kultiviert werden. Die HEK-293 Zellen dienen als Wirtszellen für die gereinigten Plasmide, da HEK-293 Zellen eine hohe Transfektionseffizienz mit fremder DNA besitzen. Somit konnte die Genexpression des *PRDM13*-Reporterplasmids mit der entsprechenden Sequenzvariation in der HEK-293 Zelllinie individuell untersucht werden.

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.5: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Typ	Artikelnummer	Hersteller, Ort
Pipettenspitzen	0-10 µl	701115	Sarstedt, Nümbrecht
	0-10 µl	720031	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldenburg
	0-200 µl	720210X	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldenburg
	100-1000 µl	70762	Sarstedt, Nümbrecht

2. Material und Methoden

	100-2500 µl	22492071	Eppendorf, Hamburg
	100-5000 µl	702595	Brand, Wertheim
Filterpipettenspitzen	0-10 µl	066125300	Nerbe plus GmbH & Co. KG, Winsen/ Luhe
	0-20 µl	066225300	
	0-100 µl	066425300	
	0-200 µl	076628300	
	100-1250 µl	076958300	
Reagiergefäße	PCR TW Tube 0,2 ml	712010	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldenburg
	Micro Tube 0,5 ml	72.699	Sarstedt, Nümbrecht
	Micro Tube 1,5 ml	72.706	Sarstedt, Nümbrecht
	Micro Tube 2,0 ml	72.685.500	Sarstedt, Nümbrecht
	Cellstar Tubes 15 ml	188271	Greiner Bio-One, Frickenhausen
	Cellstar Tubes 50 ml	227261	Greiner Bio-One, Frickenhausen
	Probenröhrchen 1,5 ml	710005	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldenburg
	Probenröhrchen 2,0 ml	710702	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldenburg
Schraubverschlüsse	Schraubverschlüsse farblich gemischt	710718	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldenburg
Pipetten	2 ml		Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
	5 ml	606180	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
	10 ml	607180	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
	25 ml	760180	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

2. Material und Methoden

Zellkulturplatten	24-Well Platte Cellstar	662 160	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturschale	Nocken, Cellstar	664160	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflaschen	TC-Flasche T75	83.3911.002	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.6 Geräteliste

Tabelle 2.6: verwendete Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller, Ort
Pipettierhilfe	Eppendorf Reference	Eppendorf AG, Hamburg
	1 - 10 µl , 2 - 20 µl, 10 - 100 µl,	
Pipettierhilfe	Transferpette S 0,1 - 1 µl, 0,5 - 10 µl, 10 - 200 µl, 100 - 1000 µl, 0,5 - 5 ml	Brand, Wertheim
	Transferpette S-8 0,5 - 10 µl, 5 - 50 µl	
	Transferpette S- 12 0,5 - 10 µl, 5 - 50 µl	
Mini Zentrifuge	Ministar silverline	VWR, Darmstadt
Zentrifuge	1-15 PK	Sigma, Osterode
Zentrifuge	4K15	Sigma, Osterode
Vortexer	Lab dancer	VWR, Darmstadt
PCR-Thermocycler	T-personal	Biometra Whatman, Göttingen
	T-professional basic gradient	Biometra Whatman, Göttingen
qPCR-Thermocycler	qTOWER ³ G, Farbmodul 1	Analytik Jena GmbH, Jena

2. Material und Methoden

Kapillarelektrophorese	QIAXcel®	QIAGEN®, Hilden
	Kartuschen	QIAGEN®, Hilden
Agarose-Gelelektrophorese	Compact S	Biometra Whatman, Göttingen
	Compact M	Biometra Whatman, Göttingen
Spannungsgerät (Agarose Gelelektrophorese)	Power Pack P25T	Biometra Whatman, Göttingen
	PS 305T	Biometra Whatman, Göttingen
Photometer	Biophotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Elektroporator	Multiporator	Eppendorf AG, Hamburg
Elektroporationsküvetten	Elektroporationsküvette 100 µl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Transilluminator	Transiluminator (Bio Doc Analyse)	Biometra Whatman, Göttingen
Orbitalschüttler	Certomat MOII	Sartorius, Göttingen
Inkubator	BD 115	Binder, Tuttlingen
Inkubatorhaube	Certomat H	Sartorius, Göttingen
Workbench Flow	Microbiological Safety Cabinet, 40773006	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Mikroskop	VWRI 630	VWR International GmbH, Darmstadt
Fluoreszenz-Mikroskop	BZ-8100E	Keyence, Neu-Isenburg
Mikroplatten-Reader	Infinite M1000 Pro	Tecan, Crailsheim
Wasserbad	Julabo TW12	Julabo, Seelbach
Neubauerkammer	Improved	Optiklabor, United Kingdom
Akku-Pipettierhilfe	PIPETBOY acu 2 blue	INTEGRA Biosciences, Zizers, Schweiz

2.1.7 Computerapplikationen

Tabelle 2.7: Computerapplikationen

Computerapplikation	Hersteller	Anwendung
CLC Main Workbench Version 23.0.5	CLC bio, QIAGEN Aarhus, Denmark	Auswertung von DNA- und RNA-Sequenzen, sowie zum Primerdesign
BioDocAnalyze	Biometra Whatman, Göttingen	Visualisierung der Gelelektrophorese
BZ observation application	Keyence, Neu-Isenburg	Photodokumentation im Fluoreszenzmikroskop
qPCRsoft	Analytik Jena GmbH, Jena	Auswertung und Analyse der qPCR
QIAxcel ScreenGel	QIAGEN®, Hilden	Auswertung der Kapillarelektrophorese
GraphPad Prism 9.5.1.733	GraphPad Software LLC, Boston, MA, USA	Statistische Auswertung

2.1.8 Primer

Zunächst wurden Primer hergestellt, welche die zu untersuchende Sequenzvariation in ihrem Design enthalten. Für die Herstellung von Reporterplasmiden mit den bekannten Sequenzvariationen M1-M5, sowie V1 und V3 wurde das Prinzip der ortsspezifischen Mutagenese angewendet (vgl. Kapitel 2.2.2). Dazu wurden Primer-Paare erstellt, welche die Reporterplasmide amplifizieren sollten. Gleichzeitig wurden die Primer-Paare so modifiziert, dass sie die gewünschten Sequenzvariationen in das jeweilige Plasmid einbrachten (56). Die entsprechenden Sequenzvariationen mussten dabei in einem der beiden Primer enthalten sein.

Zur Quantifizierung der Genexpression der modifizierten *PRDM13*-Gene wurden zwei Primerpaare erstellt. Dabei synthetisiert ein Primerpaar (pGL4-PR13-Luciferase) einen 130 bp langen Sequenzabschnitt des Luciferase-Reporter-Gens (siehe Tabelle 2.10). Das zweite Primerpaar (*GAPDH*) amplifiziert einen 162 bp langen Abschnitt des Housekeeping-Gens *GAPDH*, welches im Zytoplasma einer jeden Zelle vorkommt, da das Enzym an der Glykolyse beteiligt ist.

2. Material und Methoden

In der folgenden Tabelle sind die synthetisierten Primer dargestellt:

Tabelle 2.8: Primer mit der Sequenzvariation M1-M5 von *PRDM13*

<i>PRDM13 M1</i>	Forward Primer (+ Sequenzvariation)	AGTGGTCTAGAAATGTGAGAAG
	Reverse Primer	GATCATTGGAATCAAGGCAG
<i>PRDM13 M2</i>	Forward Primer (+ Sequenzvariation)	GATCACAGGTATGGAAGA
	Reverse Primer	AGTCACAATCCCCAGTTT
<i>PRDM13 M3</i>	Forward Primer (+ Sequenzvariation)	GTGAATTGAACCTCCTGGTA
	Reverse Primer	TGGGGATGATTATGTAACAG
<i>PRDM13 M4</i>	Forward Primer	GTGAATTGAACCTCCTGGTA
	Reverse Primer (+ Sequenzvariation)	TGGGGATGATTATGTAACAG
<i>PRDM13 M5</i>	Forward Primer (+ Sequenzvariation)	GGACTTGGTTGTTTCTGAAT
	Reverse Primer	TGTCCTGACTTCTCTGTC

Tabelle 2.9: Primer mit Sequenzvariation V1 und V3 von *PRDM13*

<i>PRDM13 V1</i>	Forward Primer	GTCAGTGGGACATCAGTAAA
	Reverse Primer	CAGAGCAAGTCATATGG
<i>PRDM13 V3</i>	Forward Primer	TTCCTGTAGCAAAGTGT
	Reverse Primer	ATTAACCCAGAAAGAGA

Tabelle 2.10: Primer zur Messung der Genexpression

pGL4-PR13-Luciferase	Forward Primer	AAAACATTAAGAAGGGCCCA
	Reverse Primer	TCGATATGTGCGTCGGTAAA
GAPDH	Forward Primer	ATGGGGAAGGTGAAGGTCGG
	Reverse Primer	GCCATGGGTGGAATCATATTG

2. Material und Methoden

Tabelle 2.11: Verwendete Ausgangsplasmide zur Vorlage für die Synthese der modifizierten Plasmide

Bezeichnung des Plasmids	Verwendung des Kontrollwertes
pGL4- <i>PRDM13</i> -PROM-WT (=1K23)	Beinhaltet das Ausgangsplasmid ohne Sequenzvariationen. Somit Kontrollwert zur Messung der Genexpression für die Klone M1-M5, sowie M2K3 und M3K4
GFP	Transfektionskontrolle

2. Material und Methoden

2.1.9 pGL4-PRDM13-PROM Reporter (PROM-Plasmid)

Das Plasmid pGL4-PRDM13-PROM besteht aus 4946 Basenpaaren und trägt ein Resistenzgen, das seinen Wirt resistent gegenüber Ampicillin macht. Es besteht aus einem Luciferase-Reporter-Gen und dem Basic-Promotor des PRDM13-Gens. Außerdem besitzt das Plasmid diverse Erkennungssequenzen, an denen Restriktionsenzyme binden können. Dieses Plasmid dient der Quantifizierung der Aktivität des Promotors ohne vorhandene PKR. Die Expression des *Luciferase*-Gens ermöglicht über eine Biolumineszenzreaktion und photosensible Detektion die Untersuchung der Aktivität der inserierten Promotoren.

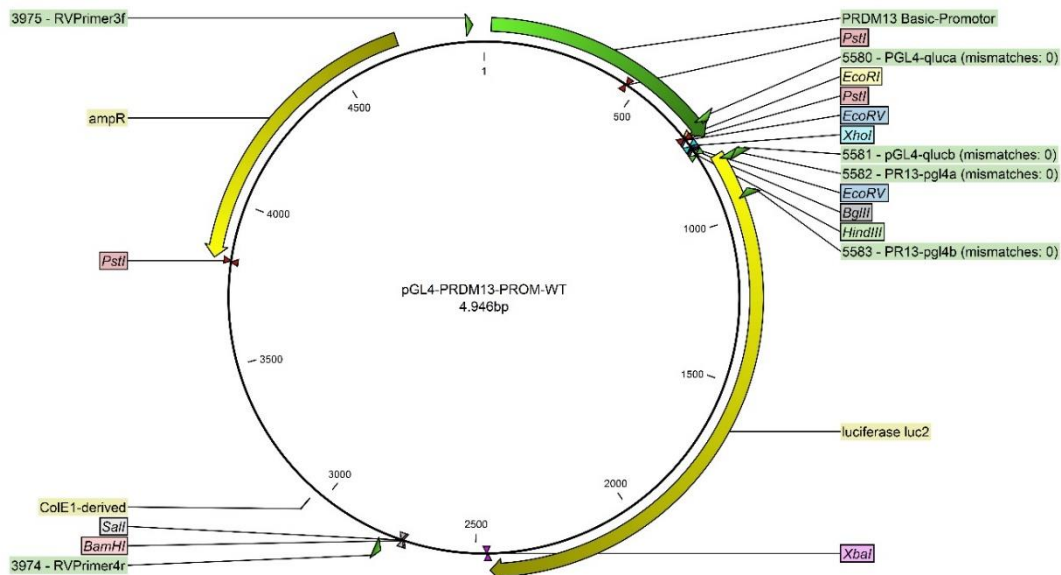


Abbildung 2.1: Plasmid pGL4-PRDM13-PROM

Promotor: PRDM13 Basic-Promotor; Rezeptorvektor: luciferase luc2; Ampicillinresistenz-Sequenz: ampR; Sequenzierprimer-Bindungsstellen: 3975 – RVPrimer; Schnittstellen für Restriktionsenzyme: PstI, EcoRI, EcoRV, XhoI, BglII, HindIII, XbaI, BamHI, SallI; Sequenz für ColicinE1 zur Hemmung der Wachstumsfähigkeit anderer Bakterien: ColE1-derived.

2. Material und Methoden

2.1.10 pGL4-PRDM13-PROM-Promotor-Kontroll-Region (PPKR) (WT-Plasmid)

Das pGL4-PRDM13-PROM-PKR-WT-Plasmid besteht aus 6080 Basenpaaren und beinhaltet anders als das pGL4-PRDM13-PROM, noch die zusätzliche Sequenz der PRDM13-PKR. In die PRDM13-Promotorkontrollregion des Plasmids wurden die Sequenzvariationen, die von Small et al. 2016 beschrieben und die zusätzlich im Gießener Patientenkollektiv gefunden wurden, einkloniert.

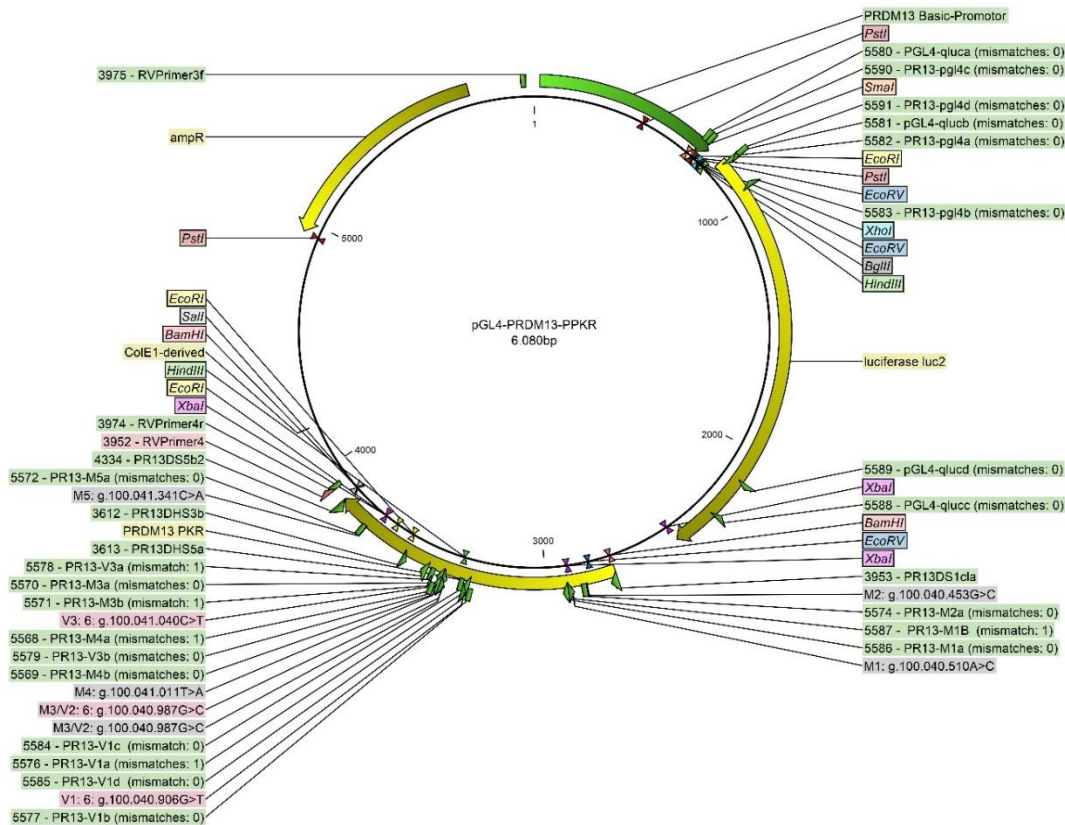


Abbildung 2.2: Plasmid pGL4-PRDM13-PROM-Promotor-Kontroll-Region (PPKR)

Promotor: PRDM13 Basic-Promotor; Rezeptorvektor: luciferase luc2; Ampicillinresistenz-Sequenz: ampR; Sequenzierprimer-Bindungsstellen: 3975 – RVPrimer; Mutationssequenzen M1:g.6:100.040.510A>C, M2:g.6:100.040.453G>C, M4:g.6:100.041.011T>A, M5:g.6:100.041.341C>A; Primer der jeweiligen Mutationssequenzen: M1: 5586 – PR13-M1a (forw.), 5587 – PR13-M1b (rev.), M2: 5574 – PR13-M2a (forw.), 5575 – PR13-M2b (rev.), M3/V2: 5570 – PR13-M3a (forw.), 5571 – PR13-M3b (rev.), M4: 5568 – PR13-M4a (forw.), 5569 – PR13-M4b (rev.), M5: 5572 – PR13-M5a (forw.), 5573 – PR13-M5b (rev.), V1: 5584 – PR13-V1c (forw.), 5585 – PR13-V1d (rev.), V3: 5578 – PR13-V3a (forw.), 5579 – PR13-V3b (rev.), Schnittstellen für Restriktionsenzyme: PstI, EcoRI, EcoRV, XhoI, BglIII, HindIII, XbaI, BamHI, Sall; Sequenz für ColicinE1 zur Hemmung der Wachstumsfähigkeit anderer Bakterien: ColE1-derived.

2. Material und Methoden

2.1.11 pGL4-*PRDM13*-PROM-Promotor-Kontroll-Region mit klonierter PKR Klon 2K3 und 3K4

Untersucht wurden auch Plasmide, die von M. Platschek 2020 hergestellt wurden. In der entsprechenden Arbeit konnte mithilfe der dort verwendeten Klonierungsmethode nicht jede der bekannten Sequenzvariation erfolgreich in einem Plasmid isoliert werden. Es konnten jedoch Plasmide hergestellt werden, welche zwei Sequenzvariationen in einem Plasmid beinhalteten. (69).

Auch bei einzelnen Patienten konnten multiple Sequenzvariationen nachgewiesen werden. Um fundierte Rückschlüsse auf die Expression des *PRDM13*-Gens bei mehreren Sequenzvariationen ziehen zu können, wurden diese in dieser Arbeit ebenfalls untersucht.

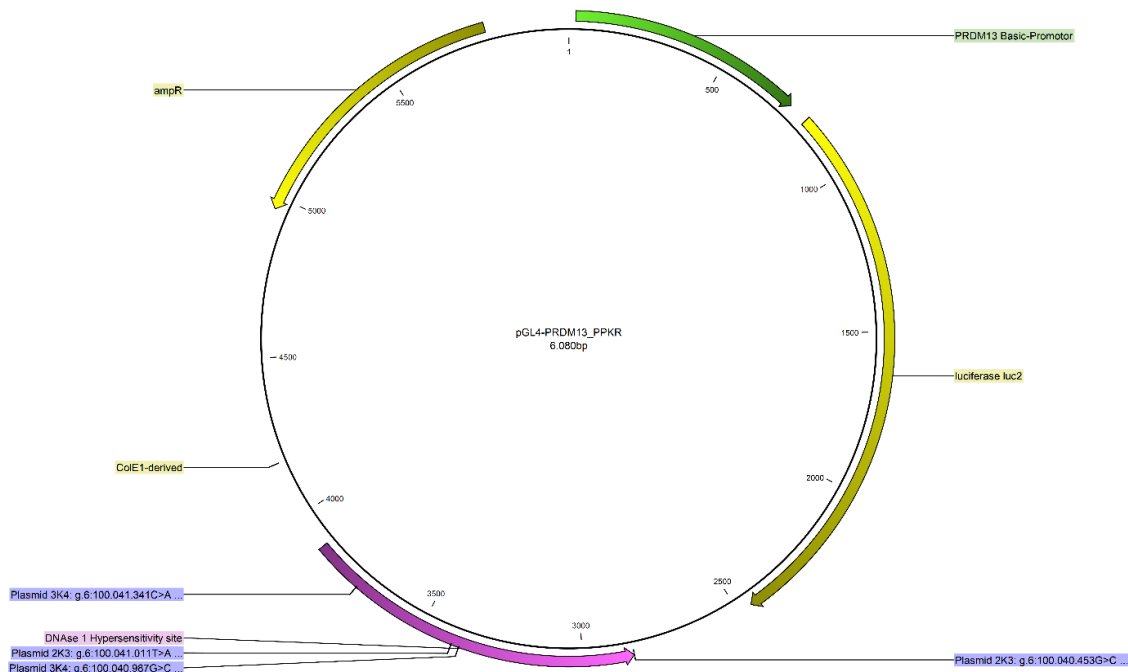


Abbildung 2.3: Plasmid pGL4-*PRDM13*-PROM- Promotor-Kontroll-Region mit klonierter PKR Klone 2K3 und 3K4

Promotor: *PRDM13* Basic-Promotor; Rezeptorvektor: luciferase luc2; Ampicillinresistenz-Sequenz: ampR; DNase1 Hypersensitivity site: Inserierte PKR, Plasmid 2K3: g.6:100.041.011T>A und g.6:100.040.453G>C und Plasmid 3K4: g.6:100.040.987 und g.6:100.041.11: Mutationen in den Plasmiden pGL4-*PRDM13*-PPKR-2K3 (M2 + M4) und pGL4-*PRDM13*-PPKR-3K4 (M3/V2 und M5), Sequenz für ColicinE1 zur Hemmung der Wachstumsfähigkeit anderer Bakterien: ColE1-derived.

2. Material und Methoden

Tabelle 2.12: Verwendete Klone aus vorherigen Arbeiten

Bezeichnung des Klons	Mutationen	Hergestellt von
M2K3	M2 + M4	(69)
M3K4	M3/V2 + M5	(69)

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Im Jahr 1983 wurde von Kary Mullis die Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase chain reaction = PCR) vorgestellt (65). Dabei handelt es sich um eine Methode zur *in-vitro* Amplifizierung (=Vervielfältigung) von Nukleinsäuresequenzen. Diese Methode ermöglicht die Vervielfältigung kleinster Mengen an definierten Gensequenzen, wodurch die Forschung an menschlichen Genen und molekularbiologischen Mechanismen revolutioniert wurde (64). Eine Schlüsselfunktion der PCR ist dabei neben der Amplifizierung des definierten Genabschnitts auch die Herstellung von Klonen. In mehreren Zyklen findet hierbei eine repetitive Abfolge an Reaktionen statt, die eine Amplifizierung der DNA ermöglichen. Die Technik, die man sich hierbei zunutze macht, basiert auf der Denaturierung einer doppelsträngigen DNA (engl. Double-stranded DNA = dsDNA) und der darauffolgenden Anlagerung von DNA-spezifischen Oligonukleotidmolekülen (Oligonukleotidprimer) am 5'-Ende des Leitstranges und am 3'-Ende des Gegenstranges. Es folgt die Elongation der Oligonukleotide komplementär zur Gensequenz des Ausgangstranges (Leit- und Gegenstrang) durch Aktivität von hitzestabilen DNA-Polymerasen mit freien Desoxynucleosid-Triphosphaten (dNTP). Amplifikationsfehler können durch den Einbau von falschen Desoxynucleosid-Triphosphaten während der PCR auftreten. Grundsätzlich steigt die Anzahl der DNA-Kopien jedoch exponentiell zur Basis 2 an (vgl. Tabelle 2.14).

2.2.1.1 Initiale Denaturierung

Durch den Einfluss von Hitze, wird die DNA-Doppelhelix hierbei in zwei lineare DNA-Einzelstränge gespalten. Eine Temperatur von 95 °C reicht hierbei aus, um die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren der Doppelhelix zu spalten und die beiden Stränge voneinander zu lösen (64). Wichtig hierbei ist eine vollständige Denaturierung der DNA-Doppelhelix, um eine optimale Bindung der Oligonucleotidprimer zu ermöglichen, weshalb der initiale Denaturierungsschritt 5 Minuten dauert.

2.2.1.2 Primer-Annealing

Bei vollständig erfolgter Denaturierung können in diesem Schritt die verwendeten Primerpaare sequenzspezifisch an den jeweilig komplementären DNA-Sequenzabschnitt binden. Bindet der Primer am 3'-Ende der zu amplifizierenden DNA-

2. Material und Methoden

Sequenz, spricht man von einem Reverse-Primer. Bindet der Primer jedoch am 5'-Ende der zu amplifizierenden DNA-Sequenz, so wird von einem Forward-Primer gesprochen. Die Primerpaare sollten hierbei in entgegengesetzter Richtung zueinander verlaufen, um den gewünschten DNA-Sequenzbereich zu definieren. Entscheidenden Einfluss auf ein erfolgreiches Anknüpfen der Oligonucleotid-Primer an der DNA-Sequenz spielt hierbei neben der Primerlänge und der Primerzusammensetzung (Basenzahl und Basenabfolge) auch die Reaktionstemperatur des Annealing-Schrittes, welche durch eine Gradienten PCR ermittelt wurde. Ist die Annealing-Temperatur zu hoch, so können Primer erschwert an die DNA-Sequenz binden und es kann folglich zu einer erfolglosen PCR kommen. Bei zu niedrigen Temperaturen können fehlerhafte Paarungen des Primerpaares mit der DNA auftreten und somit zu ungenauen PCR-Ergebnissen führen (64). Einzelne Computerprogramme können hierbei bereits ein Temperaturoptimum für die ausgesuchten Primerpaare schätzen. Experimentell wurden die primerspezifischen Temperaturoptima mithilfe einer Gradienten-PCR bestimmt. Der für die Bestimmung der Temperaturoptima verwendete „T-professional basic gradient“ Thermocycler arbeitet mit Temperaturen von 48 – 72 °C. In dieser Arbeit wurde im Bereich von 53° - 65°C gearbeitet. Es wurde mit einem 12-Spalten und 8-Zeilen Layout gearbeitet, in der jede Spalte mit einer unterschiedlichen Temperatur behandelt wurde. Die Temperatur steigt dabei graduell von der ersten bis zur zwölften Spalte an. In einer Zeile waren somit 12 Slots mit graduell ansteigender Temperatur vom ersten bis zum zwölften Slot. Neben dem Temperaturoptimum spielt auch die Primersequenz und die Primerlänge eine entscheidende Rolle für den Erfolg der Amplifikation (14). Die Primerlänge sollte hierbei aus mindestens 16 und maximal 28 Basenfolgen bestehen, um eine optimale Amplifikation im Rahmen einer PCR zu ermöglichen. Eine PCR verläuft in den Versuchen dann erfolgreich, wenn die gewünschten Genabschnitte mit den jeweiligen Sequenzvariationen mithilfe der erstellten Primer amplifiziert werden können. In dieser Arbeit wurde mit Primerlängen zwischen 17 und 22 Basen gearbeitet. Bei der Primersequenz wurde darauf geachtet, Primer mit häufig wiederholenden Basenfolgen zu vermeiden, um die Bedingungen für eine ideale Amplifikation in einer PCR zu schaffen. Die Basenpaarverhältnisse von G/C zu A/T spielen bei der Effektivität eines Primerpaares auch eine essentielle Rolle. Die Anteile an G/C und A/T sollten ungefähr ausgeglichen sein. Aber auch die Konzentration der Primer im Reaktionsansatz spielt eine maßgebliche Rolle bei der Amplifikationsqualität und der Fehlerrate des PCR-Produktes (14). Zusätzlich kann es zu unspezifischen Amplifikationen der Reporterplasmide kommen, da die vermehrte Menge an Primerpaaren miteinander interagieren und so zusätzliche Produkte entstehen können, die nicht der Zielsequenz entsprechen.

2. Material und Methoden

2.2.1.3 Elongation

Um einen spezifischen DNA-Abschnitt amplifizieren zu können, bedarf es neben den spezifischen Forward- und Reverse-Primern auch einer thermostabilen DNA-Polymerase. Ihr Temperaturoptimum liegt bei 72 °C, weshalb der Elongationsschritt bei dieser Temperatur erfolgt.

Die DNA-Polymerase kann hierbei nach der vorausgehenden Annealing-Reaktion der Primer an die Ausgangspunkte der zu amplifizierenden Gensequenz binden und mit der Amplifikation beginnen. Am 5'-Ende der DNA-Stränge beginnt die DNA-Polymerase somit komplementäre Basen einzubauen und die DNA-Einzelstränge in 5'→3' Richtung zu amplifizieren. Ergebnis des ersten Zyklus sind an den 3'-Enden verlängerte DNA-Einzelstränge (64). In den folgenden Zyklen dienen diese verlängerten DNA-Einzelstränge als DNA-Matrize.

2.2.1.4 Adaptierte Zykluszahl

Alle drei Schritte werden als ein Zyklus zusammengefasst. Während die Denaturierungsdauer im ersten Schritt noch 5 Minuten beträgt, kann in den folgenden Zyklen die Dauer deutlich reduziert werden. Für eine erfolgreiche PCR sind bereits 25 bis 30 Zyklen ausreichend (64). Ist eine hohe Konzentration der spezifischen DNA-Sequenz gewünscht, so kann man die Zykluszahl auf bis zu 40 Zyklen erhöhen. Dementsprechend muss man auch mit einer höheren Konzentration an Substraten, wie Desoxynucleotiden (dNTP), Primern oder Cofaktoren wie Magnesium, arbeiten.

2.2.1.5 Finale Extension

Nach der individuell gewählten Zykluszahl wird das PCR-Reagenz abschließend auf 72°C für 10 Minuten erhitzt, um unvollständig verlängerte DNA-Replikationen zu vervollständigen und DNA-Fragmente zu reduzieren. Dies liegt daran, dass die DNA-Polymerase mit zunehmender Zykluszahl langsamer arbeitet und partiell vervollständigte DNA-Fragmente entstehen (64).

Tabelle 2.13 Schematische Darstellung der Gradienten PCR

Programmschritt	Temperatur (°C)	Dauer (min)	Zyklus
Initiale Denaturierung	94	5	1 x
Annealing	53 - 65	1	34 x
Extension	72	1	
Denaturierung	94	1	
Annealing	53 - 65	1	1 x
Extension	72	10	1x

Tabelle 2.14: Der PCR-Ansatz

Komponente	Menge (µl)
ddH ₂ O	14,8
5X (Gotaq Polymerase) Buffer	12,5
dNTP 0,125mM	10,0
MgCl ₂ 25mM	7,5
Forward-Primer 10 pmol/µl	2,5
Reverse-Primer 10 pmol/µl	2,5
DNA-Polymerase 5 U/µl	0,3
DNA 20 ng/µl	12,5
Gesamt	62,5

2.2.2 Ortsspezifische Mutagenese

Die ortsspezifische Mutagenese wird verwendet, um Mutationen in einem bestimmten Bereich einer Sequenz zu implementieren. Hierzu werden Primer hergestellt, die die Sequenzvariation beinhalten und tendenziell an ihrer ursprünglichen komplementären Sequenz binden könnten. Dadurch kommt es zu einem Einbau einer fehlerhaften Sequenz, die dann weiter untersucht werden kann. Die Sequenzvariation wird zumeist in einem der beiden Primer etabliert und das Genprodukt davon dann vermehrt amplifiziert. Bei der Amplifikation eines ringförmigen Plasmids bedeutet dies, dass der eine Primer an den Leitstrang bindet und der andere Primer exakt an der benachbarten Basensequenz des Gegenstranges. Dadurch konnte das Plasmid sequenzgenau inklusive der Sequenzvariation amplifiziert werden, die durch die Primermodifikation eingebaut wurde (30).

2.2.3 Elektrophorese

Die Trennung geladener und gelöster Teilchen in einem elektrischen Feld wird als Elektrophorese bezeichnet (61). Die Geschwindigkeit, mit der diese Trennung abläuft, ist abhängig von der Ladung der gelösten Teilchen, der Wechselwirkung mit dem Medium und der im System angelegten Spannung. Für die Herstellung des elektrophoretischen Systems wird ein Trennmedium, bestehend aus Puffer und Träger (hier Agarosegel) und ein Stromversorger benötigt. Der Träger wird in eine Elektrophoresekammer eingesetzt, welche mit dem Stromversorger in Verbindung steht. Der Stromversorger erzeugt in der Elektrophoresekammer einen Minuspol (= Kathode) und einen Pluspol (= Anode), welche für die Wanderung von geladenen Teilchen entsprechend ihrer Ladung verantwortlich sind (61). Werden nun die Slots im Agarosegel mit Proben beladen und ein Stromfluss erzeugt, wandern die geladenen Bestandteile der Probe abhängig von ihrer Ladung im elektrischen Feld, was es ermöglicht, die Proben auf ihre Bestandteile hin zu analysieren.

Am häufigsten wird die Elektrophorese zur Trennung von Nucleinsäuren und Proteinen angewendet. Die geladenen Teilchen der Nucleinsäuren und Proteine werden auch als Polyionen bezeichnet (61). Das bedeutet, dass Nucleinsäuren und Proteine aus einer Kette geladener Atome bestehen, die sowohl positive, als auch negative Bausteine enthalten kann. Durch Anlegen von Spannung wandern die geladenen Teilchen im elektrischen Feld entlang ihrer Ladung. Aufgrund ihrer negativen Phosphatgruppe verhalten sich die geladenen Teilchen der Nucleinsäuren als Polyanionen und wandern bei elektrischer Spannung zur positiv geladenen Anode. Wichtig für die Wanderung der geladenen Teilchen ist neben ihrer Ladung auch die Porenstruktur der verwendeten Gele, denn dadurch wandern die geladenen DNA-Fragmente unterschiedlich schnell entlang des Elektrophoresegels. (61). Die Teilchen werden nach ihrer Größe und Ladung aufgeteilt. Die Größe der untersuchten Proben kann man dann mit Referenzmarkern vergleichen. Man kann durch die Position im Agarose-Gel die Fragmentgröße darstellen und bestimmen.

2.2.4 Agarosegel

Agarosegele werden standardmäßig zur Trennung von linearen DNA-Fragmenten, superhelikalen Plasmid-DNA und RNA-Proben verwendet (34). Dabei spielt die Konzentration der Agarose für die Trennbereiche von DNA-Fragmenten eine entscheidende Rolle. Konzentrationen von 0,9 bis 1,2% Agarose ermöglichen die Wanderung von DNA-Fragmenten mit einer Kettenlänge von 0,5 bis 7 Kilobasenpaaren (kb) durch die Poren des Agarosegels. Das liegt an der Porengröße des Agarosegels. Ist die Konzentration der Agarose niedrig, so sind die Poren sehr groß und es können größere DNA-Fragmente elektrophoretisch durch die Poren wandern. Bei hohen Agarosekonzentrationen von 2% können kleinere DNA-Fragmente mit einer Kettenlänge von 0,1 bis 2 kb durch die Poren wandern (34). Die DNA-Fragmente von gleicher Größe sammeln sich bei der elektrophoretischen Trennung als gebündelte Bande auf gleicher Höhe.

2.2.5 Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese

Abhängig von der Anzahl der durchgeführten PCR-Ansätze, sowie der zu untersuchenden Kettenlänge der Proben, wurde die Größe des Elektrophoresegels gewählt. Dementsprechend wurde die notwendige Menge an 1x TBE-Puffer mit der erforderlichen Menge an Agarose vermischt (vgl. Tabelle 2.15). Anschließend wurde diese in einer Mikrowelle erhitzt, bis sich die Agarose vollständig im 1x TBE-Puffer aufgelöst hat. Die Lösung wurde daraufhin auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurde der Lösung SERVA-DNA-Stain-ClearG, ein Farbstoff der der Nukleinsäuredetektion dient, hinzugefügt. Die hinzugefügte Menge variiert hierbei in Abhängigkeit von der Größe des Agarosegels (vgl. Tabelle 2.15). Die Lösung wurde im Anschluss in einen Gelträger gegossen und abkühlen gelassen. Um Slots zu schaffen, in die man die jeweiligen PCR-Ansätze pipettieren konnte, musste die Lösung mit einem eingespannten Elektrophorese-Kamm abgekühlt werden.

Im weiteren Verlauf wurden die eingespannten Elektrophorese-Kämme entfernt. Die daraus entstandenen Slots wurden dann mit den jeweiligen Proben befüllt. Dabei variierte die eingesetzte Menge der Probe in Abhängigkeit von der Größe der Slots. Wurde eine höhere Menge von einem PCR-Produkt benötigt, so wurde mit größeren Slots gearbeitet. Bei Amplifikationskontrollen oder Nachweisen von Fragmentgrößen der DNA-Fragmente, reichten bereits 5 - 10 µl der Probe aus. Um die Bandengröße bestimmen zu können, wurden in einen Slot des Gels 5 µl eines DNA-Markers pipettiert,

2. Material und Methoden

welcher als Orientierungshilfe für die gesuchten Banden diene. Hierbei wurden spezifische Gene Ruler (100 bp und 1 kb) verwendet, welche bekannte DNA-Fragmentgrößen als Referenzpunkte für die Probenauswertung besitzen. Damit konnten DNA-Fragmente unbekannter Größe in den Proben bestimmt werden. Danach wurden die Spannung sowie die Laufzeit der Elektrophorese eingestellt. Diese sind in Tabelle 2.15 dargestellt. Mit Abschluss der Laufzeit, wurde das Gel aus der Gelelektrophoresekammer entnommen und die Banden mittels UV-Licht am BioDoc Analyser dargestellt.

Tabelle 2.15: Ansatz Gelelektrophorese

Elektrophoresekammer	Spannung	Zeit	1xTBE-Puffer	Agarose	SERVA Stain Clear	Fragmentgröße
Compact S	100 V	45 min	50 ml	1% \cong 0,5 g	4 μ l	1 - 6 kb
Compact S	100 V	45 min	50 ml	2% \cong 1 g	4 μ l	0,1 - 2 kb
Compact M	100 V	60 min	100 ml	1% \cong 1 g	8 μ l	1 - 6 kb
Compact M	100 V	60 min	100 ml	2% \cong 2 g	8 μ l	0,1 - 2 kb

2.2.6 Nucleinsäureisolation aus Agarose-Gel

Die aufgetrennten Nucleinsäuresequenzen des PCR-Produktes fluoreszieren aufgrund des Farbstoffes unter Einfluss von UV-Licht und wurden somit am BioDoc Analyser sichtbar gemacht. Mit einem sauberen Skalpell wurden die benötigten Nucleinsäure-Banden aus dem Agarose-Gel herausgeschnitten und in Schnappdeckelreaktionsgefäße mit einem Fassungsvermögen von 1,5 ml abgewogen. Um die DNA-Fragmente der Bande für weitere Versuche verwenden zu können, wurde diese mit dem Kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up extrahiert und aufgereinigt. Dabei wurden die Vorgaben im Herstellerhandbuch befolgt. Es wurden folgende Schritte durchgeführt:

2. Material und Methoden

2.2.6.1 Vorbereitung

Für jede 100 mg an isolierter Agarose-Gel-Probe wurden 200 µl des NTI-Puffers zugegeben. Im Anschluss wurde die Lösung bei 50 °C für 10 Minuten im Wasserbad inkubiert. Ziel hierbei war die vollständige Auflösung des Agarosegels im NTI-Puffer der Probe. Hierfür wurde die Probe mehrfach aus dem Wasserbad entnommen und aufgeschüttelt.

2.2.6.2 Bindung der DNA

Nachdem sich das Agarosegel vollständig im NTI-Puffer aufgelöst hatte, wurde die Lösung in eine NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column pipettiert und für 30 s bei 11.000 x g zentrifugiert. Die DNA wurde dadurch an die Membran der NucleoSpin®-Säule gebunden, während die restliche Lösung in einem Sammelbehälter aufgefangen und verworfen wurde. Dieser Schritt wurde bei großen Mengen an Probenmaterial wiederholt, da das Fassungsvermögen der NucleoSpin®-Säule auf 700 µl pro Zentrifugation limitiert ist.

2.2.6.3 Reinigung der Membran

Zur Entfernung von Salzbeimengungen der Membran musste diese gereinigt werden. Dazu wurden zunächst 700 µl des NT3 Waschpuffers auf die Säulenmembran gegeben und erneut für 30 s bei 11.000 x g zentrifugiert. Dieser Reinigungsschritt wurde zweimal durchgeführt. Der aufgefangene Waschpuffer wurde dabei verworfen.

2.2.6.4 Trocknung der Membran

Die Trocknung der feuchten Membran der Säule mit den aufgereinigten DNA-Fragmenten erfolgte durch eine Zentrifugation der Säule für 1 min mit 11.000 x g. Die aufgefangenen Reste des Waschpuffers wurden hierbei wieder verworfen.

2.2.6.5 DNA-Elution

Im letzten Schritt wurde die NucleoSpin®-Säule in ein neues, sauberes Schnappdeckelreaktionsgefäß mit einem Fassungsvermögen von 1,5 ml überführt. Es wurden 30 µl NE-Puffer auf die trockene Membran der Säule pipettiert und diese für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Probe für 1 min mit 11.000 x g zentrifugiert. Die aufgereinigte DNA wurde durch diesen Schritt von der Membran gelöst und im Schnappdeckelreaktionsgefäß aufgefangen.

Die DNA-Konzentration dieser Lösung wurde im weiteren Verlauf bestimmt (vgl. Kapitel 2.2.7).

2. Material und Methoden

2.2.7 Messung von Konzentrationen mittels Spektralphotometer

Zur Messung der Konzentration von Nukleinsäuren in einer Lösung wurde ein Photometer verwendet. Photometer messen dabei die Lichtabsorption einer Substanz in Abhängigkeit von der Wellenlänge (40). Es wird eine Lichtquelle verwendet, die Licht emittiert und dieses durch die zu untersuchende Probe leitet. Dabei befindet sich die zu untersuchende Probe in einer lichtdurchlässigen Probenkammer. Ein Detektor auf der gegenüberliegenden Seite der Lichtquelle misst die Menge an transmittiertem Licht und erfasst dessen Intensität. Anhand dieser gemessenen Intensität kann die Absorption der Probe bei diversen Wellenlängen bestimmt werden. In den Untersuchungen wurde 1 µl der isolierten DNA-Lösung mit 9 µl destilliertem Wasser verdünnt. Das Spektralphotometer musste auf den Verdünnungsgrad der Probe eingestellt werden. Die 10 µl verdünnte DNA-Probe wurde dann in eine lichtdurchlässige Probenkammer pipettiert. Die Probenkammer wurde in das Spektralphotometer eingesetzt und die Intensität an transmittiertem Licht wurde erfasst. Diese ermöglicht es, die Konzentration in der verdünnten Lösung zu messen. Dadurch kann die DNA-Konzentration der isolierten Proben gemessen werden.

2.2.8 Ligation

Die Ligation stellt eine molekularbiologische Methode dar, welche zu einer Verknüpfung von dsDNA führt (73, 64). Hierbei katalysiert das Enzym, die T4-Ligase, unter Verbrauch von ATP und Mg^{2+} -Ionen die Bildung von Phosphodiesterbindungen. DNA-Ligasen sind zwar in allen Zellen vorhanden, doch wurde die verwendete Ligase aus dem Bakteriophagen T4 isoliert (73). Prinzipiell unterscheidet man bei der Ligation 2 Arten der Ligation. Es gibt einerseits die Sticky-end Ligation bei der komplementäre überhängende DNA-Enden verbunden werden und andererseits die Blunt-end Ligation bei der nicht-komplementäre DNA-Enden ohne Sequenzkomplementarität ligiert werden. Da die Primerpaare so gewählt wurden, dass sie die komplette DNA-Sequenz gegenläufig amplifizieren, wurde in dieser Arbeit letztere durchgeführt. Das vorher lineare Plasmid liegt nach Verknüpfung der Enden der DNA-Doppelstränge ringförmig vor.

Die Ligation wurde bei 16 °C für 16 Stunden inkubiert und im Anschluss wurde die T4-Ligase für 10 min bei 65 °C inaktiviert. Die Produkte der Ligationsversuche wurden anschließend im Gefrierschrank bei -20 °C gelagert.

Tabelle 2.16: Zusammensetzung eines Ligations-Ansatzes

Edukt	Menge (µl)
Lineare DNA	mit einer Konzentration von ca. 100 ng/µl
T4 Ligase Puffer	2 µl
T4 Ligase	1 µl
ddH ₂ O	ad 20 µl
Gesamt	20 µl

2.2.9 Bakterienzellkulturen

2.2.9.1 Herstellung von Luria-Bertani (LB)-Ampicillin-Platten

Um die folgenden Experimente durchführen zu können, bedurfte es LB-Ampicillin-Platten. Um ca. 25 Platten herzustellen wurden 12,5 g LB-Pulver in 500 ml Wasser gelöst und 7,5 g (1,5%) Select Agar hinzugefügt. Diese Lösung wurde dann autoklaviert. Nach der Autoklavierung erfolgte die Herunterkühlung der Lösung auf ca. 50 °C. Im Anschluss wurden noch 500 µl (100 mg/ml) Ampicillin zur Lösung hinzugefügt. Die Lösung wurde erneut vermischt, und unter der Sterilbank wurden jeweils 15 - 20 ml dieser Lösung auf 10 cm-Petrischalen verteilt. Nachdem die Petrischalen abgekühlt waren, wurden sie im Kühlschrank bei 8 °C aufbewahrt.

2.2.9.2 Herstellung von elektrokompetenten Zellen

Grundsätzlich werden Zellen, welche fremde DNA aufnehmen können als kompetente Zellen bezeichnet (73). Kompetente Zellen werden für Transformationen und Transfektionen (vgl. Kapitel 2.2.17) benötigt. Zum Ansetzen von elektrokompetenten Zellen wurde zunächst 5 ml LB-Medium mit 5 µl Tetracyclin (Konzentration) versetzt und mit 5 µl E. coli Bakterien aus einem Glyzerinstock inokuliert. Diese wurden auf einem Orbitalschüttler mit 180 Umdrehungen pro Minute (=rpm) bei 37 °C für 16 h inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde mit dieser Suspension ein Erlenmeyerkolben mit 200 ml LB-Medium und 200 µl Tetracyclin (Konzentration) vermischt. Der Erlenmeyerkolben wurde auf einem Orbitalschüttler mit 180 rpm bei 37 °C inkubiert, bis die Kultur eine optische Dichte bei 600 nm (=OD₆₀₀) von 0,6 - 0,8 erreicht hatte.

2. Material und Methoden

Die Lösung wurde dann auf 50 ml Schraubdeckelröhrchen verteilt und für 30 min auf Eis gestellt. Im Anschluss wurden die Schraubdeckelröhrchen bei 4 °C für 10 min mit 5100 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellpellets am Boden der Schraubdeckelröhrchen wurden jeweils mit 2,5 ml kalter 1 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (= HEPES) so lange vermischt, bis die Zellpellets in der Lösung vollständig suspendiert waren. Danach wurde in jedes Schraubdeckelröhrchen erneut 12,5 ml kalte 1 mM HEPES hinzugefügt und bei 4 °C für 10 min mit 5100 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde hierbei wieder verworfen. Dann wurden jeweils 12,5 ml kalte 1 mM HEPES zu zwei Zellpellets hinzugegeben und diese so lange vermischt, bis die Zellpellets in der HEPES-Lösung vollständig suspendiert waren. Anschließend wurden diese 12,5 ml aufgezogen und in die beiden jeweiligen Schraubdeckelröhrchen mit Zellpellets pipettiert, sodass nur noch zwei 50 ml Schraubdeckelröhrchen mit jeweils 12,5 ml 1 mM HEPES und zwei suspendierte Zellpellets übrigblieben. Diese wurden erneut bei 4 °C für 10 min mit 5100 x g zentrifugiert.

Der Überstand wurde wieder verworfen und den beiden Schraubdeckelröhrchen jeweils 5 ml kaltes 10 % Glycerin beigefügt. Die Zellpellets wurden vollständig darin suspendiert. Der Inhalt beider Schraubdeckelröhrchen wurde dann in ein Schraubdeckelröhrchen überführt und dieses bei 4 °C für 10 min mit 5100 x g zentrifugiert. Anschließend wurden 5 ml kaltes 10% Glycerin in das Schraubdeckelröhrchen hinzugefügt und das Zellpellet wieder vollständig in der Lösung suspendiert. Das Schraubdeckelröhrchen wurde erneut bei 4 °C für 10 min mit 5100 x g zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Abschließend wurden 0,5 ml kaltes 10% Glycerin hinzugefügt. Die Zellen wurden entweder direkt für die Transformation genutzt, oder jeweils 50 µl in 1,5 ml Schnappdeckelreaktionsgefäße pipettiert und bei -80 °C im Gefrierschrank gelagert.

2.2.10 Transformation

Die Transformation beschreibt den Prozess, bei dem fremde DNA in kompetente Bakterienzellen eingeführt wird (77). Wichtig hierbei ist der Organismus, welcher die freie DNA aufnimmt. Handelt es sich bei den kompetenten Zellen um Bakterien, so spricht man von Transformation. Ist hingegen die kompetente Zelle eine Eukaryote, so wird der Mechanismus als Transfektion bezeichnet (vgl. Kapitel 2.2.15). Es kann bei der Transformation zwischen einer chemischen Transformation und einer Elektroporation unterschieden werden. Bei der Elektroporation wird die Zellmembran der E. coli Bakterien kurzzeitig mit Spannung versetzt, wodurch die Membran für fremde DNA durchlässiger wird (77). Dadurch kann die fremde DNA in die Zielzelle eingeschleust werden.

2.2.11 Durchführung der Elektrotransformation von Bakterien

Zu Beginn wurden die elektrokompetenten Zellen aus dem Gefrierschrank entnommen und 2 µl der Ligationslösung beigefügt. Die Zellen wurden kurz mit der beigefügten Ligationslösung vermischt und für 10 min auf Eis inkubiert. In der Zwischenzeit wurde der Multiporator mit einer Spannung von 2000 V und 5 ms eingestellt. Nach der Inkubationszeit wurde die Lösung aus Ligationslösung und elektrokompetenten Zellen in die Elektroporationsküvette überführt. Der Multiporator bestimmte die Spannung in V sowie die Zeit in ms des Stromstoßes bis zum Kurzschluss, welche im Protokollbuch dokumentiert wurden. Die Lösung wurde nun mit 450 µl LB-Medium in der Elektroporationsküvette aufgespült. Im Anschluss wurde die Lösung aus der Elektroporationsküvette in ein 1,5 ml Schnappdeckelreaktionsgefäß pipettiert und für 90 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Um die frisch transformierten Bakterien in einem optimalen Milieu anzuzüchten, wurden in der Zwischenzeit bereits LB-Ampicillin-Platten bei 37 °C im Brutschrank erwärmt. Nach der Inkubationszeit wurden die elektrokompetenten Zellen für 5 min bei 300 x g zentrifugiert und 400 µl des Überstands verworfen. Übrigbleiben sollten das Pellet der elektrokompetenten Zellen sowie ca. 100 µl LB-Medium. Das Pellet wurde vollständig in dem Medium suspendiert und dann zentrifugiert. Hiervon wurden 100 µl auf die vorgewärmte LB-Ampicillin-Platte gegeben und ausgestrichen. Die Platte wurde danach für 12 – 18 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

2.2.12 Isolation der Bakterienkolonie

Unter optimalen Wachstumsbedingungen bilden E. coli Bakterien auf Agar-Platten weiße punktförmige Kolonien aus (81). Um eine erfolgreiche Transformation nachweisen zu können, macht man sich der Insertion von Antibiotikasequenzen zu Nutze. In die gewünschte DNA-Sequenz wurde eine Ampicillin-Resistenz eingebaut, sodass Zellen, welche nicht erfolgreich transformiert wurden auf der LB-Ampicillin-Platte absterben, wohingegen erfolgreich transformierte Zellen weiße punktförmige Kolonien bilden. Somit wurden Klone hergestellt. Falls sich Klone nach einer Transformation gebildet haben, wurden diese aus der Agarplatte ausgestanzt. In 15 ml Kulturgefäßen wurden jeweils 5 ml LB-Medium mit 5 µl Ampicillin (100 mg/l) gegeben und die jeweiligen ausgestanzten Kolonien hinzugefügt. Hierbei wurde jeder Klon einzeln isoliert. Das Kulturgefäß wurde im Anschluss auf einem Orbitalschüttler bei 37 °C für weitere 12 – 18 h inkubiert.

2.2.13 Isolation von Plasmiden aus den *E. coli* Kolonien

Nach erfolgreicher Inkubation sollten die Medien der 15 ml Kulturgefäße trüb sein. Aus diesen Medien konnte man dann das Plasmid isolieren. Zur Isolierung der Plasmid-DNA wurden sowohl das NucleoSpin® Plasmid QuickPure Protokoll, als auch das QIAGEN® Plasmid Maxi Kit verwendet. Hierbei wurden folgende Durchführungsschritte nach Herstellerhandbuch befolgt:

NucleoSpin® Plasmid QuickPure Protokoll:

2.2.13.1 Ernte der *E. coli* Bakterien

Die 15 ml Bakterienkulturen wurden für 30 s mit 11.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, sodass lediglich das Zellpellet am Boden des Kulturgefäßes verblieb.

2.2.13.2 Zellyse

Zur Resuspension der Pellets wurden 250 µl des Resuspensionspuffers A1 zu dem Pellet gegeben. Dies wurde so lange vermischt, bis sich das Zellpellet vollständig im Puffer aufgelöst hatte. Danach wurde die Lösung vollständig aufgenommen und in ein 1,5 ml Schnappdeckelreaktionsgefäß überführt. Hierzu wurden dann 250 µl Lysepuffer A2 hinzugefügt. Dieser sorgte für die Zerstörung der Bakterienzellmembran. Das Schnappdeckelreaktionsgefäß wurde 6- bis 8-mal invertiert, um die Bakterien vollständig zu lysieren. Danach wurde die Lösung für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Zugabe von 300 µl des Neutralisierungspuffers A3 zu der Lösung. Diese wurde erneut 6- bis 8-mal invertiert, um die Proteine auszufällen. Die Klärung der Lösung wurde durch 5 min Zentrifugieren bei 11.000 g erreicht.

2.2.13.3 DNA-Bindung

700 µl des Überstands aus Schritt 2 wurden in eine NucleoSpin® Plasmid QuickPure Säule pipettiert und im Anschluss durch 1-minütiges Zentrifugieren bei 11.000 x g an die Membran der Säule gebunden. Dieser Schritt wurde so oft wiederholt, bis der komplette Überstand zentrifugiert war.

2.2.13.4 Reinigung und Trocknung der Membran

Zur Membran der Säule wurden 450 µl des Waschpuffers AQ hinzugefügt und diese wurde für 3 min bei 11.000 x g zentrifugiert. Durch die Reinigung versuchte man, die Konzentration an Salzbindungen in der Membran zu reduzieren. Im Anschluss wurde die gereinigte Membran für weitere 3 min bei 11.000 x g zentrifugiert, wobei der

2. Material und Methoden

aufgefangene Waschpuffer verworfen wurde. Danach wurde die Säule in ein neues, sauberes Schnappdeckelreaktionsgefäß überführt.

2.2.13.5 DNA-Elution

Auf die trockene Membran der Säule wurden 30 µl ddH₂O gegeben und diese für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die Zugabe von ddH₂O konnte sich die gebundene Plasmid-DNA von der Membran lösen. Die Säule wurde dann für 1 min bei 11.000 x g zentrifugiert. Die Plasmid-DNA war nun in der aufgefangenen Lösung im Schnappdeckelreaktionsgefäß.

Zuletzt wurde die Konzentration der Plasmid-DNA in der Lösung mittels Photometer bestimmt.

QIAGEN® Plasmid Maxi Kit:

Dieses Kit wurde verwendet, um eine große Menge an Plasmidmaterial zu isolieren und damit eine Vielzahl von Versuchen durchführen zu können. Dabei wurden die Schritte laut Herstellerhandbuch durchgeführt.

2.2.13.6 Ansatz und Ernte der Bakterien

Es wurde ein Erlenmeyerkolben mit einem Fassungsvermögen von 300 ml mit 200 ml LB-Medium befüllt. Hinzu kamen 200 µl Ampicillin (Konzentration), sowie etwa 10 µl Bakterienkultur aus einem Glycerinstock. Der Erlenmeyerkolben wurde in den Schüttler bei 37 °C mit 180 rpm für 12 - 18h inkubiert. Anschließend wurde der Inhalt des Erlenmeyerkolbens auf vier 50 ml Schraubdeckelröhrchen verteilt und für 15 min bei 4 °C mit 6000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.

2.2.13.7 Zellyse

Das Zellpellet eines Schraubdeckelröhrchens wurde mit 10 ml Resuspensionspuffer P1 vollständig resuspendiert und mit einer Pipette aufgezogen. Die komplette Lösung wurde im nächsten Schraubdeckelröhrchen der ursprünglichen vier erneut resuspendiert. Dieser Vorgang wurde in jedem der vier Schraubdeckelröhrchen wiederholt, bis die Resuspensionslösung alle Zellpellets beinhaltete. Die Lösung wurde in ein neues sauberes 50 ml Schraubdeckelröhrchen übertragen. Es wurden 10 ml des Lysepuffers P2 zur Lösung hinzugegeben und das Schraubdeckelröhrchen 4- bis 6-mal invertiert, sodass sich der Lysepuffer mit der Resuspensionslösung vermischen konnte. Dadurch kam es zur Zerstörung der Zellwände und zur Freisetzung des intrazellulären Zellmaterials. Die Lösung wurde nach dem Invertieren für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 10 ml des gekühlten Neutralisierungspuffers P3 hinzugegeben

2. Material und Methoden

und das Schraubdeckelröhrchen erneut für 4- bis 6-mal invertiert. Im Anschluss wurde das Schraubdeckelröhrchen für 20 min auf Eis gestellt.

2.2.13.8 Äquilibration der Säulen

Die QIAGEN-tip 500-Säulen wurden vor der Verwendung mit 10 ml des QBT Puffers äquilibriert. Dies sorgte dafür, dass die Plasmid-DNA der vorher vorbereiteten Lösung besser an die Membran der Säule binden konnte. Die 10 ml QBT-Puffer liefen dabei durch die Membran und wurden in einem Schraubdeckelröhrchen aufgefangen und verworfen.

2.2.13.9 DNA-Bindung

Die in Schritt 2 inkubierte Lösung wurde nun bei 4 °C mit über 20.000 x g für 30 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand in ein neues 50 ml Schraubdeckelröhrchen pipettiert. Im Anschluss wurde dieser erneut bei 4 °C mit über 20.000 x g für 15 min zentrifugiert. Diese Lösung wurde dann in die QIAGEN-tip 500-Säule pipettiert und gewartet, bis die Lösung die Membran vollständig passierte. Die Plasmid-DNA konnte somit an die Membran der Säule binden.

2.2.13.10 Reinigung der Membran

Die Membran wurde als Nächstes zweimal mit 30 ml des Waschpuffers QC gereinigt. Auch hier wurde gewartet, bis der Waschpuffer die Membran vollständig passiert hatte. Die Säule wurde dann in ein neues 50 ml Schraubdeckelröhrchen übertragen.

2.2.13.11 DNA-Elution

Danach erfolgte die Elution der DNA mittels Verwendung von 15 ml Elutionspuffer QF. Dieser wurde auf die Membran gegeben und es wurde gewartet, bis dieser die Membran vollständig passiert hatte. Dadurch löste sich die Plasmid-DNA von der Membran und gelangte in das neue Schraubdeckelröhrchen.

2.2.13.12 Ausfällung der DNA

Der Elutionslösung wurde als Nächstes mit 10,5 ml Isopropanol vermischt. Im Anschluss daran wurde die Lösung bei 4 °C mit über 15.000 x g für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und es wurden 5 ml an 70-prozentigem Ethanol in das Schraubdeckelröhrchen hinzugegeben. Danach wurde das Schraubdeckelröhrchen bei Raumtemperatur mit über 15.000 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen. Im Schraubdeckelröhrchen war nun manchmal ein kleines Zellpellet sichtbar. Abschließend wurde das Schraubdeckelröhrchen für 5 bis 10 min luftgetrocknet

2. Material und Methoden

und das Zellpellet in 450 µl TE-Puffer aufgelöst. Die Lösung wurde dann über Nacht belassen, damit das Zellpellet vollständig im TE-Puffer gelöst werden konnte.

2.2.14 Prinzip der DNA-Sequenzierung

Mithilfe der Sequenzierung kann die Nukleotidabfolge der DNA bestimmt werden (77). Dabei macht man sich Methoden, wie die Sanger-Sequenzierung (=Kettenabbruchmethode) zunutze (64). Bei der Sanger-Sequenzierung wird neben den dNTPs mit Didesoxynucleosid-Triposphate (=ddNTP) gearbeitet, welche entsprechend der korrespondierenden Base (Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin) mit vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Diese werden zufällig von der DNA-Polymerase bei der Synthese eines DNA-Stranges (ssDNA) in die komplementären DNA-Stränge eingebaut und verursachen einen sofortigen Abbruch der Synthese (77). Es folgt die Analyse der unterschiedlich großen DNA-Fragmente in einer Kapillarelektrophorese. Dabei werden sie anhand ihrer Fragmentgröße aufgetrennt. Im Anschluss werden die markierten ddNTPs mithilfe eines Lasers zur Fluoreszenz stimuliert, wodurch die genaue Basenabfolge der DNA-Sequenz bestimmt werden kann. Die Sequenzierung wurde in den Versuchen verwendet, um die unterschiedlichen Plasmide auf das Vorhandensein der eingebrachten Mutationen (M1 - M5, sowie V1 - V3) zu überprüfen. Hierbei wurden die jeweiligen Sequenzierungsansätze in ein externes Labor geschickt, wo eine Sanger-Sequenzierung durchgeführt wurde. Die Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung wurden mit der Sequenz des Referenzplasmids verglichen und somit konnten Abweichungen festgestellt werden. Hierbei wurde das Programm CLC DNA-Workbench verwendet, in welchem die genaue Basenabfolge des Referenzplasmids gespeichert war.

Tabelle 2.17: Sequenzierungsansatz zur Untersuchung eines Plasmids

Edukte	Menge
Aufgereinigtes Plasmid	14 µl
Primer	1 µl
	15 µl

2. Material und Methoden

2.2.15 Bakterienstammkulturen

Die langfristige Lagerung von Bakterienzellen und Plasmiden erfolgt in Glycerinstocks. So konnten die erzeugten Bakterienklone gelagert werden, um größere Mengen an Plasmid-DNA zu erzeugen. Durch das Vermengen von 100-prozentigem Glycerin mit den Bakteriensuspensionen wurde beim Einfrieren bei -80 °C gewährleistet, dass die Bakterienzellen nicht abstarben.

Zur Herstellung von Glycerinstocks wurden 800 µl der gewünschten Bakteriensuspension mit 200 µl 100-prozentigem Glycerin in einem Kryoröhrchen vermischt. Das Röhrchen wurde dann bei -80 °C gelagert.

2.2.16 Zellkultur mit HEK-293 Zellen

Bei der Zellkultur wurde mit HEK-293 Zellen gearbeitet. Zu Beginn wurden diese aus dem -80 °C-Gefrierschrank entnommen, auf Raumtemperatur aufgetaut und in Zellkulturflaschen mit einem Fassungsvermögen von 250 ml überführt. Die Zellkulturflaschen sollten bereits mit Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) gefüllt sein. Zur Aktivierung von DMEM wurden 435 ml DMEM-Lösung mit 50 ml fetalem Kälberserum (FKS), 10 ml L-Glutamin und 5 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung gemischt. Prinzipiell wurden die HEK-293 Zellen im Brutschrank bei 37 °C mit 5-prozentigem CO₂ inkubiert.

2.2.16.1 *Mediumwechsel*

In regelmäßigen Abständen wurde das Medium der 250 ml umfassenden Zellkulturflaschen mit den kultivierten HEK-293 Zellen gewechselt, um diese mit frischem Nährmedium zu versorgen. Dafür wurde das ursprüngliche aktivierte DMEM entfernt und gegen 15 ml neues DMEM in den Zellflaschen getauscht. Dabei war darauf zu achten, den Zellrasen nicht mechanisch durch die Mediumzugabe zu beschädigen.

2.2.16.2 *Zellpassage*

Wiesen die HEK-293 Zellen in den Zellkulturflaschen eine 90 – 100-prozentige Konfluenz auf, mussten diese passagiert werden. Die Zellpassage erfolgte durch Abnahme des Mediums und Zugabe von 1 ml inaktivem DMEM. Dieses wurde in der Zellkulturflasche so verteilt, dass alle Zellen von dem inaktiven DMEM bedeckt waren. Im Anschluss wurde das inaktive DMEM entnommen und 1 ml Accutase-Lösung in die Zellkulturflasche hinzugegeben. Hierbei wurde erneut jede Zelle mit der Accutase bedeckt und die Zellflasche für 5 min bei 37 °C inkubiert, um das Temperaturoptimum

2. Material und Methoden

für die Accutase zu gewährleisten. Nach der Inkubation ließ sich der Zellrasen durch sanftes Klopfen an die Zellkulturflasche leicht vom Untergrund lösen. In ein 15 ml Röhrchen wurden 5 ml aktiviertes DMEM gegeben. Dann wurde die Accutase mit den abgelösten HEK-293 Zellen entnommen und in das 15 ml Röhrchen pipettiert, welches dann für 5 min mit 300 x g zentrifugiert wurde. Der Überstand des Röhrchens wurde verworfen. Abschließend wurde, abhängig von der gewünschten Konzentration der HEK-293 Zellen, das Pellet mit aktiviertem DMEM aufgefüllt und auf frische Zellkulturflaschen mit einem Fassungsvermögen von 250 ml übertragen.

2.2.17 Transfektion der HEK-293 Zellen

Das Einbringen von exogener DNA in eukaryotische Zellen wird als Transfektion bezeichnet (25, 23). Die HEK-293 Zellen wurden nach folgendem Prinzip transfiziert:

2.2.17.1 Zellernte und Zellpassage

Zunächst wurden die Zellkulturflaschen mit den HEK-293 Zellen mittels Accutase vom Flaschenboden gelöst und in ein 15 ml Schraubdeckelröhrchen pipettiert. Das Schraubdeckelröhrchen wurde danach für 5 min mit 300 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet am Boden des Schraubdeckelröhrchens wurde mit 1 ml aktiviertem DMEM vermischt und es wurden 2 Tropfen auf die Neubauerkammer pipettiert. Somit konnte im nächsten Schritt die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer und manueller Zellzählung im Schraubdeckelröhrchen annäherungsweise bestimmt werden. Dies war nötig, um bei der Transfektion eine annähernd gleiche Zellzahl in allen Wells zu haben.

2.2.17.2 Vorbereitung des Transfektionsansatzes

Nachdem mittels manueller Zellzählung bestimmt werden konnte, wie viele Zellen in der Lösung waren, ließ sich eine vorab festgelegte Zellzahl (in diesem Fall 300.000 Zellen) mit aktiviertem DMEM in 1 ml suspendieren und anschließend in die jeweiligen Wells pipettieren. Im Anschluss wurde die 24-Well Platte im Brutschrank für ca. 4 h inkubiert. Dadurch wurde sichergestellt, dass die Zellen am Boden anhefteten und bereits anwachsen konnten.

2.2.17.3 Vorbereitung des Transfektionsmixes

Kurz vor Ende der Inkubationszeit wurde der Transfektionsmix eines jeweiligen Wells vorbereitet. Hierfür wurden 1,25 µg Plasmid mit 150 mM NaCl auf 25 µl eingestellt. Diese

2. Material und Methoden

Lösung wurde zusätzlich mit 125 µl PEI-Mix vermengt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.17.4 Transfektion

Das Medium der Slots wurde entnommen und verworfen. Gleichzeitig wurden 450 µl frisches aktiviertes DMEM in die Slots gegeben. Hierhin wurden dann die 50 µl des Transfektions-Mix pipettiert und die 24-Well Platte für 12 - 18h im Brutschrank inkubiert. Die Menge an transfizierten HEK-293 Zellen wurde mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie abgeschätzt. Hierbei wurde das Fluoreszenz-Mikroskop BZ-8100E von Keyence genutzt. Die Zellen der jeweiligen Slots wurden hierbei mit ultraviolettem oder sichtbarem Licht bestrahlt und zur Emittierung von Licht angeregt. Dies wurde im Fluoreszenz-Mikroskop erfasst und sichtbar gemacht. Da nur die transfizierten Zellen das Licht emittierten, konnte ihre Menge bestimmt werden. Zur Kontrolle der Transfektion wurde das grün fluoreszierende Protein (= GFP) verwendet. Das liegt daran, dass GFP grünes Licht emittiert, wenn es mit Licht bei etwa 480 nm angeregt wird. Wurden nur wenige transfizierte Zellen sichtbar, so wurde die Probe verworfen. Nur bei einer hinreichend großen Transfektionsrate wurde aus den Zellen die RNA isoliert.

2.2.18 RNA-Isolation aus HEK-293 Zellen

Für die RNA-Isolation der HEK-293 Zellen wurde das QIAamp RNA Blood Mini Kit verwendet. Hierbei wurden die folgenden Schritte durchgeführt:

2.2.18.1 Zellernte

Die HEK-293 Zellen in den einzelnen Wells wurden zunächst geerntet. Dafür wurde zunächst vorsichtig das Medium in ein Schnappdeckelreaktionsgefäß pipettiert, ohne dabei den Zellrasen der HEK-293 Zellen am Boden der Wells zu beschädigen. Danach wurden in die Wells 100 µl inaktives DMEM gegeben und dieses wieder abpipettiert und in das gleiche Reaktionsgefäß wie das Zellmedium überführt. Als Letztes wurden 100 µl Accutase in die Slots gegeben, um die HEK-Zellen von diesen zu lösen. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei 37 °C wurde die Accutase mit den Zellen aufgezogen und ebenfalls in das Reaktionsgefäß gegeben. Danach wurden die jeweiligen Reaktionsgefäße in der Zentrifuge für 5 min bei 300 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde dann mit 350 µl RLT Puffer und 3,5 µl β-Mercaptoethanol (β-ME) vermischt, bis die Flüssigkeit frei von sichtbaren Zellresten war. Somit wurden die Zellen durch die Lösung aufgerissen, wodurch Bestandteile des Intrazellularraums freigesetzt wurden.

2. Material und Methoden

2.2.18.2 *Reinigung und Präzipitation*

Die klare Lösung aus Schritt 1 wurde in eine QIAshredder-Säule gegeben und für 2 min mit maximaler Drehzahl (=rpm) zentrifugiert. Somit wurde die RNA von anderen zellulären Kompartimenten getrennt. Daraufhin wurden 350 µl 70-prozentiges Ethanol in die Lösung gegeben und vermischt. Dadurch wurde die RNA präzipitiert. Die Flüssigkeit, sowie das eventuell gebildete Präzipitat wurden vollständig in eine QIAamp Spin-Säule pipettiert und für 15 s mit 8000 x g zentrifugiert. Damit wurde die Bindung der RNA an die Membran der Säule gewährleistet.

2.2.18.3 *DNase Reaktion*

Zur vollständigen Isolierung der RNA von der DNA, wurde auf der Säule eine DNase-Reaktion durchgeführt. Hierbei wurde zunächst 350 µl des RW1-Puffers auf die Säule gegeben. Im Anschluss wurde die Säule für 15 s mit 8000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Dann wurden 10 µl DNase-1-Lösung mit 70 µl RDD-Puffer in einem separaten Schnappdeckelreaktionsgefäß vermischt und kurz zentrifugiert. Nun wurde der DNase-Mix auf die Membran der Säule gegeben. Es folgte eine Inkubation dieser Säule bei 20 – 30 °C. Im Anschluss an die Inkubation erfolgte die erneute Zugabe von 350 µl des RW1 Puffers auf die Säulenmembran. Die Säule wurde dann für 15 s mit 8000 x g zentrifugiert. Somit wurde die RNA komplett von DNA-Resten befreit. Der Überstand wurde verworfen.

2.2.18.4 *RNA-Reinigung und Trocknung*

Die Säule wurde nun mit der Zugabe von 500 µl RPE-Puffer gereinigt. Hierfür wurde die Säule mit 8000 x g für 15 s zentrifugiert. Der aufgefangene Reinigungspuffer wurde im Anschluss verworfen. Es wurden erneut 500 µl RPE-Puffer auf die Membran pipettiert und anschließend für 3 min mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der aufgefangene Waschpuffer wurde wieder verworfen. Zur Trocknung der Membran wurde die Säule für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Im Anschluss die Säule für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, um eine vollständige Trocknung der Membran zu erreichen.

2.2.18.5 RNA-Elution

Es erfolgte das Einsetzen der Säule in ein steriles 1,5 ml Schnappdeckelreaktionsgefäß. Auf die Säulenmembran wurden dann 35 µl DEPC-behandeltes Wasser gegeben. Es wurde in jedem Schritt darauf geachtet, mit doppelt autoklavierten Pipettenspitzen zu arbeiten, um eine RNase-Kontamination zu verhindern. Nachfolgend erfolgte die Zentrifugation der Säule für 1 min mit 8000 x g. Die isolierte RNA befand sich dadurch im Durchfluss. Diese wurde anschließend bis zur Verwendung für weitere Versuche bei -20 °C gelagert.

2.2.19 Kapillarelektrophorese

Unter der Kapillarelektrophorese versteht man eine bioanalytische Methode, welche den Grundlagen der Elektrophorese folgt (38). Sie ermöglicht, ähnlich wie die Gelelektrophorese, die Trennung von geladenen Molekülen in einem elektrischen Feld anhand ihrer unterschiedlichen elektrischen Mobilitäten (21). Anders als die Gelelektrophorese ist die Kapillarelektrophorese automatisierbar und kann bei der Analyse von RNA, DNA, Proteinen, Polymeren, Bakterien und Viren verwendet werden (40). Auch die deutlich schnellere Messung unterscheidet die Kapillarelektrophorese von anderen elektrophoretischen Auftrennungen (38). Die Trennung der Moleküle erfolgt durch eine Wechselwirkung der Proben mit dem Puffer und der Kapillarwand (49). Dies wird durch die Durchmesser der Kapillare und deren Beschaffenheit beeinflusst. Es wurde festgestellt, dass Kapillaren mit einem Durchmesser von 50 - 100 µm eine deutlich höhere Effizienz bei der Analysefähigkeit zeigen, als Kapillare mit einem höheren Durchmesser (40). Vorrangig Quarzglas wird als Material für die Kapillare verwendet, da dieses die Oberflächeneigenschaft beeinflusst und den elektroosmotischen Fluss fördert (49). Der elektroosmotische Fluss ist dabei ein Teilchenfluss, welcher durch die Wechselwirkung von einem elektrischen Feld und der geladenen Oberfläche von Kapillaren entsteht (115). Diese werden mittels Spannung im elektrischen Feld in Bewegung gebracht.

Die Kapillaren sind mit Puffer gefüllt, der gelöste Ionen beinhaltet. Diese sind für die Erzeugung des elektrischen Feldes entscheidend (49). Durch Anlegen von Spannung werden die Proben mittels elektroosmotischem Fluss in die Kapillare gezogen (115). Dabei wandern die Moleküle entsprechend ihrer elektrophoretischen Mobilität entlang der Kapillare (49). Die unterschiedlichen Wechselwirkungen der Proben mit dem Puffer und der Kapillarwand separieren diese. Durch die unterschiedliche elektrophoretische Mobilität sammeln sich ähnliche Moleküle an gleicher Position in der Kapillarachse.

2. Material und Methoden

Die Messung der separierten Moleküle erfolgt in der Regel mit einem Absorptionsdetektor, der die Moleküle an ihren finalen Positionen messen kann (40). Die Darstellung des Absorptionsdetektors erfolgt vorrangig in Peaks der Molekülmenge. Dies ermöglicht neben der Molekülgröße auch eine quantitative Analyse der Probe.

2.2.20 Durchführung der RNA-Analyse nach QIAxcel® RNA Handbuch

2.2.20.1 Verdünnung der RNA

Die in Kapitel 2.2.18 isolierte mRNA wurde mit DEPC-behandeltem Wasser auf eine Konzentration von 250 ng/µl verdünnt. Dies wurde mithilfe des Photometers bestimmt und entsprechend verdünnt.

2.2.20.2 Vorbereitung der Proben

Um die RNA für die Analyse vorzubereiten, wurden in 12-Tube Strips mit einem Fassungsvermögen von jeweils 0,2 ml 1 µl der RNA-Proben pipettiert. In eines dieser 12-Tube Strips wurde statt der RNA-Proben 1 µl des QX RNA Size Markers (200-6000) pipettiert. Zu allen verwendeten Slots wurden dann jeweils 2 µl QX RNA Denaturation Buffer hinzugefügt. Die befüllten 12-Tube Strips wurden danach für 2 Minuten auf 70 °C erhitzt und anschließend 1 Minute auf Eis abgekühlt. Um kein Probenmaterial durch Kondensation zu verlieren, wurden die Strips daraufhin zentrifugiert und mit QX RNA Dilution Buffer auf 10 µl aufgefüllt und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vorsichtig vermischt.

2.2.20.3 Analyse der Proben

Abschließend wurden die 12-Tube Strips in die Probenplattenhalter der QIAxcel-Kapillarelektrophorese gestellt, die Kapillarelektrophorese gestartet und mithilfe der QIAxcel ScreenGel-Software analysiert.

2.2.21 Reverse Transkriptase Reaktion

Um die Amplifikationsrate der RNA in den HEK-293 Zellen zu messen, muss die RNA in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben werden. Dafür ist eine Reverse Transkriptase-Reaktion (RT-Reaktion) notwendig. Diese schreibt mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase die RNA in cDNA um, womit es möglich wird, die cDNA in einer qPCR genauer zu analysieren.

Dabei wurde die RT-Reaktion wie folgt durchgeführt:

2. Material und Methoden

Zunächst wurde ein PCR-Tube mit 250 ng RNA in 1 µl, 1 µl Oligo (dT)₁₈ Primer und mit DEPC-behandeltem Wasser aufgefüllt, um am Ende eine Lösung mit 12 µl zu erhalten. Das Volumen richtet sich nach der gewünschten Menge an RNA (in unserem Fall 250 ng) und Primer, die im Tube erhalten sein sollten. Die Lösung wurde dann im Thermocycler für 5 min bei 65 °C inkubiert. Während der Inkubation wurde ein Ansatz der RT-Lösung vorbereitet. Dieser bestand aus 4 µl 5X Reactions-Puffer, 1 µl RiboLock™ RNase-Inhibitor, 2 µl 10 mM dNTP Mix und 1 µl RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase. Dieser wurde nach der Inkubation der vorher angefertigten 12 µl-Lösung in das PCR-Tube der Lösung hinzugefügt und mit der darin enthaltenen Lösung vermischt. Danach wurde das PCR-Tube erneut in die PCR Maschine gestellt und für 60 min bei 42 °C inkubiert. In diesem Schritt erfolgten die RT-Reaktion und die Synthese des cDNA-Stranges. Die Reverse Transkriptase wurde im Anschluss bei 70 °C für 5 min hitzeinaktiviert. Die entstandene cDNA wurde dann bei -20 °C gelagert.

2.2.22 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion: (qPCR)

Bei der qPCR oder auch Real-Time PCR handelt es sich um eine Möglichkeit, die Genexpression eines bestimmten Gens zu quantifizieren. (64). Der Aufbau der qPCR basiert hierbei auf dem einer herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion mit erweiterten Schritten, sowie zusätzlichen Substraten im Standardansatz. Die Messdaten einer Reaktion werden bereits während des gesamten PCR-Prozesses erfasst und sind in Echtzeit einsehbar. Da bei jeder Messung eine variable Zahl am Anfang vorhandener mRNA-Stränge vorhanden sein können, müssen Kontroll-mRNAs verwendet werden, die in allen Proben in einer bekannten Menge vorhanden sind (64). Diese müssen zusätzlich in der qPCR erfasst werden und bei der Auswertung in Relation zu den gesuchten mRNA-Sequenzen gesehen werden, um Rückschlüsse auf die Genexpression treffen zu können. Beispiele für solche Kontroll-mRNAs sind β -Actin oder Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase (kurz: GAPDH) (64). Zum Beantworten der Fragestellung wurde mit *GAPDH* gearbeitet.

Prinzipiell kann man zwischen zwei Methoden bei der qPCR unterscheiden. Einerseits der farbstoffbasierten qPCR und andererseits der sondenbasierten qPCR (39). In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit der farbstoffbasierten qPCR, sowie *GAPDH* als Referenzgen gearbeitet.

2.2.23 Farbstoffbasierte qPCR

Ein fluoreszierender Farbstoff, der spezifisch an die doppelsträngige DNA bindet, wird dem Standardansatz beigelegt. Die anfängliche Fluoreszenz ist noch schwach, nimmt jedoch mit steigender Zykluszahl zu (39). Nach jedem Zyklus wird die Fluoreszenz der Probe gemessen und spiegelt die aktuelle DNA-Amplifikation der PCR wider. Wie bei der regulären PCR sollte sich die DNA-Sequenz nach jedem Zyklus verdoppeln. In der qPCR wird diese Verdopplung anhand des fluoreszierenden Farbstoffes mithilfe spezieller Fluoreszenzdetektoren gemessen. Ist eine bestimmte Fluoreszenzintensität erreicht, steigt die Fluoreszenzkurve mit der Verdopplung exponentiell an. Die DNA-Menge kann anhand des Punktes quantifiziert werden, an dem die Kurve in die exponentielle Phase übergeht (39). Der Schwellenwert, bei dem die Fluoreszenzintensität in die exponentielle Phase übergeht (=Threshold), wird häufig vorher festgelegt und kann zwischen Versuchen variieren. Der Threshold wird häufig von dem Programm der qPCR und standardisierten Methoden vorgegeben. Als fluoreszierender Farbstoff wurde SYBR Green (SG) verwendet. Nachteil hierbei ist die Bindungseigenschaft von SG an andere dsDNA, wodurch Bindungen an Primer-Dimere und Amplifikationsprodukte möglich sind (105). Um diesem Nachteil entgegenzuwirken, wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die korrekte Amplifikation zu überprüfen. Die untersuchte Proben wurden im Anschluss an der regulären PCR einer kontinuierlich steigenden Temperatur ausgesetzt, die ab einer bestimmten Temperatur zu einer Denaturierung der Doppelstränge führt (105). Mit der Denaturierung der Doppelstränge löst sich auch das SG von den Doppelsträngen und führt zu einem Fluoreszenzabfall, welcher als Gensequenz-spezifischer Peak vom Fluoreszenzdetektor des qPCR-Thermocyclers, qTOWER³ G, erfasst wird (74). Fanden fehlerhafte Amplifikationen statt, wurden diese bei Schmelzpunktvariabilitäten deutlich. Diese konnte man dann mit den Schmelzpunkten der Kontrollplasmide vergleichen und annähernd feststellen, ob die richtige Größe an PCR-Produkt amplifiziert wurde. Anschließend wurden die PCR-Produkte in der Gelelektrophorese auf ihre Fragmentlänge kontrolliert.

Tabelle 2.18: Schematische Darstellung der qPCR

Programmschritt	Temperatur (°C)	Dauer (s)	Zykluszahl
Initiale Denaturierung	94	180	1x
Annealing	56,8	20	34x
Extension	72	20	
Denaturierung	94	20	
Annealing	56,8	20	1x
Extension	72	180	1x
Schmelzkurve	60 - 95	1200	

Tabelle 2.19: qPCR Standardansatz

Substrate	Menge (µl)
ddH ₂ O (DMEM-behandelt)	3,3
5X (GoTaq Polymerase) Buffer (colorless)	2,0
dNTP 0,1 mM	0,8
MgCl ₂ 25 mM	1,2
Forward-Primer 10 pmol/µl	0,2
Reverse-Primer 10 pmol/µl	0,2
DNA-Polymerase 5 U/µl	0,1
DNA 20 ng/µl	1,0
SYBR Green 10 mM	0,8
Gesamt	10,0

2.2.24 $\Delta\Delta$ CT-Methode zur Auswertung der qPCR

Zur Messung der Genexpression wurde die $\Delta\Delta$ CT-Methode verwendet. Diese ist eine gängige Methode zur Analyse der relativen Quantifizierung der Genexpression in einer qPCR (18). Mithilfe der relativen Quantifizierung ist es möglich, eine Veränderung der Genexpression eines Zielgens in Relation zu der eines Referenzgens darzustellen. Dabei wird der CT-Wert beider Gene gemessen und in Relation gesetzt (54). Als Referenzgen wurde das Housekeeping-Gen *GAPDH* verwendet. Die Expression dieses Housekeeping-Gens dient zur Quantifizierung der eingesetzten Zellen.

2. Material und Methoden

Insgesamt wurden also bei der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode die unterschiedlichen Genexpressionen einer Versuchsgruppe in Relation zu einer Kontrollgruppe gesetzt (18). Dafür müssen die analysierten CT-Werte der qPCR in eine bekannte Formel eingesetzt und berechnet werden.

Die Formel der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode lautet wie folgt:

$$2^{-\Delta\Delta\text{CT}} = 2^{-((\text{CT}_{\text{Luziferase}} - \text{CT}_{\text{GAPDH}})_{\text{Versuchsplasmid (bspw. M1)}} - (\text{CT}_{\text{Luziferase}} - \text{CT}_{\text{GAPDH}})_{\text{Referenzplasmid}})}$$

Mit:

$\text{CT}_{(X)WT}$ = Cycle Threshold des Referenzplasmids (WT)

$\text{CT}_{(X)\text{Versuchsplasmid (bspw. M1)}}$ = Cycle Threshold der Luziferase oder von GAPD des Versuchsplasmids

Die Formel ist so konstruiert, dass für jedes Versuchsplasmid jeweils zwei CT-Werte gemessen wurden. Ein CT-Wert zur Messung der *Luziferase*-Amplifikation beim Versuchsplasmid und ein CT-Wert zur Messung der *GAPDH*-Amplifikation des Versuchsplasmids. Letzterer wird von dem CT-Wert der Luziferase subtrahiert. Weiterhin gibt es in jedem Versuch eine Messung der CT-Werte des Referenzplasmids. Die Subtraktion beider CT-Werte von der *Luziferase*-Amplifikation und der *GAPDH*-Amplifikation ist von der Rechnung identisch mit der Subtraktion der jeweiligen Versuchsplasmide. Um eine relative Quantifizierung der jeweiligen Genexpression bestimmen zu können, wurde die Subtraktion der CT-Werte des Referenzplasmids von der Subtraktion der CT-Werte der jeweiligen Versuchsplasmide abgezogen. Das Ergebnis dieser Subtraktion steht dann im Exponenten der Basis 2. Das Ergebnis hiervon gibt das relative Verhältnis der Genexpression des Versuchsplasmids zum Referenzplasmid an.

Liegt der Wert bei 1, deutet dies darauf hin, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen der Genexpression des Versuchsplasmids und des Referenzplasmids gibt. Ein Wert größer als 1 bedeutet in Bezug auf die $\Delta\Delta\text{CT}$ -Formel, dass das Zielgen im Versuchsplasmid stärker exprimiert wird als im Kontrollplasmid. Eine Überexpression im Versuchsplasmid ist naheliegend. Liegt der Wert unter 1, so ist die Genexpression des Zielgens im Versuchsplasmid geringer, als im Kontrollplasmid. Eine Suppression der Genexpression kann vermutet werden.

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es die Aktivität von Sequenzvariationen in der Promotorkontrollregion des *PRDM13*-Gens zu untersuchen. Dabei wurde analysiert, wie sich die jeweilige Sequenzvariation auf die Amplifikationsqualität des jeweiligen mutierten Plasmids in Relation zu dem pGL4-*PRDM13*-WT verhält. Mittels ortsspezifischer Mutagenese wurden die Sequenzvariationen in die PKR des pGL4-*PRDM13*-WT-Plasmids eingebaut und über einige Zwischenschritte Plasmide hergestellt, die die jeweilige Sequenzvariation beinhalten. Anhand dieser Plasmide konnte in qPCR-Untersuchungen die Amplifikationsfrequenz der jeweiligen Plasmide mit den jeweiligen Sequenzvariationen gemessen werden. Mittels $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode wurde die Aktivität von Sequenzvariationen in der PKR des *PRDM13*-Gens bestimmt.

3.1 Kontrolle der hergestellten Primer

Anfangs mussten die Amplifikationsbedingungen für die Primer etabliert werden, mit denen die jeweiligen Sequenzvariationen des *PRDM13*-Gens in die entsprechende Plasmidsequenz eingebaut wurden. Mittels der Computersoftware *CLC Main Workbench Version 23.05* wurden Primer konzipiert, die die jeweiligen Sequenzvariationen (M1-M5, V1 und V3) in ihrer Oligonukleotidsequenz enthielten. Durch die ortsspezifische Mutagenese wurden die Sequenzvariationen gezielt in die PKR des pGL4-*PRDM13*-WT Plasmids eingebaut. Dies erfolgte im Prozess der Amplifikation des WT-Plasmids mithilfe der DNA-Polymerase (vgl. Tabelle 2.8 und Tabelle 2.9). Um zu überprüfen, ob die modifizierten Primer trotz der jeweiligen Sequenzvariation ein Produkt einer ähnlichen Fragmentgröße wie das des pGL4-*PRDM13*-WT Plasmids amplifizieren können, wurde das Produkt der PCR in einer Gelelektrophorese analysiert. Dabei wurde generell geprüft, ob die Fragmentgröße der amplifizierten Bande mit den modifizierten Primern eine ähnlich große Fragmentgröße, wie die des pGL4-*PRDM13*-WT Plasmids aufweist.

3. Ergebnisse

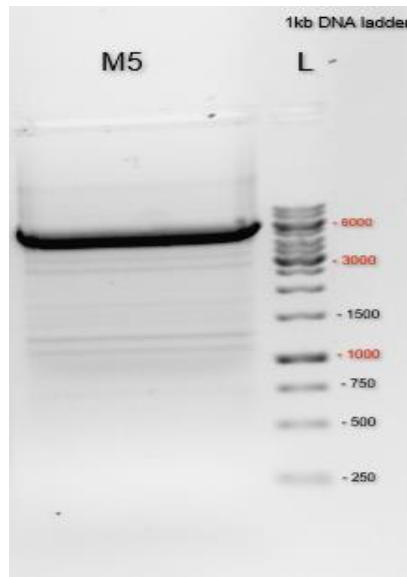


Abbildung 3.1: Kontrolle der Amplifikationsfähigkeit der Primer mit der eingebauten Sequenzvariation für M5 in der Gelelektrophorese

L: Gene Ruler 1 kb DNA Ladder mit Markierungsbanden (250 - 6000 bp beschriftet), M5: Amplifiziertes pGL4-*PRDM13*-PPKR-M5-Plasmid (vgl. Abbildung 2.2), das die Mutation M5 in der PKR beinhaltet. Dabei wurden die Primer für M5 verwendet (vgl. Tabelle 2.8). Zahlreiche Zwischenprodukte sind sichtbar. Die Bande, die für die Versuchsreihe relevant ist, zeigt eine ausgeprägte Amplifikation und ist bei etwa 6000 bp (6079 bp) erkennbar.

Es zeigte sich in der Gelelektrophorese, dass alle hergestellten modifizierten Primer mit den jeweiligen Sequenzvariationen eine vergleichbar große Bande amplifizieren konnten wie die des pGL4-*PRDM13*-WT Plasmids.

3.2 Nachweis von Sequenzvariationen in den hergestellten Plasmiden

Die PCR-Reaktion konnte neben der gewünschten DNA-Sequenz auch zahlreiche Zwischenprodukte amplifizieren. Daher war es notwendig, das gewünschte PCR-Produkt, welches eine ähnliche Fragmentgröße in der Gelelektrophorese aufwies wie das pGL4-*PRDM13*-WT Plasmid, aus dem Elektrophoresegel zu isolieren. Dieses wurde mittels NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit (vgl. Kapitel 2.2.6) extrahiert. Dabei wurde die DNA-Sequenz von sämtlichen Verunreinigungen wie ungewünschten Zwischenprodukten, Primersequenzen, Enzymen oder Nukleotiden separiert.

Da das PCR-Produkt anders als das amplifizierte Plasmid linear statt zirkulär vorlag, mussten beide Enden des PCR-Produkts zunächst ligiert werden, um ein transformationsfähiges Plasmid herzustellen (vgl. Kapitel 2.2.8). Es zeigte sich in den

3. Ergebnisse

Versuchen, dass der Einsatz einer Plasmid-Konzentration von ca. 100 ng/μl bis 300 ng/μl die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Transformation des Plasmids in die *E. coli* Bakterien erhöhte. Dies wurde durch mehrere Transformationsansätze mit unterschiedlichen Konzentrationen deutlich. Um die Konzentration der hergestellten Plasmide mit den jeweiligen Sequenzvariationen zu erhöhen, mussten mehr Plasmide mit den zu untersuchenden Sequenzvariationen mittels NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit aufgereinigt und isoliert werden.

Nach der Selektion von erfolgreich transformierten *E. coli*-Stämmen wurden die gebildeten Kolonien in LB-Medium kultiviert und anschließend das Plasmid dieser Kolonien mittels NucleoSpin® Plasmid QuickPure isoliert (vgl. Kapitel 2.2.13). Um das Vorhandensein der jeweiligen Sequenzvariation in den hergestellten Plasmiden nachzuweisen, wurde mithilfe der Sanger-Sequenzierung überprüft, ob die jeweiligen Sequenzvariationen im pGL4-*PRDM13*-Plasmid erfolgreich mutagenisiert werden konnten. Die Sanger-Sequenzierung erfolgte in einem externen Labor. Als Ergebnis der Sequenzierung zeigte sich, dass die entsprechenden Sequenzvariationen in die Plasmid-Sequenzen eingebaut werden konnten. Die Plasmide, die die Sequenzvariation in der PKR des pGL4-*PRDM13*-Plasmids beinhalteten, wurden isoliert, aufgereinigt und für die Messung der Genexpression der jeweiligen Plasmide verwendet.

3.3 Auswertung der Stichproben für die Transfektion

Die aufgereinigten Plasmide mit der Sequenzvariation sowie die Kontroll-Plasmide (*PRDM13*-PROM und *PRDM13*-Wildtyp) wurden nach Protokoll in HEK-293 Zellen transfiziert, um die Genexpression der hergestellten Plasmide mit dem Kontrollplasmid pGL4-*PRDM13*-WT in humanen Zellen zu vergleichen. Dafür war zunächst eine erfolgreiche Transfektion der Zellen notwendig (vgl. Kapitel 2.2.17). Zur Messung einer erfolgreichen Transfektion wurde eine Kontrolle mittels grün fluoreszierendem Protein (kurz: GFP) etabliert. Fand eine erfolgreiche Transfektion der HEK-293 Zellen statt, wurde das *GFP*-Gen exprimiert, welches unter einem Fluoreszenzmikroskop grün leuchtet. Dadurch konnte bildlich dargestellt werden, wie erfolgreich die Transfektionen der einzelnen Plasmide in den jeweiligen Wells waren und somit konnten Rückschlüsse über die Transfektionsqualität der kompletten Versuchsreihe gezogen werden.

Es stellte sich heraus, dass die Menge des beigefügten PEI-Mixes ausschlaggebend für den Erfolg einer Transfektion war. Durch zahlreiche Durchläufe, konnte mithilfe der GFP-Kontrolle gezeigt werden, dass die ideale PEI-Mix Menge bei 250 μl/ml lag. Folglich

3. Ergebnisse

wurde mit dieser Menge an PEI-Mix gearbeitet, um die größtmögliche Anzahl an transfizierten Zellen zu erreichen.

Zusätzlich wurde in den Versuchen untersucht, wie groß die eingesetzte Zellzahl (HEK-293) sein musste, um die bestmöglichen Transfektionsergebnisse zu erhalten. Es wurde dabei jeweils eine Zellzahl pro Well in Höhe von 300.000 und 500.000 untersucht. Nach mehreren Versuchen stellte sich in der GFP-Kontrolle heraus, dass die Versuche, in denen 500.000 HEK-293-Zellen eingesetzt wurden, zu einer geringeren Transfektionsrate führten als die Versuche mit 300.000 HEK-293 Zellen. Gleichzeitig zeigte sich, dass eine Zellzahl unter 300.000 auch zu weniger erfolgreich transfizierten Zellen führte. Deswegen wurde in den Versuchsreihen mit einer HEK-293-Zellzahl von 300.000 gearbeitet.

Die Optimierung der Transfektion war eine Bedingung für die RNA-Isolation aus der Versuchsreihe. Wurden keine erfolgreich transfizierten HEK-293 Zellen mittels der GFP-Kontrolle erkannt, so wurde die Versuchsreihe verworfen. Die RNA-Isolation erfolgte nur in Versuchsreihen, in denen die GFP-Kontrolle deutlich für eine erfolgreiche Transfektion gesprochen hat.

3. Ergebnisse

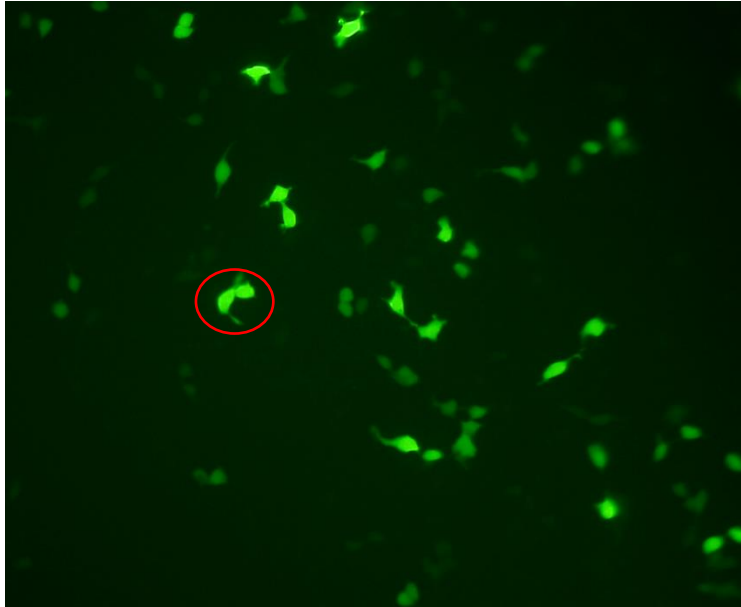


Abbildung 3.2: GFP-Kontrolle der transfizierten HEK-293-Zellen

GFP-Kontrolle in der Fluoreszenzmikroskopie. Es sind mehrere HEK-293-Zellen sichtbar, die grün leuchten. Das Leuchten der Zellen bedeutet, dass die Transfektion erfolgreich stattgefunden hat. Der rote Kreis markiert zwei erfolgreich transfizierte HEK-293 Zellen, die das Kontrollplasmid enthalten. In den restlichen grün leuchtenden Zellen konnte das Kontrollplasmid auch erfolgreich transfiziert werden. Zellen, die bei der Untersuchung nicht grün leuchten, konnten nicht erfolgreich mit dem Kontrollplasmid transfiziert werden.

3.4 Auswertung der RNA-Isolierung und Analyse

Die RNA der jeweiligen Plasmide (pGL4-*PRDM13* als Wildtyp und die jeweiligen Mutationsplasmide) wurde im Prozess der Transfektion isoliert. Wichtig war hier die Isolierung der RNA mit DEPC-behandeltem Wasser durchzuführen, um möglichst Kontaminationen durch RNAsen zu verhindern.

Nach der Isolierung der RNA wurde ihre Konzentration photometrisch bestimmt und im Gefrierschrank gelagert. Dennoch stellte sich heraus, dass die Konzentration der eingefrorenen isolierten RNA mit der Zeit geringer wurde, weshalb es notwendig war, die RT-Reaktion zur Herstellung einer dsDNA möglichst zeitnah nach der RNA Isolierung durchzuführen. Die RNA-Analyse erfolgte mithilfe einer Kapillarelektrophorese und es wurde insbesondere auf die 18S- und 28S-rRNA-Bande bei der Analyse geachtet. Diese geben Hinweise auf das Vorhandensein von RNA in den isolierten Transfektionsdurchläufen. Die Proben wurden alle zeitgleich auf das Vorhandensein dieser Banden untersucht und es stellte sich heraus, dass in allen isolierten Proben diese

3. Ergebnisse

beiden Banden nachgewiesen werden konnten. Es wurden lediglich die RNA-Proben verwendet, welche die 18S und 28S-rRNA Banden nachweisen konnten.

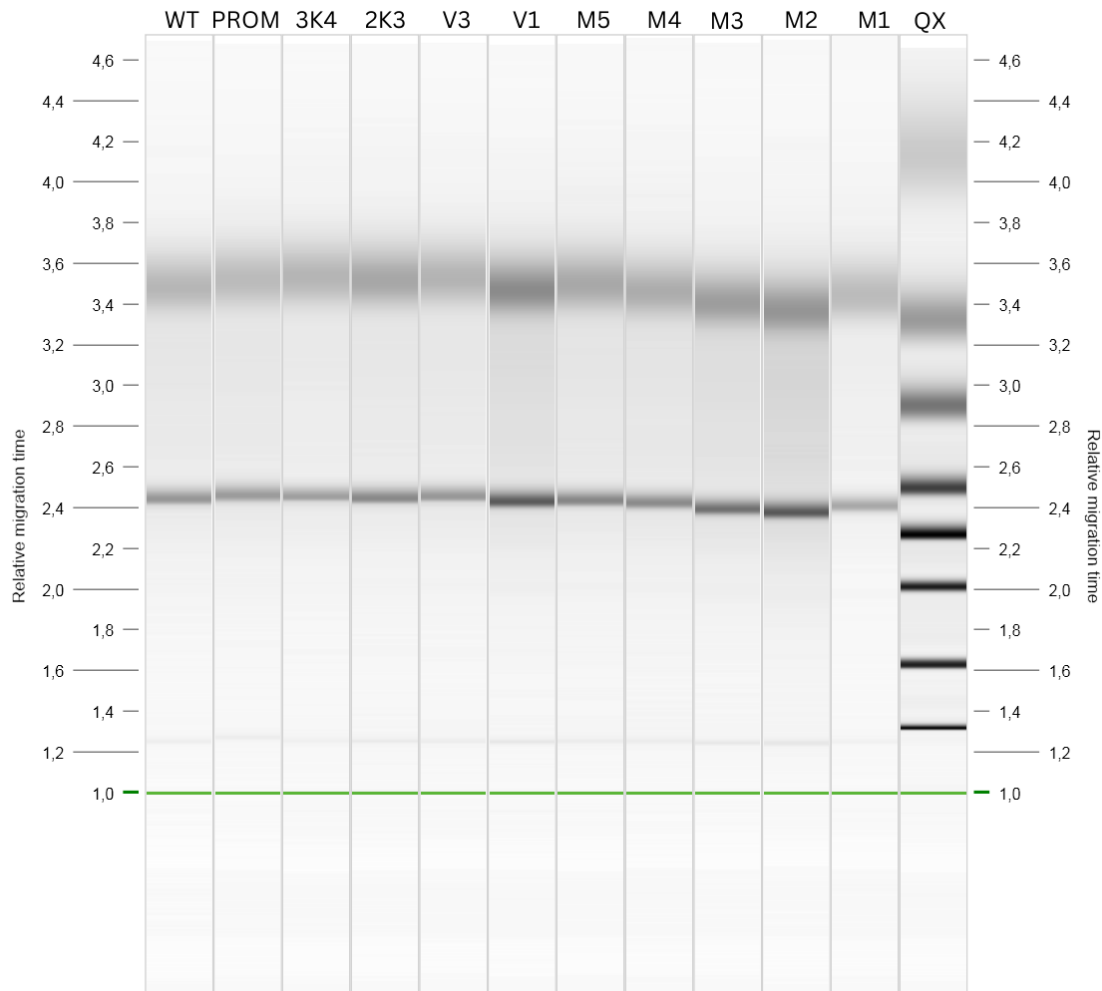


Abbildung 3.3: Beispiel einer RNA-Analyse mittels Kapillarelektrophorese

Auf der x-Achse sind die Positionen der Kapillaren mit den jeweiligen untersuchten isolierten RNA-Sequenzen. Der Slot QX steht für den QX RNA Sizemarker. Links folgend sind dann die untersuchten Plasmide aufgetragen, mit den jeweiligen Sequenzvariationen: M1, M2, M3, M4, M5, V1, V3, M2K3, M3K4, PROM und das WT-Plasmid. Auf der y-Achse ist die relative Migrationszeit von 1,0 min bis ca. 4,6 min dargestellt.

Die Messung mithilfe des Kapillarelektrophoresegeräts half bei der Kontrolle, ob nach der Transfektion der jeweiligen Plasmide in die HEK-293 Zellen erfolgreich RNA isoliert werden konnte.

3.5 Auswertung der RT-Reaktion zur Herstellung von dsDNA

Die RT-Reaktion erfolgte im Anschluss an die RNA-Isolation, um möglichst viel Probenmaterial zu asservieren. Nach Durchführung der RT-Reaktion (vgl. Kapitel 2.2.21) musste noch untersucht werden, ob die RT-Reaktion erfolgreich zur Herstellung von dsDNA der ursprünglichen RNA führte. Hierzu wurden reguläre PCR-Versuchsreihen durchgeführt, in denen mithilfe der Primer (vgl. Tabelle 2.8 und Tabelle 2.9) dargestellt werden sollte, ob die RT-Reaktion generell erfolgreich funktioniert hat. Die Versuche, in denen RNA isoliert wurde, lieferten stets eine erfolgreiche RT-Reaktion und eine Amplifikation eines Genproduktes in der PCR. Die Untersuchung der erfolgreichen RT-Reaktion erfolgte mittels Elektrophorese (vgl. Kapitel 2.2.5). Insgesamt konnte gezeigt werden, dass alle Transfektionsversuche zu einer RNA-Expression und erfolgreichen RT-Reaktion geführt hatten.

3.6 Auswertung der qPCR zur Messung der Plasmidexpressivität

Um die Genexpression des *PRDM13*-Gens mit den jeweiligen Mutationssequenzen analysieren zu können, mussten die hergestellten Plasmide mit den jeweiligen Mutationen in Relation zu dem WT-Plasmid gesetzt werden. Im Anschluss wurde mithilfe der qPCR der CT-Wert bestimmt. Bei dem CT-Wert handelt es sich um einen Wert, der die Zykluschwelle einer PCR-Reaktion beschreibt. Es wird die Anzahl der Zyklen gemessen, bei der ausreichend DNA amplifiziert wird, um vom qPCR-Gerät erkannt zu werden. Zur Messung der Amplifikationsfrequenz des Gens wurden die jeweiligen CT-Werte mit einem Kontroll-CT-Wert in Relation gesetzt. Hierfür wurde in den Versuchsreihen das Housekeeping-Gen *GAPDH* verwendet.

Tabelle 3.1: CT-Werte der Versuche 01-05 zum Nachweis der *GAPDH*-Expression

Plasmid	CT-Werte – <i>GAPDH</i> -Expression				
	Versuch 01	Versuch 02	Versuch 03	Versuch 04	Versuch 05
WT	18,27	19,13	19,10	19,13	18,40
PROM	19,09	19,05	19,29	19,19	18,71
M1	19,37	20,75	20,27	22,61	19,23
M2	19,39	19,20	19,03	19,20	18,48
M3=V2	18,74	18,94	19,24	19,15	18,63
M4	19,35	18,74	19,15	19,32	18,56
M5	18,85	19,18	19,02	18,92	18,54
V1	18,94	19,04	19,03	18,82	18,54
V3	19,23	19,41	19,02	21,23	18,55
2K3	19,00	19,08	18,38	19,42	18,38
3K4	18,70	18,39	19,44	19,72	18,80

Es zeigen sich in den Versuchen 01-05 jeweils unterschiedliche CT-Werte für die *GAPDH*-Aktivität. Sie sind aber in allen Fällen ungefähr bei 19 Zyklen. Auch die CT-Werte der einzelnen Sequenzvariationen (M1-V3) unterscheiden sich teilweise stark. Neben der *GAPDH*-Expression wurde auch die *Luziferase*-Expression der jeweiligen Plasmide mithilfe der qPCR untersucht.

3. Ergebnisse

Tabelle 3.2: CT-Werte der Versuche 01-05 zum Nachweis der Luziferase-Expression

Plasmid	CT-Werte Luziferase-Expression				
	Versuch 01	Versuch 02	Versuch 03	Versuch 04	Versuch 05
WT	19,86	20,39	20,59	21,01	19,98
PROM	18,05	18,73	18,81	18,07	18,04
M1	18,17	19,46	20,79	21,63	18,88
M2	19,46	19,91	20,03	20,17	19,30
M3=V2	17,73	18,84	20,96	20,04	19,12
M4	19,48	18,75	19,41	21,03	19,27
M5	18,73	18,95	20,41	20,71	19,29
V1	18,40	19,22	20,75	19,25	19,58
V3	18,73	19,82	20,22	18,16	19,09
2K3	22,05	20,24	20,77	20,82	20,04
3K4	19,35	20,58	19,91	19,73	17,59

Die CT-Werte im Hinblick auf die *Luziferase-Expression* unterscheiden sich in den Versuchsreihen. Man kann jedoch einen Trend der jeweiligen CT-Werte im Hinblick auf die *Luziferase-Expression* erkennen.

Zusätzlich zu den gemessenen CT-Werten der jeweiligen DNA-Sequenzen und der entsprechenden Primerpaare wurde am qPCR-Zyklus eine Schmelzkurve erstellt. Die Schmelzkurve dient zur Analyse der Spezifität der untersuchten Probe und der amplifizierten Produkte. Die Auswertung der Schmelzkurvendagnostik diente der Information, in welchem Ausmaß ungewollte Zwischenprodukte während der qPCR-Reaktion amplifiziert wurden.

3. Ergebnisse

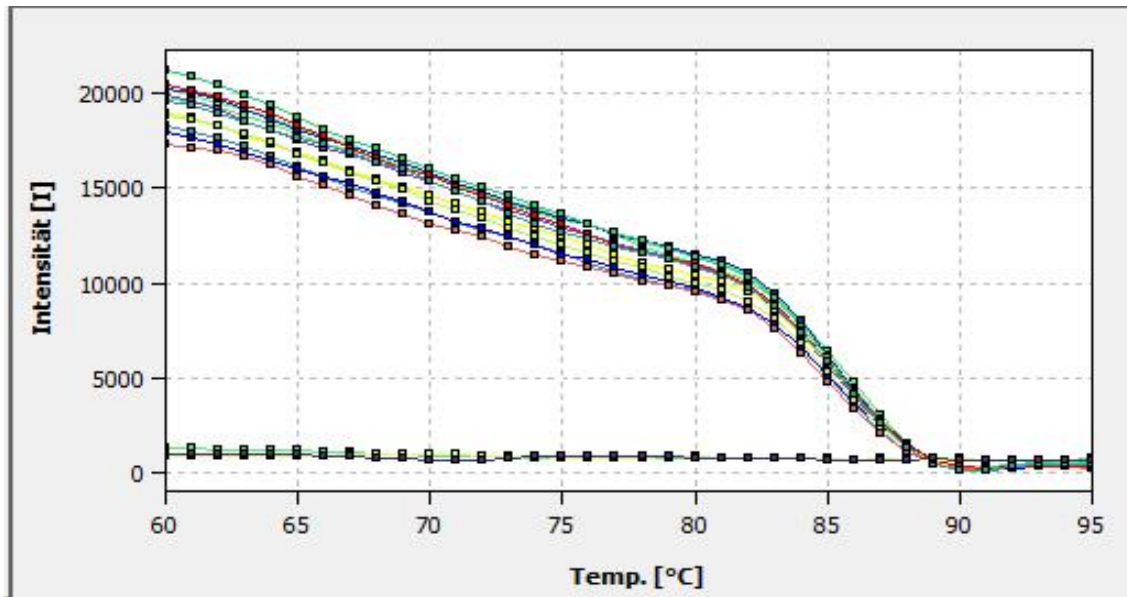


Abbildung 3.4: Beispielhafte Schmelzkurve der qPCR-Reaktion

Auf der x-Achse ist die Temperatur von 60-95 °C angegeben. Die y-Achse gibt die von dem qPCR-Gerät gemessene Intensität [I] an. Die unterschiedlichen Farben geben die jeweiligen im qPCR-Gerät gemessenen Versuchsansätze an. Die drei Geraden bei der Intensität von ca. 1000 [I] geben die gemessenen Leerwerte wieder. Die anderen Kurven geben die gemessenen Proben wieder. Die Intensität beginnt bei 60 °C und liegt zwischen 17.500 [I] und 22.500 [I]. Diese sinken kontinuierlich bis sie bei der Temperatur von ca. 82 °C rapide sinken. Die gemessenen Proben treffen bei einer Temperatur von 89 °C auf die Geraden der Leerwerte. Die Schmelzkurve gibt den Verlauf der Schmelzung der Produkte der qPCR bei steigenden Temperaturen an.

Die gemessenen CT-Werte (vgl. Tabelle 3.1 und Tabelle 3.2) der jeweiligen Plasmide wurden dann in Relation gesetzt und in die $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Formel eingesetzt, um die Veränderung der Luziferase-Expression zum Kontrollplasmid (WT) zu messen. Die Ergebnisse wurden auf einem Balkendiagramm aufgetragen.

3. Ergebnisse

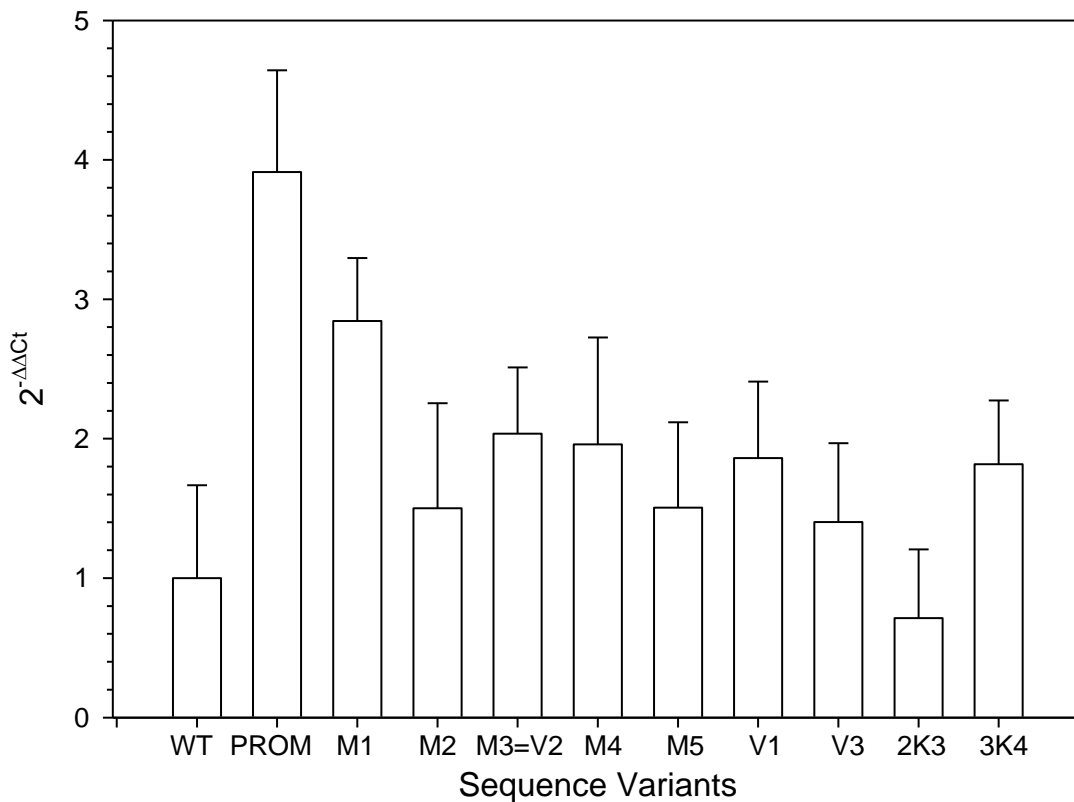


Abbildung 3.5: Veränderung der Luziferase-Aktivität bei Sequenzvariationen in der PKR des *PRDM13*-Gens

x-Achse: Die jeweiligen Plasmide mit den entsprechenden Mutationen (M1-M5, V1-V3), den kombinierten Mutationen (2K3, 3K4) sowie das WT-Plasmid und das pGL4-*PRDM13*-PROM-Reporter-Plasmid.

y-Achse: Die Ergebnisse der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Formel.

Das WT-Plasmid dient als Kontrollplasmid und hat im $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Verfahren den Wert 1. Das pGL4-*PRDM13*-PROM-Reporter-Plasmid, welches in den Versuchen die isolierte Aktivität des Promotors darstellt, besitzt den höchsten $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Wert bei annähernd 3,9. Die Sequenzvariationen, welche neben V1 bis V3 in den Patienten der Gießener Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde gefunden wurden, haben einen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Wert, der zwischen näherungsweise 1,5 und 2,9 liegt. Besonders das Plasmid mit der Sequenzvariation in M1 hat den höchsten $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Wert von knapp 2,9. Das Plasmid mit der Sequenzvariation M2 zeigt bei den Messungen der Luziferase-Expression den niedrigsten $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Wert von annähernd 1,5 unter den Plasmiden mit Sequenzvariationen in M1-M5. Knapp über diesem Wert bei der Messung der

3. Ergebnisse

Luziferase-Expression liegt das Plasmid mit der Sequenzvariation M5. Die Plasmide M3 und M4 weisen einen ungefähr ähnlichen $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Wert bei ungefähr 2,0 auf.

Die Plasmide mit den Sequenzvariationen von V1 und V3 zeigen einen höheren $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Wert als der WT mit einer Luziferase-Expression von annähernd 1,5 bis 1,8. Lediglich V2 liegt mit ungefähr 2,0 über den gemessenen $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werten der anderen Plasmide.

Unter den Plasmiden mit multiplen Sequenzvariationen in der PKR zeigt sich bei dem Plasmid 3K4 mit den Sequenzvariationen von M3 und M5 ein $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Wert, welcher annähernd dem $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Wert von V1 entspricht und bei ungefähr 1,8 liegt. Den niedrigsten $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Wert, noch niedriger als der WT, zeigt sich bei dem Plasmid 2K3 mit dem Vorliegen der Sequenzvariationen M2 und M4. Hier wurde ein $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Wert von unter 1 gemessen.

Betrachtet man die $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Formel, so wird deutlich, dass Werte, welche oberhalb von 1 liegen, eine stärkere Luziferase-Expression aufweisen und somit zu einer stärkeren Expression des *PRDM13*-Gens führen. Liegt der Wert über 1, so ist von einer stärkeren Expression des *PRDM13*-Gens auszugehen. Liegt der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Wert unter 1, so kann eine reduzierte Expression des *PRDM13*-Gens angenommen werden.

Folglich konnte in den Versuchen eine stärkere Expression des Transkriptionsfaktors von den Plasmiden PROM, M1, M2, M3, M4, M5, V1, V3 und 3K4 im Vergleich zum WT gemessen werden. Lediglich bei dem Plasmid 2K3 wurde in den Versuchen eine reduzierte Expression des *PRDM13*-Gens gemessen.

4 Diskussion

4.1 Einleitung: die Relevanz

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Sequenzvariationen in der Promotor-Kontroll-Region (PKR) des *PRDM13*-Gens auf die Expression des Gens zu untersuchen. Dabei wurden die jeweiligen Sequenzvariationen mit der Expression des Wildtyps (WT) und des pGL4-*PRDM13*-PROM-Reporter-Plasmids (PROM) in einem modifizierten Reporter-Gen-Assay in Relation gesetzt. Dies ermöglichte es, die Fragestellung der Dissertation nach dem Einfluss von Sequenzvariationen auf die *PRDM13*-Expression zu beantworten.

Die wesentlichen Ergebnisse zeigen, dass die untersuchten singulären Sequenzvariationen M1-M5, sowie V1-V3 zu einer vermehrten Genexpression des *PRDM13*-Gens im Vergleich zum Wildtyp führen. Zwischen den Sequenzvariationen gibt es starke Unterschiede in Bezug auf die Expression des *PRDM13*-Gens. Auch die Plasmide mit mehreren Sequenzvariationen veränderten die Genexpression des *PRDM13*-Gens im Vergleich zum Wildtyp, wobei diese sowohl verstärkt, als auch vermindert wurde.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind relevant für die Untersuchung und das Verständnis der Pathologie der North-Carolina-Makuladystrophie. Sie verdeutlichen den Einfluss der PKR des *PRDM13*-Gens auf dessen Genexpression und können Hinweise zum Pathomechanismus der Erkrankung liefern.

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse interpretiert und im Kontext bereits bestehender Forschungsarbeiten diskutiert. Zudem wird erörtert, welche praktischen Implikationen sich aus diesen Ergebnissen ableiten lassen, insbesondere im Hinblick auf die aktuelle Forschung. Zusätzlich werden die Stärken sowie die Schwächen der durchgeführten Experimente und Untersuchungen reflektiert.

4.2 Bewertung des Versuchsansatzes

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der gefundenen Sequenzvariationen in der PKR des *PRDM13*-Gens in Bezug auf ihren Einfluss auf dessen Genexpression. Zentral war der Einfluss dieser Sequenzvariationen auf die Funktion des Promotors im *PRDM13*-Gen. Die Messung der Genexpression sollte in diesen Versuchsreihen sowohl quantitativ erfolgen, als auch in Relation zu dem Wildtyp, ohne Sequenzvariationen.

Zur Untersuchung dieser Fragestellung mussten molekularbiologische Methoden verwendet werden, welche zur Messung von Genexpressionen etabliert sind. Es stehen einige Methoden zur Auswahl, wovon sich jedoch letzten Endes für die Methode der RT-qPCR entschieden wurde. Dieser Prozess, der vom Einbau der Sequenzvariationen, gefolgt von Transformation und Transfektion bis hin zur Herstellung und Messung der cDNA reicht, ist eine anerkannte Methode zur quantitativen Messung der Genexpression. Die qPCR gilt dabei als Goldstandard der Genexpressionsanalyse (20).

4.3 Bewertung der verwendeten Methodik

In dieser Arbeit wurde mit molekularbiologischen Methoden gearbeitet, welche zur Untersuchung von Genen und deren Expression verwendet werden. Im folgenden Abschnitt werden die Stärken und die Limitationen der einzelnen Methoden reflektiert:

4.3.1.1 Gerichtete Mutagenese

Die gerichtete Mutagenese wurde in dieser Arbeit verwendet, um die gewünschte Sequenzvariation in die PKR des *PRDM13*-Gens einzubauen. Sie ist eine etablierte Methode, welche für gezielte Veränderungen von Gensequenzen verwendet wurde (19). Die Methode der gerichteten Mutagenese hat im Zusammenhang mit molekularbiologischer Forschung sowohl Stärken als auch Schwächen, die vor der Verwendung evaluiert werden sollten.

Ein wesentlicher Vorteil der gerichteten Mutagenese ist die Erstellung von spezifischen Modifikationen. Mithilfe der gerichteten Mutagenese können spezifische DNA-Sequenzen, welche für spezifische Aminosäuresequenzen kodieren, in Genabschnitte eingebaut werden. Diese Methode wird in der molekularbiologischen Forschung sowie zur Messung von Genexpressionen verwendet. (83, 19)

4. Diskussion

Zusätzlich ermöglicht die gerichtete Mutagenese mithilfe der spezifischen Modifikation die Erstellung von Mutationen. Sie wird in der Untersuchung von mutationsspezifischen Krankheiten verwendet. Modifikationen von spezifischen Basenpaaren sind damit möglich. Da die bekannten Sequenzvariationen dieser Arbeit insbesondere an einer Stelle des Gens auftreten, ist diese Methode durchaus hilfreich zum Erstellen von Mutationen. Es können aber auch mehrere Mutationen in den gewünschten Sequenzabschnitt eingebaut werden und somit der Einfluss multipler Sequenzvariationen gemessen werden.

Die gerichtete Mutagenese kann aber auch einige Nachteile mit sich bringen. Die Durchführung der Experimente und die Erstellung von Mutationen kann teilweise zeitintensiv sein. Minimale Abweichungen der Versuchseinstellungen können zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Deutlich wird dies bei den variablen Funktionsfähigkeiten der Primer bei unterschiedlichen Reaktionstemperaturen. Die Versuchszeit der Reaktionsschritte von Annealing, Extension oder Denaturierung kann maßgeblich die Effektivität von Primern und deren Amplifikation beeinflussen. Zusätzlich kann nicht sicher gewährleistet werden, dass letzten Endes die gewünschte Mutation eingebaut wird, was auch als Nachteil angesehen werden kann.

Die Nachteile dieser Methode lassen sich durch die Verwendung der Gradienten-PCR verringern. Diese hilft nicht nur das Temperaturoptimum der Primer zu finden, sondern kann langfristig auch Zeit von zukünftigen Versuchen einsparen.

Mithilfe der Sanger-Sequenzierung konnte in dieser Arbeit kontrolliert werden, dass die Sequenzvariationen erfolgreich eingebaut wurden.

Insgesamt stellt die gerichtete Mutagenese eine moderne und effiziente Methode dar, Sequenzvariationen in eine Gensequenz einzubauen. Dabei hat die Methode auch Nachteile, die nicht zu vernachlässigen sind. Mithilfe von weiteren Methoden wie der Gradienten-PCR oder der Sanger-Sequenzierung können die Nachteile der gerichteten Mutagenese eingeschränkt werden. Die Methode der gerichteten Mutagenese erwies sich in dieser Arbeit als hinreichende Methode.

4.3.1.2 Transformation in *E. coli* Stämme

Die mithilfe gerichteter Mutagenese hergestellten Plasmide mit den jeweiligen Sequenzvariationen wurden anschließend vermehrt amplifiziert, isoliert, ligiert und in Bakterienkulturen (*E. coli*) transformiert. Die Transformation in Bakterienkulturen wie *E. coli*-Stämme ist als gängige Praxis bekannt, um gewünschte Plasmide herzustellen und zu isolieren (104, 118).

Die Transformationseffizienz in *E. coli* Bakterien kann stark variieren und verläuft oft nicht erfolgreich. Dies kann unterschiedliche Gründe haben.

Einer dieser Gründe ist die Konzentration, der transformierten Plasmide. Es zeigte sich in den Experimenten, dass die Transformationseffizienz bei höheren Plasmidkonzentrationen anstieg. Ab einer gewissen Konzentration trat jedoch eine Übersättigung auf, welche zu einer unzureichenden Transformation führte. Die optimale Plasmidkonzentration in den Versuchen dieser Arbeit lag zwischen 100 und 220 ng/ μ l für das jeweilige Plasmid. Hierbei konnten einige Bakterienkolonien von den Agarplatten isoliert werden. Bei einer Plasmidkonzentration unter 110 ng/ μ l, konnten zeitweise auch Bakterienkolonien isoliert werden. Die Anzahl der Kolonien war jedoch deutlich geringer und die Transformation verlief hauptsächlich erfolglos. Ein weiterer Grund für die variable Transformationseffizienz der *E. coli* Bakterien war die Qualität der kompetenten *E. coli* Bakterien. Die initial verwendeten *E. coli* Stämme zeigten nur bedingt erfolgreiche Transformationen, weshalb frische *E. coli* Stämmen angezüchtet und isoliert wurden. Die frisch isolierten kompetent gemachten *E. coli* Stämme zeigten eine bessere Transformationseffizienz.

Eine weitere Schwäche der Transformation mittels *E. coli* Bakterien ist die limitierte Fähigkeit von *E. coli* Bakterien Plasmide in einer bestimmten Größe erfolgreich zu transformieren (117). In dieser Arbeit zeigte sich, dass die Transformationseffizienz der *E. coli* Bakterien mit großen Plasmiden abnimmt. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass Plasmide mit der Größe von 15 kb eine stark reduzierte Transformationseffizienz im Vergleich zu Plasmiden mit geringerer Größe haben. Plasmide mit geringerer Basenpaargröße als 15 kb konnten erfolgreicher transformiert werden.

Die Referenzplasmide dieser Arbeit sind mit 6 kb deutlich kleiner als Plasmide mit einer Größe von 15 kb, weshalb mit einer besseren Transformationseffizienz zu rechnen war.

Ein wesentlicher Vorteil der Elektroporation mithilfe von *E. coli* Bakterien ist die kostengünstige und pflegeleichte Handhabung der *E. coli* Bakterien (118). Aufgrund ihrer hohen Teilungsrate ist es möglich eine hohe Menge an Plasmidmaterial zu gewinnen.

4. Diskussion

Die Qualität der Plasmidherstellung wird dabei nicht negativ beeinflusst (118). Die Methode ist nicht nur kostengünstig, sondern auch zeitsparend. Die Transformation erfolgt in wenigen Stunden und Erfolge lassen sich bereits nach einigen Stunden überprüfen. Zusätzlich gibt es für die Durchführung der Transformation bereits etablierte Protokolle, welche bei anderen Wissenschaftlern mit ähnlichen Fragestellungen zu erfolgreichen Ergebnissen führten.

E. coli Zellen eignen sich hervorragend, um Plasmide zu amplifizieren und schnell zu produzieren (33). Sie sind kostengünstig und haben sich in vielen vorherigen Arbeiten bewährt. Auch in dieser Arbeit konnte mittels der Transformation über *E. coli* Bakterien erfolgreich gearbeitet werden. Die Schwächen dieser Methode, insbesondere hinsichtlich der erforderlichen Plasmidkonzentration und der limitierten Transformationseffizienz bei zu großer Plasmidgröße wurden in dieser Arbeit weitestgehend minimiert und konnten vermieden werden.

4.3.1.3 Die Transfektion in HEK-293 Zellen

Die Transfektion der korrekt hergestellten Plasmide in HEK-293 Zellen war notwendig, um den eigentlichen Einfluss der Sequenzvariationen auf die Genexpression zu messen. Die Verwendung von HEK-293 Zellen ist eine bekannte Vorgehensweise und eignet sich gut, um die Genexpression in einem Eukaryont zu messen (58, 41).

Es ist wichtig, dass die Zellen unter den gleichen Bedingungen mit den jeweiligen Plasmiden transfiziert werden, um Messfehler zu vermeiden und die jeweiligen Plasmide untereinander vergleichen zu können. Zusätzlich wurde mit einem GFP-Kontrollversuch die Qualität der Transfektion überprüft (50). Dies war dahingehend wichtig, um zu überprüfen, ob der PEI-Mix und das Transfektionsprotokoll für eine erfolgreiche Transfektion des Plasmids in die HEK-293 Zellen verwendet werden konnte. Dabei wurde zusätzlich der Erfolg der Transfektion bewertet, indem die Menge der transfizierten Zellen beurteilt wurde.

Die Methode der Transfektion stellt eine effektive Methode dar, um die Genexpression in Eukaryonten zu untersuchen (12). In der Arbeit nimmt sie eine zentrale Rolle ein, um die Expression der in prokaryontischen Wirten hergestellten Plasmide in eukaryontischen Zellen zu quantifizieren. Darüber hinaus dient sie als Grundlage, um Rückschlüsse von der Genexpression des *PRDM13*-Gens in HEK-293 Zellen und Menschen ziehen zu können.

4. Diskussion

Wesentlicher Nachteil der Transfektion ist eine starke Variabilität der Transfektionsrate zwischen Versuchsreihen (75). Dies tritt einerseits zwischen Versuchsreihen auf, kann aber ebenso in einer Versuchsreihe zwischen den jeweiligen Mutationen auftreten. Grund hierfür können Pipettierfehler oder eine variable Zellkonfluenz der HEK-293 Zellen sein (52). Insbesondere die Pipettierfehler können teilweise zu gravierenden Unterschieden in den Ergebnissen führen, weshalb es wichtig ist, mit einer hohen Präzision zu arbeiten (52, 28). Die entstandenen Fehler sind später schwierig zu vergleichen, da es hierfür keinen exakten Kontrollversuch gibt, wie es bei anderen Versuchen der Fall war.

Außerdem konnte wissenschaftlich nachgewiesen werden, dass Transfektionen von DNA-Sequenzen zu genomischen Veränderungen sowie zu epigenetischen Alterationen in der transfizierten Zelle führen können (3, 97). Das bedeutet, dass im Rahmen der Transfektion neben den absichtlich integrierten Sequenzvariationen noch weitere Mutationen in der genomischen Struktur des Plasmids oder generelle Genalterationen entstehen können (3, 97). Dadurch kann die Messung der Genexpression nach der Transfektion zu variablen Ergebnissen führen, was auch auf die Entstehung neuer Mutationen zurückzuführen sein kann.

Die Transfektion ist eine etablierte Methode in der Molekularbiologie, die bei der Messung der Genexpression unerlässlich ist. Allerdings können in diesem Prozess einige Fehler auftreten. In den Versuchen war die Transfektion wesentlicher Schritt zur Herstellung der RNA, welche im Anschluss im Hinblick auf die Genexpression gemessen wurde. Mittels GFP-Kontrolle konnte überprüft werden, wie gut die Transfektion abgelaufen ist, jedoch ließen sich Pipettier- oder Transfektionsfehler nur schwer darstellen und überprüfen. Diese Messfehler können die Ergebnisqualität und die statistische Power der Experimente negativ beeinflussen.

Aufgrund von den teilweise variablen Ergebnissen ist es deswegen wichtig, die Zahl an Versuchsreihen zu erhöhen, um den Effekt von Ausreißern zu reduzieren und repräsentative Ergebnisse zu kalkulieren (6). Gleichzeitig kann dadurch die statistische Power erhöht und der Einfluss von zufälligen Fehlern auf die Gesamtergebnisse reduziert werden (9). Je kleiner die Anzahl der untersuchten Versuchsreihen, desto ungenauer können die Ergebnisse sein. In dieser Arbeit wurde versucht eine hohe Anzahl an Versuchsreihen zu verwenden. Zusätzlich wurden die Ergebnisse im Gesamten mithilfe der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode normiert, um Ausreißer in ihrem Effekt auf die Gesamtauswirkung zu reduzieren.

4.3.1.4 Beurteilung der Wirtszellen für die Transfektion

Wie bereits in den vorherigen Kapiteln (vgl. Kapitel 2.2.17) erwähnt, wurde die Transfektion der isolierten Plasmide in HEK-293 Zellen durchgeführt um im Anschluss die RNA zu isolieren, in cDNA zu transkribieren und die Genexpression des Reporter-Gens zu bestimmen. Der untersuchte Transkriptionsfaktor *PRDM13* spielt eine entscheidende Rolle bei der Reifung und Ausbildung von amakrinen Zellen in der Retina (84, 5). Aber auch in zerebralen Vorläuferzellen spielt die Expression des Transkriptionsfaktors *PRDM13* eine entscheidende Rolle bei der physiologischen Entwicklung der Zellen (17). Es wird deutlich, dass *PRDM13* insbesondere zerebrale Zellen und Amakrinzellen assoziiert wird.

Die für die Transfektion verwendeten HEK-293 Zellen stammen aus menschlichen Tumorzellen der Niere (96). Es ist bekannt, dass der menschliche Organismus aus zahlreichen unterschiedlichen Zelltypen aufgebaut ist (63). Die jeweiligen Gruppen an Zellen unterscheiden sich teilweise stark von ihren individuellen Eigenschaften und Funktion (63, 121). Selbst HEK-293 Zellen unterscheiden sich teilweise drastisch von menschlichen Nierenzellen (1). Es wird deswegen auch vermutet, dass Messungen von Genexpressionen mithilfe von HEK-293 Zellen zu unterschiedlichen Ergebnissen führen können, als in anderen menschlichen Nierenzellen (1, 96).

Aufgrund der zellulären Unterschiede zu zerebralen Zellen ist die Frage durchaus legitim, ob sich HEK-293 Zellen als Wirtszelle der Transfektion für die Fragestellung dieser Arbeit eignen oder retinale Zellen bevorzugt werden sollten. Als Methode zur Messung der Genexpression ist die Transfektion in HEK-293 Zellen ein integraler Bestandteil wissenschaftlicher Arbeiten (vgl. Kapitel 2.2.17) und konnte signifikante Ergebnisse liefern. HEK-293 Zellen haben sich somit als Methode der Genuntersuchung etabliert.

Zusätzlich zeichnen sich die HEK-293 Zellen durch eine einfache Handhabung in der Zellkultur und eine hohe Effizienz im Hinblick auf die Transfektion von Plasmiden aus (119). Somit eignen sie sich gut zur Messung der Genexpression von transfizierten Plasmiden (99).

Im Labor gezüchtete retinale Zellen werden heutzutage auch für die Messung von Genexpression, Zytotoxizität und andere molekularbiologischen Fragen verwendet (79). Sie bieten die Möglichkeit zelluläre Mechanismen in retinalen Zellen zu untersuchen (2, 79). Mithilfe von in vitro hergestellten retinalen Zellen kann die Fragestellung dieser Arbeit ebenfalls beantwortet werden.

4. Diskussion

Grundsätzlich sollte in diesen Versuchen jedoch der Einfluss der Sequenzvariationen in der PKR des *PRDM13*-Gens auf dessen Genexpression dargestellt werden. Die durchgeführten Untersuchungen und gefundenen Ergebnisse weisen durchaus auf einen Einfluss der Sequenzvariationen auf die Transkription des *PRDM13*-Gens hin. Die initiale Fragestellung konnte mithilfe der HEK-293-Zellen folglich beantwortet werden. Die HEK-293 Zellen, welche in der Molekularbiologie und Genetik seit Jahren für die Messung der Genexpression verwendet werden (102), halte ich für ausreichend, um grundlegende Schlussfolgerungen über die Auswirkung von Sequenzvariationen auf die Genexpression eines Reporter-Gens zu schließen.

Für die Zukunft kann die Untersuchung der Sequenzvariationen in der PKR des Transkriptionsfaktors in retinalen Zellen durchaus interessant sein und womöglich sogar exaktere Ergebnisse liefern als es die HEK-293 Zellen taten.

4.3.1.5 Quantitative PCR

Die wesentliche Auswertung der Versuchsreihe erfolgte mittels der qPCR, welche schlussendlich Rückschlüsse über die relative Transkription ermöglicht.

Die durchgeführten Experimente basieren auf den Ergebnissen von vorher durchgeführten Arbeiten (69). In diesen wurde jedoch nicht mittels qPCR die Genexpression ermittelt, sondern mithilfe eines Luciferase-Assays.

Zusätzlich konnte in der vorherigen Arbeit wenig über den Einfluss individueller Sequenzvariationen auf die Genexpression des *PRDM13*-Gens geschlossen werden, da hauptsächlich Plasmide mit zwei Sequenzvariationen (M3K4 und M2K3) untersucht wurden (69).

Mögliche Fehlerquellen eines Luciferase-Assays können durch eine unterschiedliche Zellzahl oder eine variierende Transfektionsrate entstehen. Letztere kann stark durch Pipettierfehler beeinflusst werden (6). Pipettierfehler können signifikante Auswirkungen auf die Ergebnisse haben, weshalb es wichtig war, diese Fehlerquelle weitestgehend zu minimieren (9, 6). Durch den Einsatz der qPCR konnte die Fehlerquelle weitestgehend ausgeschlossen werden, indem stets die Konzentration der isolierten RNA elektrophoretisch gemessen und gegebenenfalls verdünnt wurde. Dadurch konnte letzten Endes eine identische Konzentration unter den Plasmiden geschaffen werden, wodurch die isolierte RNA besser miteinander verglichen werden konnte.

4. Diskussion

Die qPCR zeichnet sich dabei durch eine hohen Sensitivität bei der Messung von Genmaterial aus (37). Das bedeutet, dass bereits eine geringe Konzentration an Genmaterial ausreicht, um dieses auszuwerten. Zusätzlich bietet die qPCR anders als die herkömmliche PCR oder ein Luciferase-Assay die Möglichkeit einer relativen Quantifizierung der Experimente (70). Dies vereinfacht die Vergleichbarkeit zwischen den jeweiligen Plasmiden und ermöglicht relative Rückschlüsse. Die qPCR lief dabei stets unter denselben Bedingungen für jedes Plasmid ab, um dies zu gewährleisten.

Problematisch können Kontaminationen der Proben sein, die die Ergebnisse der qPCR teilweise verfälschen können (37). Zusätzlich können marginale Konzentrationsunterschiede in der zu amplifizierenden DNA zu signifikanten Unterschieden der Transkriptionsgeschwindigkeit führen. Dies kann dann zu abweichenden CT-Werten führen, welche die Ergebnisse und die Vergleichbarkeit der Plasmide verzerren können.

Da es zwischen der Transfektion und der quantitativen Messung der Genexpression zahlreiche Schritte gibt, bei denen die Konzentration der RNA oder DNA entscheidend ist, könnten sich durch Konzentrationsunterschiede Fehler einbauen. Um diese Fehler weitestgehend zu vermeiden, wurde die Konzentration mithilfe eines Photometers bestimmt, um die Konzentrationen der jeweiligen Proben identisch zu halten. Auch dies diente dazu, eine Vergleichbarkeit zwischen den jeweiligen Proben zu gewährleisten.

Zusätzlich wurde mit der Schmelzkurvenanalyse gearbeitet. Hierbei wurde untersucht, ob es sich bei dem amplifizierten Produkt auch um das Gen handelt, welches amplifiziert werden sollte. Schmelzkurvenanalysen werden häufig als Kontrollschritt verwendet, um zu überprüfen, ob es Kontaminationen in der untersuchten Probe gab (37, 47). Wurden in unserer Arbeit falsche DNA-Sequenzen amplifiziert, konnte dies in der Schmelzkurvenanalyse dargestellt werden. Dieser Schritt diente insbesondere zur Kontrolle der Transfektions- und RT-Reaktionsprodukte. Weiterhin wurden alle Produkte auf einem Agarosegel aufgetragen, um zu überprüfen, ob die Basenpaarlänge des amplifizierten Zielgens mit dem Kontrollwert übereinstimmt. Die Agarosegel-Untersuchung bietet eine zusätzliche Kontrolle des amplifizierten Produktes

In der Arbeit wurde die qPCR zur Bestimmung der Genexpression eingesetzt. Da es sich um eine sehr sensitive Methode handelt, können selbst bei geringfügigen Verunreinigungen oder Unterschieden in der Konzentration die Ergebnisse stark variieren. Dadurch kann die Aussagekraft der Versuche beeinträchtigt werden.

4. Diskussion

Zusätzlich kann die Konformation der Plasmid-DNA nicht überprüft werden, weshalb eine Ungenauigkeit in der Messung der qPCR resultieren kann. Aufgrund der Kontrollschritte sowie der Konzentrationsanpassung der jeweiligen Proben mithilfe des Photometers kann jedoch angenommen werden, dass die Risiken der qPCR weitestgehend reduziert wurden. Die Ergebnisse sind weitestgehend vergleichbar. Mithilfe der qPCR konnte in unseren Versuchen erfolgreich die Messung der Quantifizierung der Genexpression erfolgen, weshalb die molekularbiologische Methode suffizient zur Beantwortung der Fragestellung verwendet werden konnte.

Insgesamt kann man feststellen, dass die verwendeten molekularbiologischen Methoden sowohl Stärken als auch Limitationen im Hinblick auf die Untersuchung der Forschungsfrage haben. Aufgrund der generellen Ziele der Forschungsfrage, der durchgeführten Kontrollschritte und der allgemeinen Etablierung der molekularbiologischen Methoden in vorherigen Studien kann vermutet werden, dass diese hinreichend für die Auswertung dieser Arbeit sind. Die Methoden sind evidenzbasiert und wurden nach strikten Protokollen befolgt, um mögliche Fehlerquellen zu vermeiden, sowie um letztlich den Einfluss der Sequenzvariationen in der PKR des *PRDM13*-Gens auf dessen Genexpression zu messen. Dennoch sind in den Experimenten mögliche Fehlerquellen, wie Pipettierfehler oder Konzentrationsalterationen, nicht vollständig auszuschließen.

4.4 Interpretation der Ergebnisse

4.4.1 Bewertung der Qualität der Plasmide

Bereits vor der Auswahl der Plasmide, wurden die Sequenzvariationen bestimmt, welche in der PKR des Transkriptionsfaktors *PRDM13* vorkommen und mit der NCMD assoziiert sind (66, 8, 69, 26).

Zur Herstellung der Plasmide mit den jeweiligen Sequenzvariationen wurden diese mittels ortsspezifischer Mutagenese in die PKR des pGL4-*PRDM13*-PROM-PKR-Plasmids eingebaut. Zur Kontrolle der amplifizierten Gensequenzen mit den jeweiligen Sequenzvariationen und zur Bestimmung der Qualität wurden diese mittels Sanger-Sequenzierung überprüft und auf das Vorhandensein der Sequenzvariation in der PKR des *PRDM13*-Gens untersucht. Mithilfe der zahlreichen Zwischenschritte mit Kontrollversuchen wurde versucht, die Reinheit der Plasmide hinreichend für die Bestimmung des Einflusses der Sequenzvariationen auf die Genexpression des Transkriptionsfaktors *PRDM13* zu gestalten.

Einerseits können die variablen $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte sowie die teilweise stark variablen Ergebnisse gegen eine absolute Reinheit der Plasmide sprechen. Die Qualität der Transfektion und des Pipettierens kann aber auch infrage gestellt werden. Fehler im Pipettieren oder in der Transfektion können in den Messungen der Genexpression mittels qPCR zu variablen Ergebnissen führen und somit die Aussagekraft dieser verringern (101). Proben können teilweise mit RNasen kontaminiert sein, welche die RNA als solche beschädigen kann aber auch die Transkriptionseffizienz der PCR beeinflussen kann. Dabei sind die RNasen insbesondere bei der Isolierung der empfindlichen RNA entscheidend und können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Unrein isolierte Plasmide können bei photometrischen Messungen der Plasmidkonzentration zu fehlerhaften Ergebnissen hinsichtlich der Plasmidkonzentration führen (108, 101). Dies kann darauf hinweisen, dass die Qualität der Plasmidpräparationen nicht hinreichend für die Versuche dieser Arbeit ist. Zusätzlich konnte mithilfe des $OD_{260/280}$ -Quotienten die Reinheit der Probe bestimmt werden (101). Proben, die einen $OD_{260/280}$ -Quotienten von 1,8-2,1 haben wurden als reine Proben angesehen. In den Versuchen wurde bei der photometrischen Messung darauf geachtet, dass die RNA-Proben im Rahmen dieser Werte waren.

4. Diskussion

Andererseits wurde mit der Sanger-Sequenzierung gearbeitet, welche eine Kontrolle der amplifizierten Plasmide ermöglicht. Dabei wurde die ungefähre Basenabfolge des Plasmids ermittelt und überprüft, ob die Sequenzvariation erfolgreich eingebaut wurde. Zusätzlich ließ sich mit Hilfe der Sanger-Sequenzierung nachweisen, ob es zu weiteren Amplifikationsfehlern gekommen ist (4). Dies könnte eine falsche Sequenzvariation sein, zusätzlich eingebaute Mutationen in der ursprünglichen Sequenz oder zahlreiche andere Amplifikationsfehler. Sie ermöglicht also die Genstruktur des hergestellten Plasmids zu untersuchen.

In dieser Arbeit wurde durch die Sanger-Sequenzierung sichergestellt, dass die Plasmide so konstruiert wurden, dass sie genau die Sequenzvariation beinhalteten, welche zur Untersuchung der Genexpression des *PRDM13* Gens erforderlich war. Die Expression des *PRDM13*-Gens wurde dabei in der qPCR anhand der Messung der Luziferase-Aktivität hergeleitet. Es zeigte sich, dass die Sanger-Sequenzierung die gewünschte Genabfolge in den hergestellten Plasmiden bestätigen konnte und die Sequenzvariationen erfolgreich eingebaut wurden.

Die korrekten Plasmide konnten mittels Sanger-Sequenzierung bestätigt werden. Zur Bestätigung der Qualität der isolierten mRNA und cDNA wurden Methoden verwendet, die die Reinheit der jeweiligen Probe überprüfen sollten. Dabei wurde auf den $OD_{260/280}$ -Quotienten geachtet, aber auch auf die Ergebnisse der Kapillarelektrophorese der RNA,

Aufgrund der durchgeführten Kontrollschritte, wie der Sangersequenzierung oder der RNA Untersuchung, kann trotz der möglichen Fehlerquellen davon ausgegangen werden, dass die Plasmidqualität für die Messung der Genexpression hinreichend war.

4.4.2 Interpretation der qPCR der jeweiligen Sequenzvariationen

Um den Einfluss der jeweiligen Sequenzvariationen auf die Genexpression des Reportergens Luciferase im *PRDM13*-Gen zu analysieren, wurde die molekularbiologische Methode der qPCR genutzt (vgl. Kapitel 2.2.22).

Zur Messung der *PRDM13*-Promotoraktivität wurde die Gensequenz der Luziferase zur Hilfe genommen. Diese kommt im humanen Genom nicht vor, und wurde hier künstlich in den *PRDM13*-Promotor Genabschnitt eingebaut, um damit im Umkehrschluss die Genexpression des *PRDM13*-Promotors für die Messung zu simulieren (Reporter-Gen-Assay). Dabei wird die Kopienzahl des Reportergens in der qPCR gemessen und dann

4. Diskussion

mittels $2^{-\Delta\Delta CT}$ normiert. Man misst den Einfluss der Sequenzvariationen auf die Amplifikation des *PRDM13*-Gens mittels Messung der Luziferase-Kopienzahlen. Das bedeutet, dass man sich die Amplifikationsrate der Luziferase bei der Herleitung der *PRDM13*-Genexpression zunutze macht.

Die qPCR-Ergebnisse zeigten dabei einen variablen Einfluss der Sequenzvariationen auf die Expression des Transkriptionsfaktors *PRDM13* bei der Amplifikation. Die Sequenzvariationen in der PKR des Transkriptionsfaktors *PRDM13* zeigen in allen Ergebnissen einen abweichenden Einfluss auf die Genexpression des Reporters im Vergleich zum Wildtyp (pGL4-*PRDM13*-WT). Deswegen kann man ableiten, dass die Sequenzvariationen einen Einfluss auf die Aktivität des *PRDM13*-Promotors haben. In allen singulären Sequenzvariationen (M1-M5, V1-V3) zeigte sich stets ein höherer $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Wert im Vergleich zum Wildtyp (vgl. Abbildung 3.5: Veränderung der Luziferase-Aktivität bei Sequenzvariationen in der PKR des *PRDM13*-Gens).

Ein höherer $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Wert als der Wildtyp deutet auf eine vermehrte Expression des *PRDM13*-Gens *in-vivo* hin. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Sequenzvariationen, die in der Biobank der Augenklinik der Justus-Liebig-Universität in Gießen gefunden wurden (M1-M5, V1-V3) die Expression des Transkriptionsfaktors steigern. Liegt eine dieser Sequenzvariationen in der PKR des Gens vor kam es zu einer vermehrten Expression des Transkriptionsfaktors *PRDM13*. Die Ergebnisse der Plasmide mit den single-nucleotide Sequenzvariationen zeigen bei einem Signifikanzniveau von ($p < 0,05$) 5 % kein signifikantes Ergebnis. Obwohl alle untersuchten single-nucleotid Sequenzvariationen (M1-M5, V1-V3) eine vermehrte Expression des *PRDM13*-Gens nicht signifikant beweisen können, weisen sie auf eine Tendenz hinsichtlich der Genexpression des *PRDM13*-Gens hin. Man kann trotz der fehlenden Signifikanz vermuten, dass die jeweiligen Sequenzvariationen zu einer vermehrten Expression des *PRDM13*-Gens führen. Gleichzeitig sollte man sich bei den schwankenden Ergebnissen fragen, ob eine mögliche physiologische Varianz der Genexpression einen Effekt auf die Signifikanz der Ergebnisse haben kann. Man kann durchaus vermuten, dass jedes Gen und jede Zelle eine unterschiedliche physiologische Genexpression hinsichtlich der *PRDM13*-Genexpression hat. Zwar kann man bei den Sequenzvariationen einen Trend sehen, welchen Einfluss die Sequenzvariationen auf die Aktivität des *PRDM13*-Promoto hat, doch sind die Werte nicht signifikant kalkulierbar. Eine physiologische Varianz der *PRDM13*-Genexpression von Zelle zu Zelle sollte also nicht übersehen werden.

4. Diskussion

Das Plasmid pGL4-*PRDM13*-PROM-Reporter-Plasmid (PROM), welches ausschließlich die Sequenz des Basic-Promotors beinhaltet (vgl. Abbildung 2.1), wurde in dieser Arbeit separat untersucht. Dabei zeigte sich eine signifikante Veränderung der Expression des Reportergens Luciferase in Anwesenheit des Basic-Promotors im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollregion. Unabhängig von den Sequenzvariationen in der PKR des *PRDM13*-Gens zeigen die Ergebnisse, dass die Sequenz an der DNase I-Hypersensitivity site im pGL4-*PRDM13*-PROM-Reporter-Plasmid die Genexpression des Transkriptionsfaktors signifikant verringert. Hierfür wurde ein Signifikanzniveau von ($p < 0,05$) 5 % festgelegt. Man möchte damit ausschließen, dass die gefundenen Effekte zufällig entstanden sind und setzt ein Signifikanzniveau voraus. In dem Fall eines 5 prozentigen Signifikanzniveaus würde das bedeuten, dass die Beobachtung des Effekts mit einer Wahrscheinlichkeit von > 5 % durch einen Zufall erklärt werden kann und somit statistisch signifikant ist. Die Ergebnisse untermauern die Annahme, dass der Basic-Promotor im pGL4-*PRDM13*-PROM-Reporter-Plasmid durch die PKR beeinflusst wird und diese eine Silencer-Funktion innehat. Es konnte quantitativ dargestellt werden, dass das pGL4-*PRDM13*-PROM-Reporter-Plasmid ohne PKR eine deutlich stärkere Amplifikationsrate hatte, als die Plasmide mit eingebauter Promotor-Kontroll-Region.

Bei den Plasmiden mit multiplen Mutationen (2K3 und 3K4) zeigen sich unterschiedliche Befunde. Es kommt zu teilweise stark unterschiedlichen Einflüssen der multiplen Mutationen auf die Genexpression des Transkriptionsfaktors in den Versuchen. Während das Plasmid 3K4 (M3/V2 und M5) wie die Plasmide mit single-nucleotide Sequenzvariationen zu einer vermehrten Aktivität des *PRDM13*-Promotors führt, zeigt sich in unseren Versuchen bei dem Plasmid 2K3 (M2 und M4) eine verminderte Aktivität des *PRDM13*-Promotors im Vergleich zum Wildtyp. Das 2K3 Plasmid ist das einzige Plasmid dieser Arbeit, welches in dieser Arbeit einen zusätzlichen reprimierenden Einfluss auf den *PRDM13*-Promotor aufweist. Auch hier sind die Ergebnisse unter einem Signifikanzniveau von ($p < 0,05$) 5% nicht signifikant. Definitive Aussagen hinsichtlich der Genexpression des *PRDM13*-Gens können nicht getroffen werden. Da die multiplen Sequenzvariationen 2K3 und 3K4 bereits in anderen Arbeiten untersucht wurden (69), und hier gezeigt werden konnte, dass die beiden Plasmide zu einer signifikant vermehrten Expression des *PRDM13*-Gens führen, kann angenommen werden, dass das Plasmid 3K4 durchaus zu einer vermehrten Genexpression des *PRDM13*-Gens führt. Das Plasmid 2K3 zeigt in beiden Arbeiten unterschiedliche Werte, weshalb dieses weiterhin untersucht werden sollte. Die physiologische Genexpressions-Varianz spielt auch hier eine entscheidende Rolle.

4. Diskussion

Die Mehrheit der Sequenzvariationen, welche in dieser Arbeit untersucht wurden, deuten wie das pGL4-*PRDM13*-PROM-Reporter-Plasmid auf eine vermehrte Expression des *PRDM13*-Gens hin. Wenngleich das Ausmaß der jeweiligen Sequenzvariation unterschiedlich stark auf die vermehrte Expression wirkt.

4.4.3 Beurteilung der Signifikanz der Ergebnisse

Die Aussagekraft sowie die teilweise fehlende Signifikanz der Ergebnisse werfen Fragen hinsichtlich ihrer Interpretation und praktischen Implikation auf, weshalb in diesem Abschnitt die Fehlerquellen genauer diskutiert werden sollen.

Die RNA-Stabilität und ihre Qualität spielt bei der Messung der Genexpression eine entscheidende Rolle (53). Somit kann bei nicht-effizienter Transfektion eine qualitativ minderwertige RNA isoliert werden, welche schlussendlich Messungsvariabilitäten im Vergleich zu anderen Versuchsreihen aufweisen kann (107, 53). Es ist entscheidend, wie effizient die Transfektion der Plasmide in die Wirtszellen erfolgt ist, um ähnliche Ergebnisse zu erhalten (32). Treten hier Fehler auf, ist es möglich, dass es zu einer Variabilität der Messungen kommt und folglich ist die Evaluierung der Signifikanz erschwert (32). Folglich ist es wichtig, eine homogene RNA-Qualität zwischen den Versuchsreihen zu schaffen. Zusätzlich ist entscheidend die RNA-Qualität der jeweiligen Versuchsreihen zu messen (53, 107).

Um die Qualität der RNA experimentell untersuchen zu können wurde in dieser Arbeit die Kapillarelektrophorese verwendet. In der Kapillarelektrophorese konnten die beiden essentiellen Hauptbanden der RNA nachgewiesen werden, weshalb davon auszugehen ist, dass die RNA für die Versuche geeignet war. Die Stichprobengröße kann durchaus auch einen legitimen Aspekt darstellen, der die Signifikanz der Arbeit infrage stellt. Grundsätzlich wurde in dieser Arbeit eine Stichprobengröße von $n=5$ verwendet. Eine kleine Stichprobengröße kann zu falsch positiven Werten führen und eine Signifikanz andeuten, während in Wahrheit keine Signifikanz vorherrscht (71). Es ist wichtig eine adäquate Stichprobengröße zu verwenden.

In molekularbiologischen Messungen zur Genexpression sind Versuche mit einer Stichprobengröße von $n=3$ ausreichend für signifikante Ergebnisse. Kommt es zu einer hohen Varianz der Ergebnisse so kann man die Stichprobengröße auf $n=5$ erhöhen, um aussagekräftige Ergebnisse zu bekommen. Folglich befolgt diese Arbeit die Normen der Genexpressions-Messung und ist somit mit einer Stichprobengröße von $n=5$

4. Diskussion

ausreichend. Wie bereits erwähnt wurde, sollte man bei der Frage der Signifikanz die physiologische Genexpressions-Varianz nicht vergessen.

In der Arbeit von M. Platschek 2020 wurde mithilfe eines Luciferase-Assays gezeigt, dass die Plasmide 2K3 und 3K4 beide zu einer Überexpression des *PRDM13*-Gens führen im Vergleich zum Wildtyp (69). In dieser Arbeit wurde mit den gleichen Plasmiden (2K3 und 3K4) gearbeitet, wie von M. Platschek. Die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich des Plasmids 2K3 können nicht widerlegen, dass es eventuell zu Pipettierfehlern vom Untersucher während der Versuche gekommen ist. Neben den Pipettierfehlern kann auch unsorgfältiges Arbeiten theoretisch zu einer Kontamination der Proben und somit falschen Ergebnissen geführt haben. Durch wiederholte Durchführungen der Versuche und anschließende Kontrollmessungen konnte jedoch sichergestellt werden, dass solche Fehlerquellen in dieser Arbeit nicht aufgetreten sind.

Lediglich die qPCR Ergebnisse des pGL4-*PRDM13*-PROM-Reporter-Plasmids sind bei der Messung der Genexpression signifikant. Man kann unter dem Signifikanzniveau von 5 % annehmen, dass die Basic-Promotor-Sequenz im pGL4-*PRDM13*-PROM-Reporter-Plasmid im Vergleich zum Wildtyp-Plasmid zu einer vermehrten Aktivität des *PRDM13*-Promotors führt.

Dennoch wurden Vermutungen bezüglich des Einflusses der Sequenzvariationen auf die Genexpression des *PRDM13*-Gens durch die Ergebnisse bestärkt. Bereits andere Arbeiten sahen die Überexpression des *PRDM13*-Gens als ursächlich für die Entwicklung der NCMD (59). Auch wir konnten solche Tendenzen in unseren Untersuchungen feststellen.

Diese sind zwar nicht signifikant, doch bei einem bereits bestehenden Pool an signifikanten Ergebnissen weist unser Ergebnis durchaus auf eine Tendenz der jeweiligen Sequenzvariationen hinsichtlich der Genexpression des Transkriptionsfaktors hin.

Prinzipiell legen die nicht signifikanten Ergebnisse nahe, dass weitere Untersuchungen in diesem Bereich erforderlich sind, um den zugrundeliegenden Mechanismus besser zu verstehen und Einflussfaktoren klarer zu identifizieren. Die teilweise fehlende Signifikanz deutet nicht auf unbrauchbare Ergebnisse hin, sondern auf Ergebnisse, die weitere Untersuchung benötigen. Mit den oben genannten Mitteln der RNA-Qualität, den Pipettierfehlern oder der Stichprobengröße kann versucht werden, die Signifikanz der Ergebnisse für zukünftige Versuche zu verbessern.

4.4.4 Beurteilung der Promotor-Kontroll-Region des *PRDM13*-Gens

Sequenzvariationen im *PRDM13*-Gen werden für die Entstehung der NCMD als ursächlich angenommen (80, 84, 88, 26). In der Vergangenheit wurde bereits die Promotor-Kontroll-Region des *PRDM13*-Gens als Lokalisation einiger dieser Sequenzvariationen identifiziert (69). Deshalb ist es umso wichtiger, die Funktion und die Rolle der PKR im Hinblick auf die Expression des *PRDM13*-Gens zu untersuchen.

Anders als die anderen Plasmide beinhaltet das pGL4-*PRDM13*-PROM-Reporter Plasmid keine PKR, wodurch separat untersucht werden kann, wie sich der Promotor ohne die PKR des *PRDM13*-Gens bei der Transkription des pGL4-*PRDM13*-Plasmids verhält. Die Analyse der PKR und des Promotors ist essentiell, um die Funktion der einzelnen Genabschnitte im Verlauf der Transkription zu verstehen. Das pGL4-*PRDM13*-PROM-Reporter-Plasmid mit lediglich dem Basic-Promotor zeigt eine signifikante Verstärkung der Expression des *PRDM13*-Gens im Vergleich zum Wildtyp. Die Expression des Reportergens im pGL4-*PRDM13*-PROM-Reporter-Plasmid wurde dann mit der Aktivität der anderen Plasmide verglichen und die Funktion der PKR sowie der Einfluss der jeweiligen Sequenzvariationen auf die *PRDM13*-Promotoraktivität abgeleitet.

Auch die Ergebnisse der Sequenzvariationen in der PKR des *PRDM13*-Gens weisen auf eine verstärkte Expression des Gens durch die Sequenzvariationen im Vergleich zum Wildtyp hin. Im Vergleich zum PKR-freien pGL4-*PRDM13*-PROM-Reporter Plasmid zeigt die Expression der jeweiligen PKR-Sequenzvariationen eine deutlich geringere Erhöhung. Die Kopienzahl der Luziferase- mRNA war folglich häufiger amplifiziert worden, als im Wildtyp-Plasmid.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann vermutet werden, dass die PKR des *PRDM13*-Gens ein Silencer ist, welcher die Expression des *PRDM13*-Gens reprimieren sollte. Durch die Sequenzvariationen kommt es zu einer verminderten Repression der Amplifikation des *PRDM13*-Gens und somit zu einer Überexpression.

Während der gesunde Patient (\cong Wildtyp) eine reguläre Expression von *PRDM13* hat, wurde bei Patienten mit NCMD eine vermehrte Expression des *PRDM13*-Gens nachgewiesen (84, 88, 80). Die Untersuchungen stützen diese Annahme.

4.5 Aktueller Forschungsstand zu NCMD

4.5.1 Bewertung des Einflusses von *PRDM13* auf die Entwicklung der NCMD

Die Expression des *PRDM13*-Gens spielt bei der Entwicklung retinaler Erkrankungen eine entscheidende Rolle (59, 87). Der Transkriptionsfaktor *PRDM13* wurde bereits in einigen wissenschaftlichen Arbeiten als Ursache für die NCMD diskutiert (8, 84, 85). Insbesondere Duplikationen des Transkriptionsfaktors *PRDM13* sind dabei mit der NCMD assoziiert (59). Da es sich bei der NCMD um eine nicht progressive Erkrankung der Makula handelt, nimmt man an, dass sie durch eine Überexpression des *PRDM13*-Gens entsteht, welche im Laufe der Differenzierung der retinalen Zellen insuffizient reguliert wird (59). Folglich kommt es zu einem fehlerhaften Silencereinfluss der PKR auf die Expression des *PRDM13*-Gens und somit einer fehlenden Funktion der Runterregulierung der *PRDM13*-Expression.

Versuche an Drosophila-Fliegen konnten nachweisen, dass eine pathologisch erhöhte Expression des *PRDM13*-Gens zu einer ausgeprägten Entwicklungsabnormalität der Netzhaut führt (59).

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass das *PRDM13*-Genprodukt einen entscheidenden Einfluss in der Replikation von DNA und generell auf den Zellzyklus hat (120). Zusätzlich konnten dem Transkriptionsfaktor regulatorische Eigenschaften im Zellzyklus und der Malignomentwicklung in U87 Zellen zugesprochen werden (120). Neben den Abnormalitäten der Netzhaut sind auch Tumorentitäten mit der Überexpression des *PRDM13*-Gens bekannt (10). Es wird deutlich, dass der Transkriptionsfaktor eine entscheidende Rolle in zahlreichen menschlichen Zellen spielt und eine Fehlregulation dieses Gens zu Krankheiten führen kann. Insbesondere die Fehlexpression des Transkriptionsfaktors wird als Ursache vieler Erkrankungen wie Hirnstammdysfunktionen, Hypogonadismus oder der NCMD gesehen (17, 84, 87).

Bereits einige Forschungsgruppen gehen davon aus, dass die PKR des *PRDM13*-Gens genregulatorisch als Silencer fungiert (69, 11, 29). Auch in dieser Arbeit konnte mittels qPCR quantitativ gezeigt werden, dass die jeweiligen Sequenzvariationen in der PKR des *PRDM13*-Gens zu einer vermehrten Expression des Gens führten. Die Ergebnisse waren zwar nicht signifikant, doch zeigten sie durchaus eine Tendenz der jeweiligen Sequenzvariationen in der PKR im Hinblick auf die Genexpression des Transkriptionsfaktors.

4. Diskussion

Folglich konnte eine vermehrte Kopienzahl des Luziferase-Reportergens bei den jeweiligen Plasmiden mit den Sequenzvariationen (M1-M5, V1-V3) gemessen werden. Somit kann aus den Ergebnissen dieser Arbeit abgeleitet werden, dass die Silencer-Funktion der PKR des *PRDM13*-Gens durch die Sequenzvariationen teilweise stark beeinflusst wird.

Setzt man diese Ergebnisse in Zusammenhang mit den anderen Studien, erkennt man, dass die Ergebnisse dieser Arbeit den aktuellen Forschungsstand bezüglich der Überexpression des *PRDM13*-Gens als Ursache für die NCMD bestätigen.

Es konnte in dieser Arbeit dargestellt werden, dass die untersuchten Sequenzvariationen die Funktionalität der PKR beeinflussen. Da die PKR im *PRDM13*-Gen grundsätzlich als Silencer fungiert, wird durch die Sequenzvariationen genau diese Funktion unterdrückt. Die Unterdrückung der Silencer-Funktion der PKR führt konsekutiv zu einer Überexpression des *PRDM13*-Gens. Die Ergebnisse bestärken diese Annahme. Zwar liegt eine Varianz der gemessenen Ergebnisse vor, doch verdeutlichen diese dennoch eine vermehrte Aktivität des *PRDM13*-Promotors bei Sequenzvariationen in der PKR im Vergleich zum Wildtyp. Im Folgeschluss kann man annehmen, dass eine Überexpression des Transkriptionsfaktors *PRDM13* Ursache der NCMD sein kann.

4.5.2 Weitere Sequenzvariationen im und um das *PRDM13*-Gen

Aktuelle Forschungsarbeiten von zahlreichen Studien deuten darauf hin, dass noch weitere Sequenzvariationen im oder auch vor dem *PRDM13*-Gen phänotypisch mit der NCMD in Verbindung gebracht werden können (80, 87, 88). Beispielsweise wurden neue Sequenzvariationen in Familien aus Korea (80), der Türkei (88) oder aus Ägypten (87) identifiziert, die als ursächlich für die NCMD angesehen werden. Die Position der Sequenzvariation ist dabei nicht mit den Lokalisationen der in dieser Arbeit untersuchten Mutationen identisch. Es wurden bereits mehrere Genabschnitte im und um das *PRDM13*-Gen identifiziert, die als ursächlich für die NCMD angesehen werden (106).

Diese Arbeit konnte weitere Sequenzvariationen identifizieren, die bei Patienten mit NCMD gefunden wurden. NCMD betrifft vermutlich nicht nur Nachkommen der Familie in North Carolina, sondern tritt global in Familienpopulationen auf (7, 92). Interessant ist hierbei zu untersuchen, ob die erkrankten Familien in einer Relation zueinander stehen und gemeinsame Vorfahren haben oder es sich hierbei um einen Zufall handelt.

Weiterhin sind zwar einige Lokalisationen der für die NCMD als ursächlich vermuteten Sequenzvariationen bekannt, doch ihre Auswirkung auf den Phänotyp der Erkrankten

4. Diskussion

bleibt unklar (103). Es muss klinisch untersucht werden, wie sich der Phänotyp der einzelnen Sequenzvariationen im Hinblick auf die NCMD unterscheidet, insbesondere auch in Bezug auf die Lokalisation der Sequenzvariation. Es ist durchaus möglich, dass in Zukunft noch weitere Sequenzvariationen in Familien gefunden werden, die sich in den bekannten Genabschnitten befinden. Interessant kann auch sein, ob Sequenzvariationen außerhalb dieser bekannten Genabschnitte zur NCMD führen.

Nach dem aktuellen Forschungsstand gibt es nicht eine einzelne Sequenzvariation, die die NCMD verursacht, sondern vielmehr eine Gruppe an Sequenzvariationen, die auftreten können und zu dem Phänotyp einer NCMD führen können (92, 26). Der Einfluss der jeweiligen Sequenzvariationen auf die Genexpression insbesondere im Hinblick auf ihre Lokalisation und ihren Einfluss auf den Phänotyp der NCMD kann in Zukunft möglicherweise eine genauere Differenzierung der jeweiligen Sequenzvariationen ermöglichen. Für signifikante Aussagen ist noch weitere Forschung in diesem Bereich nötig.

4.6 Zukünftige Forschungsansätze – Ein Ausblick

4.6.1 Forschungsansätze im Hinblick auf die untersuchten Sequenzvariationen

Der Einfluss der Sequenzvariationen in der PKR des *PRDM13*-Gens wurde in dieser Arbeit im Hinblick auf den Einfluss auf die Genexpression untersucht. Dabei wurden für die jeweiligen Sequenzvariationen variable Aktivitäten des *PRDM13*-Promotors anhand von unterschiedlichen CT-Werten gemessen (vgl. Abbildung 3.5: Veränderung der Luziferase-Aktivität bei Sequenzvariationen in der PKR des *PRDM13*-Gens). Diese CT-Werte wurden dann mittels $2^{-\Delta\Delta CT}$ normiert. Im Hinblick auf die variablen $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte sollte weiter untersucht werden, ob es eine Korrelation zwischen der Überexpression des *PRDM13*-Gens und der phänotypischen Ausprägung der NCMD gibt. Da sowohl die OCT-, als auch die Fundus-Untersuchungen der betroffenen Patienten der Augenklinik der Justus-Liebig-Universität in Gießen vorhanden sind, kann man überprüfen, inwieweit die Stärke der Überexpression des *PRDM13*-Gens mit dem Phänotyp der NCMD übereinstimmt und ob eine Kategorisierung (Grad 1-3) möglich ist. Hierbei kann man sich neben der phänotypischen Ausprägung der jeweiligen Sequenzvariationen auf den Fundus und die Makula, auch den Visus als Messinstrument für die Sehleistung des Patienten verwenden. Weiterhin bietet die OCT-Untersuchung die Möglichkeit, sich alle

4. Diskussion

Schichten der Netzhaut anzuschauen und gleichzeitig Pathologien zu beobachten. Neben einer OCT-Untersuchung zur Analyse der Netzhaut und der jeweiligen Schichten könnte eine Fluoreszenzangiographie interessante Pathologien der Netzhautgefäße verdeutlichen. Beide Untersuchungsmethoden könnten für weitere Forschungsfragen hinsichtlich des phänotypischen Einflusses der jeweiligen Sequenzvariationen verwendet werden.

Da außerdem nicht alle Ergebnisse dieser Arbeit signifikant sind, ist die weitere Erforschung hinsichtlich der Genexpression der Sequenzvariationen in der PKR notwendig. In dieser Arbeit wird eine physiologische Genexpressions-Variabilität ursächlich für die starke Varianz der Ergebnisse vermutet, da mit standardisierten Protokollen sowie mit regelmäßigen Kontrollmessungen gearbeitet wurde. Dadurch wurde versucht, Fehlerquellen zu reduzieren und die Variabilität der Ergebnisse möglichst gering zu halten. Dies könnte man in weiteren Forschungsfragen in Betracht ziehen.

Zusätzlich sollten die Untersuchungen der Sequenzvariationen, welche in dem Patientenkollektiv der Augenklinik des Gießener Universitätsklinikums gefunden wurden, fortgesetzt werden, um den Einfluss der gefundenen Sequenzvariationen besser verstehen zu können und somit auch Patienten und Betroffene besser aufklären zu können.

In zukünftigen Forschungsarbeiten sollte intensiv der Mechanismus der Entstehung der NCMD untersucht werden, um die Gründe zu erforschen, weshalb Sequenzvariationen in der PKR des Gens zu einer NCMD führen können. Es ist interessant zu wissen, welchen Einfluss die Sequenzvariationen auf die Konformation und die Amplifikation der Plasmide haben können. Dadurch könnte der Pathomechanismus hinter der Entstehung der NCMD besser verstanden und möglicherweise die Rolle des *PRDM13*-Ges deutlicher ermittelt werden werden.

4.6.2 Ausblicke hinsichtlich diagnostischer und therapeutischer Maßnahmen der NCMD

Diese Arbeit konnte den aktuellen Forschungsstand bestätigen, indem eine Überexpression des Transkriptionsfaktors *PRDM13* als ursächlich für die NCMD plausibel erscheint.

Ein zentraler Aspekt in der Erforschung der NCMD ist die Frage nach einer möglichen Therapie der Erkrankten. Hierzu wird, anders als ursprünglich angenommen (22), die NCMD als stabile Erkrankung angesehen (86), welche sich im Laufe des Lebens nicht maßgeblich aggraviert oder verbessert. Es gibt vereinzelte Fälle, in denen die NCMD aggraviert (22). Dies tritt insbesondere bei Patienten mit Grad 2 der NCMD auf (91). Hierbei treten häufiger choroidale Neovaskularisationen auf, die in Langzeitstudien zu einer Visusverschlechterung der Patienten führen. Intravitreale VEGF-Inhibitoren könnten hier als therapeutische Maßnahme zu Symptomlinderung von Betroffenen eingesetzt werden.

Auch gibt es Annahmen, dass Patienten mit einer NCMD ein erhöhtes Risiko haben, dass sich bereits vorhandene atrophische Areale der Makula verschlechtern könnten (7). Eine mögliche Therapie ist bei diesen Patienten jedoch nicht bekannt. Grundsätzlich zeigt sich bei den initial untersuchten Betroffenen der NCMD jedoch keine Verschlechterung der Symptomatik, was die Annahme einer stabilen Makuladegeneration stützt (86). Dass in den Forschungsarbeiten insbesondere betroffene Kinder untersucht und im Leben begleitet wurden, bestärkt diese Tatsache, dass die Erkrankung in ihrer Ausprägung bereits ab der Geburt vorhanden ist und sich im Laufe des Lebens nicht verändert (72, 92, 103).

Viele aktuelle Forschungsarbeiten machen Sequenzvariationen in und um das *PRDM13*-Gen für die Entstehung der NCMD verantwortlich (72, 116). Dies untermauert die Argumentation, dass die NCMD Resultat einer Fehlentwicklung in der Embryonalphase der Betroffenen ist und seit der Geburt vorhanden ist (103). Da laut aktuellem Forschungsstand insbesondere die Fehlregulierung des *PRDM13*-Gens durch Sequenzvariationen vor der Geburt als Ursache für die Entstehung der NCMD angesehen wird, spielt die frühzeitige Diagnostik und Prävention eine zentrale Rolle im Umgang mit der Erkrankung (84).

4. Diskussion

An der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Justus-Liebig-Universität in Gießen werden bereits diagnostische Mittel angewendet, um Betroffene ausführlich zu diagnostizieren. Auch eine familiäre Diagnostik kann bei einem auffälligen Phänotyp hilfreich sein (67). Damit ist es möglich, Betroffene mit NCMD zu diagnostizieren und sie auf die Ursache der Erkrankung hinzuweisen. Dies kann auch bei der Familienplanung von Bedeutung sein.

Inzwischen wurde berichtet, dass die Überexpression des Transkriptionsfaktors *PRDM13* zu Krebserkrankungen führen kann, die nicht nur die Augen betreffen (93). Eine Etablierung von diagnostischen Tests zum Nachweis einer Überexpression des *PRDM13*-Gens könnte somit in Zukunft auch bei der Untersuchung anderer Krebserkrankungen hilfreich sein.

Zusätzlich würde eine Fehlregulation in der Embryonalphase der Betroffenen bedeuten, dass irreversible Schäden auftreten, die i. d. R. nach der Geburt nicht mehr therapiert werden können. Die Embryonalphase ist somit für die Entwicklung der NCMD entscheidend. Dies ist entscheidend, um Betroffene frühzeitig therapieren zu können. Ziel hierbei ist das Vermeiden einer Fehlentwicklung in der Embryonalphase eines Fetus. Um mögliche therapeutische Mittel zu finden, ist die Erforschung der *PRDM13*-Expression in der Embryonalphase essenziell. Die Forschung an frühen menschlichen Embryonen ist jedoch durch das Embryonenschutzgesetz in Deutschland eingeschränkt, weshalb die Untersuchung der therapeutischen Mittel zunächst offenbleibt. Wichtig wäre es, die Modulation des *PRDM13*-Gens in der Embryonalphase zu beeinflussen. Aktuell sind noch keine Medikamente oder Wirkstoffe bekannt, die die *PRDM13*-Expression modulieren oder reprimieren können. Fraglich ist hierbei, ob die Entwicklung der NCMD verhindert werden kann, indem man die Expression des *PRDM13*-Gens reprimiert. Untersuchungen an Tieren und tierischen Embryonen könnten bei der Suche nach therapeutischen Mitteln hilfreich sein.

Insgesamt konnten einige Fragen hinsichtlich des Einflusses einer Überexpression des *PRDM13*-Gens auf die Entwicklung der NCMD beantwortet werden. Diese Arbeit liefert Hinweise auf eine Überexpression des *PRDM13*-Gens bei Sequenzvariationen in dessen PKR. Trotzdem bleibt der Einfluss unterschiedlicher Sequenzbereiche des Transkriptionsfaktors in seiner Regulierung und Expression weitestgehend ungeklärt. Bei dieser Arbeit wird lediglich der Einfluss der Sequenzvariationen in der PKR auf die Aktivität des Promotors und die darauffolgende *PRDM13*-Expression untersucht. Andere Einflüsse durch intragenische Veränderungen sind in dieser Arbeit nicht untersucht

4. Diskussion

worden. Der Pathomechanismus und die Entstehung der NCMD bleiben weiterhin ungeklärt und sind Gegenstand aktueller Forschung. Eine fortlaufende intensive Forschung zum Verständnis der NCMD und ihrer Ursachen ist erforderlich, nicht nur für die Wissenschaft, sondern vor allem im Interesse der Betroffenen.

5 Zusammenfassung

Die North-Carolina-Macular-Dystrophy (NCMD) ist eine seltene autosomal-dominant vererbte Erkrankung der Netzhaut. Dabei kann es bei Betroffenen zu Flecken, Kolobomen oder Läsionen der Makula kommen. Der Verlauf ist individuell stark variabel. Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass ein enger Zusammenhang zwischen der NCMD und der Expression des *PRDM13*-Gens besteht. In früheren Untersuchungen hierzu wurden bereits drei Sequenzvariationen (V1-V3) in der Promotor-Kontroll-Region (PKR) des *PRDM13*-Gens gefunden, welche die Expression des Gens beeinflussen. In der Biodatenbank der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Justus-Liebig-Universität in Gießen wurden bei Betroffenen weitere fünf Sequenzvariationen (M1-M5) in der PKR des *PRDM13*-Gens gefunden. Zur Beurteilung der Expression der jeweiligen Sequenzvariationen wurde mithilfe einer quantitativen PCR die Luziferase-Expression eines Reporter-gen-Assays gemessen und quantifiziert. Die CT-Werte der qPCR-Amplifikation wurden mithilfe der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode mit einem Kontrollplasmid (WT) verglichen. Die Messungen zeigten, dass die Sequenzvariationen (M1-M5, sowie V1-V3) in der PKR des *PRDM13*-Gens zu einer erhöhten Luziferase-gen-Expression im Vergleich zum Kontrollplasmid führten. Dies entspricht einer verstärkten Genexpression des *PRDM13*-Gens bei Vorliegen der Sequenzvarianten. Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass es sich bei der PKR des *PRDM13*-Gens um einen Silencer handelt. Durch den Verlust der Suppression der *PRDM13*-Expression kann das Gen verstärkt transkribiert werden, was zu einer Überexpression führt. Aktuelle Studien nehmen an, dass eine *PRDM13*-Überexpression zur NCMD führt. Die Messungen dieser Arbeit konnten diese Annahme bestätigen und zeigten zusätzlich, dass auch die gefundenen Sequenzvariationen in der Gießener Biodatenbank, die Silencerfunktion der PKR des *PRDM13*-Gens reduzieren. Bei den Plasmiden mit multiplen Sequenzvariationen in der PKR des *PRDM13*-Gens (2K3 und 3K4) konnte sowohl eine reduzierte Reporter-Genexpression (2K3), als auch eine erhöhte Luziferase-Expression (3K4) gemessen werden, sodass keine exakten Angaben zu dem ursächlichen Pathomechanismus von multiplen Sequenzvariationen gemacht werden können. Insgesamt bestätigen die Versuchsreihen dieser Arbeit die Annahme, dass es sich bei der PKR des *PRDM13*-Gens um einen Silencer handelt und dieser durch die Sequenzvariationen in seiner Aktivität beeinflusst werden kann, sodass eine Überexpression des *PRDM13*-Gens resultiert und somit zur NCMD führen kann. Es kann außerdem die Vermutung von Kent Small, dass die gefundenen Sequenzvariationen in der PKR des *PRDM13*-Gens (V1-V3) ursächlich für die Entstehung der NCMD sind, durch diese Arbeit bestätigt werden.

6 Summary

The North Carolina Macular Dystrophy (NCMD) is a rare autosomal-dominantly inherited disorder of the retina. Affected individuals may experience spots, colobomas, or lesions of the macula. The course of NCMD can vary significantly between individuals. Current research indicates a close relation between NCMD and the expression of the *PRDM13*-gene. In previous studies, three different sequence variations (V1-V3) in the promoter-control-region of the *PRDM13*-gene were identified. All three of them were found to influence the expression of the *PRDM13*-gene. Additional five sequence variations (M1-M5) were identified in the promoter-control-region of the *PRDM13*-gene in affected individuals from the ophthalmogenetic biobank of the university eyeclinic at the Justus-Liebig-University Giessen. To assess the influence of these sequence variations and the previously found sequence variations on the expression of the *PRDM13*-gene, luciferase expression was measured and quantified using quantitative PCR (qPCR). The CT-values of the qPCR measurement were compared to the basic luciferase activity of a control plasmid (WT) using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. The experiments revealed that the sequence variations (M1-M5 and V1-V3) in the promoter-control-region of the *PRDM13*-gene lead to an increased luciferase activity and consequently to an increased expression of *PRDM13*-gene compared to the control plasmid. There are indications that the promoter-control-region of the *PRDM13*-gene serves as a silencer, capable of suppressing *PRDM13* expression. A loss of this suppression results in increased transcription of the gene, leading to an overexpression. Current research states that overexpression of the *PRDM13*-gene contributes to the development of NCMD. The findings in this study support this hypothesis and demonstrate further that the discovered sequence variations of the biobank of the University Giessen reduce the silencer function of the promoter control region of the *PRDM13*-gene. Plasmids that contain multiple sequence variations in the promoter control region of the *PRDM13*-gene (2K3 and 3K4) can either lead to a reduced gene expression (2K3) or to an increased gene expression (3K4), making it challenging to determine an exact causal pathomechanism for multiple sequence variations in the promoter-control-region of the *PRDM13*-gene. In summary, this study confirms the hypothesis that the promoter-control-region of the *PRDM13*-gene serves as a silencer. Its activity can be influenced by sequence variations and therefore lead to an overexpression of the *PRDM13*-gene underlying the development of NCMD. This study therefore supports Kent Small's assumption that the sequence variations found in the promoter-control-region of the *PRDM13*-gene are responsible for the development of the NCMD.

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Varianten mit Sequenzvariationen des Gießener Patientenkollektivs in der PKR des MCDR1-Locus.....	13
Tabelle 2.1: Chemikalien	16
Tabelle 2.2: Enzyme.....	17
Tabelle 2.3: Stammlösungen	18
Tabelle 2.4: Wirtszellen	19
Tabelle 2.5: Verbrauchsmaterialien	19
Tabelle 2.6: verwendete Geräte	21
Tabelle 2.7: Computerapplikationen	23
Tabelle 2.8: Primer mit der Sequenzvariation M1-M5 von <i>PRDM13</i>	24
Tabelle 2.9: Primer mit Sequenzvariation V1 und V3 von <i>PRDM13</i>	24
Tabelle 2.10: Primer zur Messung der Genexpression	24
Tabelle 2.11: Verwendete Ausgangsplasmide zur Vorlage für die Synthese der modifizierten Plasmide	25
Tabelle 2.12: Verwendete Klone aus vorherigen Arbeiten	29
Tabelle 2.13 Schematische Darstellung der Gradienten PCR.....	33
Tabelle 2.14: Der PCR-Ansatz	33
Tabelle 2.15: Ansatz Gelelektrophorese	36
Tabelle 2.16: Zusammensetzung eines Ligations-Ansatzes	39
Tabelle 2.17: Sequenzierungsansatz zur Untersuchung eines Plasmids	45
Tabelle 2.18: Schematische Darstellung der qPCR	54
Tabelle 2.19: qPCR Standardansatz	54
Tabelle 3.1: CT-Werte der Versuche 01-05 zum Nachweis der <i>GAPDH</i> -Expression ..	63
Tabelle 3.2: CT-Werte der Versuche 01-05 zum Nachweis der Luziferase-Expression	64

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: NCMD Grad 1-3 in der Fundusfotografie.....	10
Abbildung 2.1: Plasmid pGL4- <i>PRDM13</i> -PROM.....	26
Abbildung 2.2: Plasmid pGL4- <i>PRDM13</i> -PROM-Promotor-Kontroll-Region (PPKR)....	27
Abbildung 2.3: Plasmid pGL4- <i>PRDM13</i> -PROM- Promotor-Kontroll-Region mit klonierter PKR Klone 2K3 und 3K4	28
Abbildung 3.1: Kontrolle der Amplifikationsfähigkeit der Primer mit der eingebauten Sequenzvariation für M5 in der Gelelektrophorese	57
Abbildung 3.2: GFP-Kontrolle der transfizierten HEK-293-Zellen.....	60
Abbildung 3.3: Beispiel einer RNA-Analyse mittels Kapillarelektrophorese.....	61
Abbildung 3.4: Beispielhafte Schmelzkurve der qPCR-Reaktion.....	65
Abbildung 3.5: Veränderung der Luziferase-Aktivität bei Sequenzvariationen in der PKR des <i>PRDM13</i> -Gens	66

9 Abkürzungsverzeichnis

β-ME = Beta-Mercaptoethanol

A = Adenin

AMD = Altersbedingte Makuladegeneration

AMP = Adenosinmonophosphat

ampR = Ampicillin-Resistenzgen

ATP = Adenosintriphosphat

bp = base-pairs

C = Cytosin

c = Konzentration

cDNA = engl. für complementary DNA

CT = Threshold Cycle

d = destilliert

dd = doppelt-destilliert

ddH₂O = doppelt-destilliertes Wasser

DEPC: Diethylpyrocarbonat

DMEM = Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO = Dimethylsulfoxid

DNA = Desoxyribonukleinsäure

dNTP = Desoxy-Nukleosidtriphosphat

ddNTP = Didesoxy- Nukleosidtriphosphat

dsDNA = doppelsträngige DNA

E. coli = Escherichia coli

engl. = englisch

G = Guanin

G>T = Nukleotidsubstitution Guanin zu Thymin

GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

HCl = Chlorwasserstoff

H₂O = Wasser

HEK = menschliche embryonale Nierenzellen (aus dem Englischen = Human embryonic-kidney)

kb = kilo-base

LB = engl. für *lysogeny broth*

L = engl. für *ladder*

M. = Morbus

M1 - M5 = Mutationen 1 - 5

9. Abkürzungsverzeichnis

Mg²⁺ = zweifach-positiv geladene Magnesium-Ionen

MgCl₂ = Magnesiumchlorid

mRNA = messenger ribonucleic acid

n = Stichprobe einer Grundgesamtheit

NCMD = North-Carolina Macular Dystrophy

O₂ = Sauerstoff

OD₆₀₀ = engl. für *optical density* bei einer Wellenlänge von 600 nm

PCR = Polymerase-Kettenreaktion

PKR = Promotor-Kontroll Region

pmol = pikomol

qPCR = quantitative PCR PR = engl. für *positive regulatory*

PROM = Promotor

RNA = Ribonukleinsäure

rpm = engl. für *revolutions per minute*

rRNA = ribosomale Ribonukleinsäure

RT = Reverse Transkriptase

s = Sekunden

ssDNA = engl. für *single stranded DNA*

T = Thymin

TBE = Tris, Borsäure, EDTA 2 H₂O + 2 Na

TC = engl. für *tissue culture*

TRIS = Tris(hydroxymethyl)aminomethan

tRNA = transfer-RNA

UV = Ultraviolette Strahlung

V1/2/3 = Variante 1 bis 3

WT = Wildtyp

10 Literaturverzeichnis

1. Achilli C, Ciana A, Minetti G. Immortalized HEK 293 Kidney Cell Lines as Models of Renal Cells: Friends or Foes? *jcbmr* 2018; 4(1):6–9.
2. Al-Ubaidi MR, Matsumoto H, Kurono S, Singh A. Proteomics profiling of the cone photoreceptor cell line, 661W. *Adv Exp Med Biol* 2008; 613:301–11.
3. Bardwell L. The mutagenic and carcinogenic effects of gene transfer. *Mutagenesis* 1989; 4(4):245–53.
4. Beck TF, Mullikin JC, Biesecker LG. Systematic Evaluation of Sanger Validation of Next-Generation Sequencing Variants. *Clin Chem* 2016; 62(4):647–54.
5. Bessodes N, Parain K, Bronchain O, Bellefroid EJ, Perron M. Prdm13 forms a feedback loop with Ptf1a and is required for glycinergic amacrine cell genesis in the *Xenopus* Retina. *Neural Dev* 2017; 12(1):16.
6. Biau DJ, Kernéis S, Porcher R. Statistics in brief: the importance of sample size in the planning and interpretation of medical research. *Clin Orthop Relat Res* 2008; 466(9):2282–8.
7. Birtel J, Gliem M, Herrmann P, Neuhaus C, Holz FG, MacLaren RE et al. North Carolina macular dystrophy shows a particular drusen phenotype and atrophy progression. *Br J Ophthalmol* 2022; 106(9):1269–73.
8. Bowne SJ, Sullivan LS, Wheaton DK, Locke KG, Jones KD, Koboldt DC et al. North Carolina macular dystrophy (MCDR1) caused by a novel tandem duplication of the PRDM13 gene. *Mol Vis* 2016; 22:1239–47.
9. Button KS, Ioannidis JPA, Mokrysz C, Nosek BA, Flint J, Robinson ESJ et al. Power failure: why small sample size undermines the reliability of neuroscience. *Nat Rev Neurosci* 2013; 14(5):365–76.
10. Casamassimi A, Rienzo M, Di Zazzo E, Sorrentino A, Fiore D, Proto MC et al. Multifaceted Role of PRDM Proteins in Human Cancer. *Int J Mol Sci* 2020; 21(7).
11. Chang JC, Meredith DM, Mayer PR, Borromeo MD, Lai HC, Ou Y-H et al. Prdm13 mediates the balance of inhibitory and excitatory neurons in somatosensory circuits. *Dev Cell* 2013; 25(2):182–95.
12. Chong ZX, Yeap SK, Ho WY. Transfection types, methods and strategies: a technical review. *PeerJ* 2021; 9:e111165.

10. Literaturverzeichnis

13. Christensen DRG, Brown FE, Cree AJ, Ratnayaka JA, Lotery AJ. Sorsby fundus dystrophy - A review of pathology and disease mechanisms. *Exp Eye Res* 2017; 165:35–46.
14. Chuang L-Y, Cheng Y-H, Yang C-H. Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnol Lett* 2013; 35(10):1541–9.
15. Ciftci-Yilmaz S, Mittler R. The zinc finger network of plants. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65(7-8):1150–60.
16. Cipriani V, Silva RS, Arno G, Pontikos N, Kalhor A, Valeina S et al. Duplication events downstream of IRX1 cause North Carolina macular dystrophy at the MCDR3 locus. *Sci Rep* 2017; 7(1):7512.
17. Coolen M, Altin N, Rajamani K, Pereira E, Siquier-Pernet K, Puig Lombardi E et al. Recessive PRDM13 mutations cause fatal perinatal brainstem dysfunction with cerebellar hypoplasia and disrupt Purkinje cell differentiation. *Am J Hum Genet* 2022; 109(5):909–27.
18. ddCt. Bioconductor; 2017.
19. DeCero SA, Winslow CH, Coburn J. Method to Overcome Inefficiencies in Site-Directed Mutagenesis of A/T-Rich DNA. *J Biomol Tech* 2020; 31(3):94–9.
20. Derveaux S, Vandesomepele J, Hellemans J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods* 2010; 50(4):227–30.
21. Engelhardt H, Beck W, Kohr J, Schmitt T. Kapillarelektrophorese: Methoden und Möglichkeiten. *Angew. Chem.* 1993; 105(5):659–80.
22. Frank HR, Landers MB, Williams RJ, Sidbury JB. A new dominant progressive foveal dystrophy. *Am J Ophthalmol* 1974; 78(6):903–16.
23. Fus-Kujawa A, Prus P, Bajdak-Rusinek K, Teper P, Gawron K, Kowalczyk A et al. An Overview of Methods and Tools for Transfection of Eukaryotic Cells in vitro. *Front Bioeng Biotechnol* 2021; 9:701031.
24. Gliem M, Müller PL, Mangold E, Holz FG, Bolz HJ, Stöhr H et al. Sorsby Fundus Dystrophy: Novel Mutations, Novel Phenotypic Characteristics, and Treatment Outcomes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015; 56(4):2664–76.
25. Graw. Genetik. Springer Berlin Heidelberg; 2015.
26. Green DJ, Lenassi E, Manning CS, McGaughey D, Sharma V, Black GC et al. North Carolina Macular Dystrophy: Phenotypic Variability and Computational

10. Literaturverzeichnis

- Analysis of Disease-Associated Noncoding Variants. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2021; 62(7):16.
27. Grehn F. *Augenheilkunde*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2012.
28. Guan XL, Chang DPS, Mok ZX, Lee B. Assessing variations in manual pipetting: An under-investigated requirement of good laboratory practice. *J Mass Spectrom Adv Clin Lab* 2023; 30:25–9.
29. Hanotel J, Bessodes N, Th  lie A, Hedderich M, Parain K, van Driessche B et al. The Prdm13 histone methyltransferase encoding gene is a Ptf1a-Rbpj downstream target that suppresses glutamatergic and promotes GABAergic neuronal fate in the dorsal neural tube. *Dev Biol* 2014; 386(2):340–57.
30. Hemsley A, Arnheim N, Toney MD, Cortopassi G, Galas DJ. A simple method for site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* 1989; 17(16):6545–51.
31. Hohenauer T, Moore AW. The Prdm family: expanding roles in stem cells and development. *Development* 2012; 139(13):2267–82.
32. Hollon T, Yoshimura FK. Variation in enzymatic transient gene expression assays. *Anal Biochem* 1989; 182(2):411–8.
33. Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 1990; 96(1):23–8.
34. Jansohn M, Rothh  mel S, editors. *Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen f  r das molekularbiologische Labor*. 5. Aufl. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl.; 2012.
35. Kalmus H, Seedburgh D. Probable common origin of a hereditary fundus dystrophy (Sorsby's familial pseudoinflammatory macular dystrophy) in an English and Australian family. *J Med Genet* 1976; 13(4):271–6.
36. Kellner U, Renner AB, Tillack H. Heredit  re Netzhaut-Aderhaut-Dystrophien Teil 2: Differenzialdiagnose. *Ophthalmologe* 2004; 101(4):397-412; quiz 413-4.
37. Klein D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends Mol Med* 2002; 8(6):257–60.
38. Kleparn  k K, Bocek P. DNA diagnostics by capillary electrophoresis. *Chem Rev* 2007; 107(11):5279–317.
39. Kralik P, Ricchi M. A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Front Microbiol* 2017; 8:108.

10. Literaturverzeichnis

40. Kurreck J, Engels JW, Lottspeich F, editors. *Bioanalytik*. 4. Auflage. Berlin: Springer Spektrum; 2022.
41. Kusumawati A, Septisetyani EP, Triratna L, Umami RN, Hertati A, Mustopa AZ. Expression of human papillomavirus genotype 52 pseudovirus in HEK-293T cells. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 2023; 1271(1):12086.
42. Lang GK, editor. *Augenheilkunde*. 6., überarbeitete Auflage. Stuttgart, Deutschland: Georg Thieme Verlag; 2019.
43. Latchman DS. *Gene control*. Second edition. New York: Garland Science; 2020.
44. Latchman DS. *Eukaryotic Transcription Factors*. 5th. Academic Press; 2010.
45. Latchman DS. Transcription factors: an overview. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29(12):1305–12.
46. Latchman DS. Eukaryotic transcription factors. *Biochem J* 1990; 270(2):281–9.
47. Lee C, Kim J, Shin SG, Hwang S. Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 2006; 123(3):273–80.
48. Lefler WH, Wadsworth JA, Sidbury JB. Hereditary macular degeneration and amino-aciduria. *Am J Ophthalmol* 1971; 71(1 Pt 2):224–30.
49. Li SF. *Capillary electrophoresis: Principles, practice and applications*. 3rd impression. Amsterdam [etc.]: Elsevier; 1996. (Journal of chromatography library; vol 52).
50. Li W, Zhang N, Liang X, Li J, Gong P, Yu X et al. Transient transfection of *Cryptosporidium parvum* using green fluorescent protein (GFP) as a marker. *Mol Biochem Parasitol* 2009; 168(2):143–8.
51. Lin Y-C, Boone M, Meuris L, Lemmens I, van Roy N, Soete A et al. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nat Commun* 2014; 5:4767.
52. Lippi G, Lima-Oliveira G, Brocco G, Bassi A, Salvagno GL. Estimating the intra- and inter-individual imprecision of manual pipetting. *Clin Chem Lab Med* 2017; 55(7):962–6.
53. Lipska BK, Deep-Soboslay A, Weickert CS, Hyde TM, Martin CE, Herman MM et al. Critical factors in gene expression in postmortem human brain: Focus on studies in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2006; 60(6):650–8.

10. Literaturverzeichnis

54. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25(4):402–8.
55. Lorenz B, Preising MN. Morbus Best Ein Überblick zur Pathologie und deren Ursachen. *Ophthalmologie* 2005; 102(2):111–5.
56. Lorsch J, editor. *Methods in enzymology: DNA*. Waltham, MA: Academic Press; 2013. (Methods in enzymology volume five hundred and twenty nine).
57. Lüllmann-Rauch R, Asan E. *Taschenlehrbuch Histologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2019.
58. Malm M, Saghaleyni R, Lundqvist M, Giudici M, Chotteau V, Field R et al. Evolution from adherent to suspension: systems biology of HEK293 cell line development. *Sci Rep* 2020; 10(1):18996.
59. Manes G, Joly W, Guignard T, Smirnov V, Berthemy S, Bocquet B et al. A novel duplication of PRMD13 causes North Carolina macular dystrophy: overexpression of PRDM13 orthologue in drosophila eye reproduces the human phenotype. *Hum Mol Genet* 2017; 26(22):4367–74.
60. Michaelides M, Johnson S, Tekriwal AK, Holder GE, Bellmann C, Kinning E et al. An early-onset autosomal dominant macular dystrophy (MCDR3) resembling North Carolina macular dystrophy maps to chromosome 5. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44(5):2178–83.
61. Michov B. *Elektrophorese*. DE GRUYTER; 1996.
62. Mona B, Uruena A, Kollipara RK, Ma Z, Borromeo MD, Chang JC et al. Repression by PRDM13 is critical for generating precision in neuronal identity. *Elife* 2017; 6.
63. Mostafa HKK. Different Cells of the Human Body: Categories and Morphological Characters. *J Microsc Ultrastruct* 2022; 10(2):40–6.
64. Müller H-J. *PCR - Polymerase-Kettenreaktion*. Springer Berlin Heidelberg; 2016.
65. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; 51 Pt 1:263–73.
66. Namburi P, Khateb S, Meyer S, Bentovim T, Ratnapriya R, Khramushin A et al. A unique PRDM13-associated variant in a Georgian Jewish family with probable North Carolina macular dystrophy and the possible contribution of a unique CFH variant. *Mol Vis* 2020; 26:299–310.

10. Literaturverzeichnis

67. Nekolova J, Stepanov A, Kousal B, Stredova M, Jiraskova N. Modern diagnostic and therapeutic approaches in familial maculopathy with reference to North Carolina macular dystrophy. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2022; 166(4):418–27.
68. Pauleikhoff D, Sauer CG, Müller CR, Radermacher M, Merz A, Weber BH. Clinical and genetic evidence for autosomal dominant North Carolina macular dystrophy in a German family. *Am J Ophthalmol* 1997; 124(3):412–5.
69. Platschek M. Zum genotypischen und phänotypischen Spektrum der North-Carolina-Macular-Dystrophy (NCMD) bei Sequenzvariationen in PRDM13 und IRX1. Justus Liebig University Giessen: Universitätsbibliothek Gießen; 2020.
70. Quan P-L, Sauzade M, Brouzes E. dPCR: A Technology Review. *Sensors (Basel)* 2018; 18(4).
71. Ranganathan P, Pramesh CS, Buyse M. Common pitfalls in statistical analysis: Clinical versus statistical significance. *Perspect Clin Res* 2015; 6(3):169–70.
72. Reichel MB, Kelsell RE, Fan J, Gregory CY, Evans K, Moore AT et al. Phenotype of a British North Carolina macular dystrophy family linked to chromosome 6q. *Br J Ophthalmol* 1998; 82(10):1162–8.
73. Reinard T. *Molekularbiologische Methoden 2.0*. Stuttgart, Deutschland: utb GmbH; 2021.
74. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1997; 245(2):154–60.
75. Rose JK. Optimization of transfection. *Curr Protoc Neurosci* 2001; Appendix 1:Appendix 1B.
76. Schaaf CP, Zschocke J. *Basiswissen Humangenetik*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2018.
77. Schmidt O. *Genetik und Molekularbiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2017.
78. Schworm HD, Ulbig MW, Hoops J, Rudolph G, Weber BH, Ehrh O et al. North-Carolina-Makuladystrophie. Hereditäre Makulaerkrankung mit guter funktioneller Prognose. *Ophthalmologie* 1998; 95(1):13–8.
79. Seigel GM. The golden age of retinal cell culture. *Mol Vis* 1999; 5:4.

10. Literaturverzeichnis

80. Seo Y, Joo K, Lee J, Diaz A, Jang S, Cherry TJ et al. Two novel non-coding single nucleotide variants in the DNase1 hypersensitivity site of PRDM13 causing North Carolina macular dystrophy in Korea. *Mol Vis* 2024; 30:58–66.
81. Sheng Y, Mancino V, Birren B. Transformation of *Escherichia coli* with large DNA molecules by electroporation. *Nucleic Acids Res* 1995; 23(11):1990–6.
82. Silva RS, Arno G, Cipriani V, Pontikos N, Defoort-Dhellemmes S, Kalhor A et al. Unique noncoding variants upstream of PRDM13 are associated with a spectrum of developmental retinal dystrophies including progressive bifocal chorioretinal atrophy. *Hum Mutat* 2019; 40(5):578–87.
83. Site-Directed Mutagenesis. *International Journal of Research Studies in Biosciences* 2017; 5(10).
84. Small KW, DeLuca AP, Whitmore SS, Rosenberg T, Silva-Garcia R, Udar N et al. North Carolina Macular Dystrophy Is Caused by Dysregulation of the Retinal Transcription Factor PRDM13. *Ophthalmology* 2016; 123(1):9–18.
85. Small KW, Garcia CA, GALLARDO G, Udar N, YELCHITS S. NORTH CAROLINA MACULAR DYSTROPHY (MCDR1) IN TEXAS. *Retina* 1998; 18(5):448–52.
86. Small KW, Killian J, McLean WC. North Carolina's dominant progressive foveal dystrophy: how progressive is it? *Br J Ophthalmol* 1991; 75(7):401–6.
87. Small KW, Tawfik CA, Udar N, Udar U, Avetisjan J, El-Aidy LA et al. CONGENITAL POSTERIOR POLAR CHORIORETINAL HYPOPLASIA: Expansion of the Clinical Spectrum, Mutation, and Its Association With PRDM13. *Retina* 2022; 42(12):2379–87.
88. Small KW, van de Sompele S, Nuytemans K, Vincent A, Yuregir OO, Ciloglu E et al. A novel duplication involving PRDM13 in a Turkish family supports its role in North Carolina macular dystrophy (NCMD/MCDR1). *Mol Vis* 2021; 27:518–27.
89. Small KW, Weber J, Roses A, Pericak-Vance P. North Carolina macular dystrophy (MCDR1). A review and refined mapping to 6q14-q16.2. *Ophthalmic Paediatr Genet* 1993; 14(4):143–50.
90. Small KW, Weber JL, Roses A, Lennon F, Vance JM, Pericak-Vance MA. North Carolina macular dystrophy is assigned to chromosome 6. *Genomics* 1992; 13(3):681–5.

10. Literaturverzeichnis

91. Small KW, Wiggins R, Udar N, Silva-Garcia R, Avetisjan J, Vincent A et al. North Carolina Macular Dystrophy: Long-term Follow-up of the Original Family. *Ophthalmol Retina* 2022; 6(6):512–9.
92. Small L, Small K, Shaya F. North Carolina Macular Dystrophy. In: Cheung G, editor. *Hereditary Chorioretinal Disorders*. Singapore: Springer Singapore; 2020. p. 95–8 (Retina Atlas).
93. Sorrentino A, Federico A, Rienzo M, Gazzero P, Bifulco M, Ciccodicola A et al. PR/SET Domain Family and Cancer: Novel Insights from the Cancer Genome Atlas. *Int J Mol Sci* 2018; 19(10).
94. SORSBY A, MASON MEJ. A fundus dystrophy with unusual features. *Br J Ophthalmol* 1949; 33(2):67–97.
95. Steger G. *Bioinformatik: Methoden zur Vorhersage von RNA- und Proteinstrukturen*. Basel: Birkhäuser Basel; Imprint; Birkhäuser; 2003.
96. Stepanenko AA, Dmitrenko VV. HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution. *Gene* 2015; 569(2):182–90.
97. Stepanenko AA, Heng HH. Transient and stable vector transfection: Pitfalls, off-target effects, artifacts. *Mutat Res Rev Mutat Res* 2017; 773:91–103.
98. Sun X-J, Xu P-F, Zhou T, Hu M, Fu C-T, Zhang Y et al. Genome-wide survey and developmental expression mapping of zebrafish SET domain-containing genes. *PLoS One* 2008; 3(1):e1499.
99. Tan E, Chin CSH, Lim ZFS, Ng SK. HEK293 Cell Line as a Platform to Produce Recombinant Proteins and Viral Vectors. *Front Bioeng Biotechnol* 2021; 9:796991.
100. Tanna P, Strauss RW, Fujinami K, Michaelides M. Stargardt disease: clinical features, molecular genetics, animal models and therapeutic options. *Br J Ophthalmol* 2017; 101(1):25–30.
101. Taylor S, Wakem M, Dijkman G, Alsarraj M, Nguyen M. A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods* 2010; 50(4):S1-5.
102. Toth K, Wold WSM. HEK? No! *Mol Ther* 2002; 5(6):654.
103. Tsang SH, Sharma T. North Carolina Macular Dystrophy. *Adv Exp Med Biol* 2018; 1085:109–10.

10. Literaturverzeichnis

104. Vaillancourt PE. *E. coli* Gene Expression Protocols. Totowa, NJ: Humana Press Inc., Totowa, NJ; 2003. (Methods in Molecular Biology; vol 205).
105. Valones MAA, Guimarães RL, Brandão LAC, Souza PRE de, Albuquerque Tavares Carvalho A de, Crovela S. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. *Braz J Microbiol* 2009; 40(1):1–11.
106. van de Sompele S, Small KW, Cicekdal MB, Soriano VL, D'haene E, Shaya FS et al. Multi-omics approach dissects cis-regulatory mechanisms underlying North Carolina macular dystrophy, a retinal enhanceropathy. *Am J Hum Genet* 2022; 109(11):2029–48.
107. Vermeulen J, Preter K de, Lefever S, Nuytens J, Vloed F de, Derveaux S et al. Measurable impact of RNA quality on gene expression results from quantitative PCR. *Nucleic Acids Res* 2011; 39(9):e63.
108. Versieck J, Barbier F, Cornelis R, Hoste J. Sample contamination as a source of error in trace-element analysis of biological samples. *Talanta* 1982; 29(11 Pt 2):973–84.
109. Wang D, Farhana A. *StatPearls: Biochemistry, RNA Structure*. Treasure Island (FL); 2023.
110. Watanabe S, Sanuki R, Sugita Y, Imai W, Yamazaki R, Kozuka T et al. Prdm13 regulates subtype specification of retinal amacrine interneurons and modulates visual sensitivity. *J Neurosci* 2015; 35(20):8004–20.
111. Weber BH, Vogt G, Pruett RC, Stöhr H, Felbor U. Mutations in the tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3) in patients with Sorsby's fundus dystrophy. *Nat Genet* 1994; 8(4):352–6.
112. Whittaker DE, Oleari R, Gregory LC, Le Quesne-Stabej P, Williams HJ, Torpiano JG et al. A recessive PRDM13 mutation results in congenital hypogonadotropic hypogonadism and cerebellar hypoplasia. *J Clin Invest* 2021; 131(24).
113. Wong TS, Tee KL. *Ein praktischer Leitfaden für Protein Engineering*. Cham, Schweiz: Springer; 2023.
114. Woo J, Jin B-H, Lee M, Lee EY, Moon H-S, Park J-Y et al. Investigation of PRDM10 and PRDM13 Expression in Developing Mouse Embryos by an Optimized PACT-Based Embryo Clearing Method. *Int J Mol Sci* 2021; 22(6).
115. Xuan X, Sinton D, Li D. Thermal end effects on electroosmotic flow in a capillary. *International Journal of Heat and Mass Transfer* 2004; 47(14-16):3145–57.

10. Literaturverzeichnis

116. Yang Z, Tong Z, Chorich LJ, Pearson E, Yang X, Moore A et al. Clinical characterization and genetic mapping of North Carolina macular dystrophy. *Vision Res* 2008; 48(3):470–7.
117. Yao Z, Nahon JL. DNA gyrase improves DNA transformation of E.coli cells with large recombinant plasmids. *Nucleic Acids Res* 1995; 23(16):3353–4.
118. Yin J, Li G, Ren X, Herrler G. Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *J Biotechnol* 2007; 127(3):335–47.
119. Yuan J, W. Xu W, Jiang S, Yu H, Fai Poon H. The Scattered Twelve Tribes of HEK293. *Biomed. Pharmacol. J.* 2018; 11(2):621–3.
120. Zhang L, Cao H, He T, Yang J, Tao H, Wang Y et al. Overexpression of PRDM13 inhibits glioma cells via Rho and GTP enzyme activation protein. *Int J Mol Med* 2018; 42(2):966–74.
121. Zhao J. Cell individuality: a basic multicellular phenomenon and its role in the pathogenesis of disease. *Med Hypotheses* 1995; 44(5):400–2.

11 Publikationsverzeichnis

Die Arbeit und ihre Ergebnisse wurden auf dem jährlichen Treffen der ARVO im Mai 2024 in Seattle (USA) vorgestellt:

Markus N Preising, Christian Zlobin; On the Activity of Sequence Variants in the Enhancer of *PRDM13*. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2024;65(7):4645.

12 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.“

Ort/Datum

Unterschrift

13 Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Laborarbeiten und der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben:

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. med. habil. Dr. rer. medic. Markus Preising.

Ich danke herzlich für die intensive Unterstützung, die Geduld und die kontinuierliche Motivation zur Fertigstellung dieser Arbeit.

Ebenfalls danke ich den Kollegen im Labor, die mich täglich unterstützt und ermutigt haben. Mit viel Humor war die Arbeit im Labor immer schön und es herrschte eine angenehme Stimmung. Dankeschön an Stefanie Wölfel und Janona Spangenberg.

Ich danke von ganzem Herzen meiner geliebten Familie, die mir stets ein Antrieb war, mich motiviert und mit Ideen und Vorschlägen unterstützt hat. Ich weiß, dass ich immer auf euch zählen kann.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Freunden bedanken, die mir Mut zusprachen, mich aufmunterten und mir stets den Rücken stärkt.