

**Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei Patienten
mit frühkindlicher Netzhautdegeneration
und Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen**

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

vorgelegt von Ute Schneider
aus Gierstädt/OT Kleinfahner

Gießen (2017)

Aus dem Labor für Molekulare Ophthalmologie
an der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Direktorin der Klinik: Prof. Dr. med. Birgit Lorenz

Gutachter: PD Dr. Preising

Gutachter: Prof. Dr. Müller

Tag der Disputation: 01.08.2017

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

- 1.1. Die Retina
- 1.2. Die Photorezeptoren
- 1.3. Die Zilien
- 1.4. Ziliopathien
 - 1.4.1. Frühkindliche Netzhautdystrophien
 - 1.4.1.1. Leber`sche Kongenitale Amaurose (LCA)
 - 1.4.1.2. Retinitis pigmentosa (RP)
 - 1.4.2. Ziliopathien
 - 1.4.2.1. Senior-Løken-Syndrom (SLS)
 - 1.4.2.2. Joubert-Syndrom (JBTS)
 - 1.4.2.3. Meckel-Gruber-Syndrom (MKS)
 - 1.4.2.4. Bardet-Biedl-Syndrom (BBS)
 - 1.4.2.5. Usher-Syndrom
- 1.5. *CEP290*
- 1.6. Aufgabenstellung

2. Material und Methoden

- 2.1. Das Patientenkollektiv
- 2.2. Materialnachweis
- 2.3. Instrumenten- und Gerätenachweis
- 2.4. Methoden
 - 2.4.1. Die Polymerasekettenreaktion (PCR)
 - 2.4.2. Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren und deren Nachweis
 - 2.4.2.1. Die Agarose-Gelelektrophorese
 - 2.4.2.2. DNA-Färbung im Agarosegel mit Ethidiumbromid
 - 2.4.2.3. Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP)
 - 2.4.2.4. Silberfärbung von Polyacrylamidgelen
 - 2.4.2.5. Sequenzierung
 - 2.4.2.6. High Resolution Melting (HRM)

3. Ergebnisse

3.1. Das Patientenkollektiv

3.2. Identifizierte Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen

3.2.1. Ablauf der Screeninguntersuchung

3.2.2. Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen – Ergebnisse des Mutationsscreenings

3.3. Mutationsformen

3.3.1. Splice-Site Mutationen

3.3.2. Nonsense-Sequenzvariation

3.3.3. Missense-Mutation

3.3.4. Leserasterverschiebungen

3.3.5. Isokodierende Polymorphismen im *CEP290*-Gen

3.4. Augenärztliche Daten der Patienten mit Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen

4. Diskussion

4.1. Technische Bewertung

4.1.1. Bewertung der Single Strand Conformation Polymorphismus (SSCP)-Analyse

4.1.2. Bewertung der High Resolution Melting (HRM)-Analyse

4.2. Pathogenes Potential der Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen

4.3. Vergleich des Phänotyps der *CEP290*-Patienten

4.4. Molekulargenetische Bewertung

4.5. Bewertung der Genotyp-Phänotyp-Korrelation

4.6. Schlussgedanke

5. Zusammenfassung

Summary

6. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

7. Abkürzungsverzeichnis

8. Literaturverzeichnis / Quellenangaben

9. Ehrenwörtliche Erklärung

10. Danksagung

1. Einleitung

1.1. Die Retina

Die Netzhaut ist entwicklungsgeschichtlich und funktionell ein vorgeschobener Anteil des Gehirns (Vorderhirn). Die Photorezeptoren stellen einen Teil des Gehirns dar [15; 19; 33; 60].

Die Netzhaut besitzt drei hintereinander geschaltete Neurone: die Photorezeptoren, die Bipolar- und die Ganglienzellen [19; 30; 33; 60].

Das einfallende Licht durchläuft alle Netzhautschichten, bis es an der äußersten Schicht, der Rezeptorenschicht, ankommt. Die Ganglienzellschicht setzt sich aus den Ganglienzellen (3. Neuron) zusammen. Die Axone der Ganglienzellen (Nervenfaserschicht) und die Membrana limitans interna grenzen die Retina vom Glaskörper ab. An der Papille finden alle Ganglienzell-Axone zusammen und bilden von dort an den Sehnerv. Sie sind in der Retina nicht myelinisiert [19; 30; 32; 33; 60].

Die innere Körnerschicht wird durch die Zellkerne der Bipolarzellen (2. Neuron), Horizontalzellen und amakrinen Zellen gebildet. Die innere plexiforme Schicht durch deren Axone. Sie erfüllen die Funktion der horizontalen Verschaltung und Informationsverarbeitung [19; 30; 33; 60].

In der Rezeptorenschicht, die den Bereich zwischen der äußeren plexiformen Schicht und der Schicht der Photorezeptoraußensegmente umfasst, trifft der einfallende Lichtstrahl auf die Photorezeptoren. Die äußere Körnerschicht wird durch die Zellkerne der Photorezeptoren (1. Neuron) gebildet [19; 30; 33; 60].

Die Retina enthält ca. 127 Mio. Photorezeptoren. Im Zentrum der Netzhaut befindet sich die Macula lutea (Gelber Fleck). Sie enthält eingelagertes gelbliches Pigment (Lutein und Zeaxanthin). In der Macula lutea sind vorwiegend Zapfen vorzufinden, die für das Tag- und Farbsehen verantwortlich sind. In ihrem Zentrum liegt die gefäßfreie Netzhautgrube (Fovea centralis retinae), die Stelle des schärfsten Sehens. Sie befindet sich drei bis vier Millimeter temporal und etwas unterhalb der Papille. In der Foveola (Zentrum der Fovea) sind nur Zapfen vorhanden, die einzeln innerviert sind. In der Peripherie der Netzhaut befinden sich vorwiegend Stäbchen, die für das Dämmerungs- und Nachtsehen zuständig sind [15; 19; 30; 33; 60; 62].

Die Photorezeptoren liegen über dem retinalen Pigmentepithel (RPE). Ohne Anbindung an das Pigmentepithel können die Photorezeptoren ihre Funktion nicht wahrnehmen [15; 19; 30; 33; 60; 62].

Das RPE stellt die Verbindung der Netzhaut mit der Aderhaut (Chorioidea) dar. Das RPE reduziert die Reflektion, der von den Photorezeptoren nicht absorbierten Lichtquanten, durch die Chorioidea und Sklera. Eine Verringerung des räumlichen Auflösungsvermögens wird dadurch vermieden [60]. Das Pigmentepithel ist von Bedeutung bei der Versorgung der Photorezeptoren sowie bei der Erneuerung der Photorezeptoren und der Entsorgung von Stoffwechselendprodukten (z.B. abgestoßene Außensegmente der Photorezeptoren, gebleichter Chromophor) [15; 30; 32; 33; 60]. Von der Aderhaut (Chorioidea) wird das Pigmentepithel durch die Bruch-Membran abgegrenzt. Die Chorioidea dient den äußeren Netzhautschichten zur Ernährung und Temperaturregulation. Müller-

1. Einleitung

Stützzellen, spezielle Gliazellen, befinden sich in allen Netzhautschichten und verankern die Retina [19; 30; 32; 33; 60].

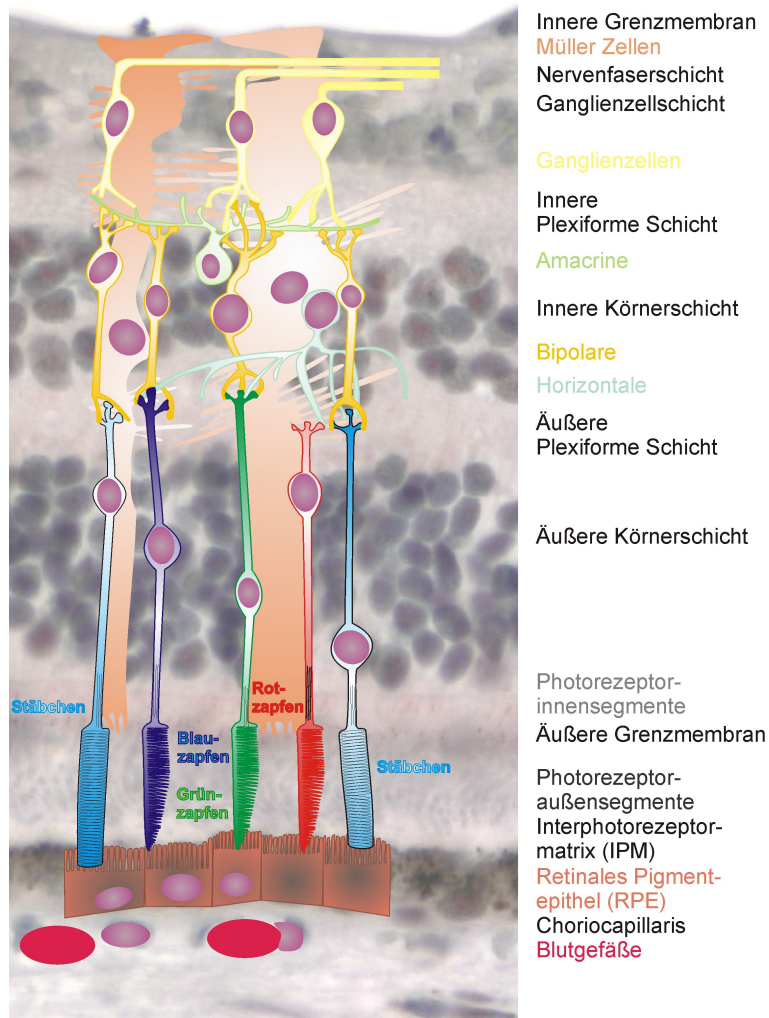


Abb. 1: Schnitt durch die humane Netzhaut

(Mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. M. Preisling)

1.2. Die Photorezeptoren

Die Retina enthält zwei verschiedene Sinneszellen (Photorezeptoren), die Stäbchen und die Zapfen. Die Stäbchen sind verantwortlich für die Hell-Dunkel-Empfindlichkeit (Dämmerungs-, Nachtsehen). Die Zapfen sind zuständig für die Farbempfindlichkeit (Tag-, Farbsehen). Das Sehpigment Rhodopsin ist in den Stäbchen, und die lang-, mittel- und kurzwelligen Sehpigmente sind in den Zapfen zu finden [15; 19; 30; 33; 60; 62].

Die Zapfen werden in drei verschiedene Typen eingeteilt, die für das trichromatische Farbsehen verantwortlich sind: Rot- (langwellig), Grün- (mittelwellig) und Blauzapfen (kurzwellig) [19; 33; 60].

Stäbchen und Zapfen sind auf der Netzhaut unterschiedlich verteilt. In der Fovea centralis sind nur Zapfen vorhanden, deren Dichte zur Peripherie hin schnell abnimmt. Die höchste Stäbchendichte ist ca. 30 Grad rings um die Fovea centralis zu finden. An der Papilla nervi optici sind keine Photorezeptoren vorhanden. Diese Stelle wird aufgrund dessen als blinder Fleck bezeichnet [15; 19; 30; 33; 60; 62].

Im direkten Kontakt mit dem Pigmentepithel befindet sich das äußere Segment der Stäbchen und Zapfen. Es ist in eine Vertiefung der Pigmentepithelzellen eingelagert. Das Außensegment ist lichtsensitiv. Bei den Stäbchen stellt das äußere Segment einen Membranzylinder dar, in dem sich mehrere tausend gleichgroße scheibenförmige Membransäckchen befinden. Die Membransäckchen sind vom Plasmalemma umhüllt. Das äußere Segment der Zapfen nimmt eine eher konische Form ein, bei der die proximalen Einstülpungen der Zellmembran größer sind als die distalen [26; 30; 32; 62].

Dem äußeren Segment folgt das innere Segment. Verbunden sind beide Segmente durch ein Übergangsstück. Dieses hat eine dünne exzentrische Form und enthält das verbindende Zilium [26; 30; 56].

In dem inneren Segment befinden sich die Zellorganellen (Endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat und Mitochondrien). Es wird unterteilt in einen distalen azidophilen Bereich (Ellipsoid) und einen proximalen basophilen Bereich (Myoid). Der Zellkörper geht in einen Fortsatz über, in dem sich wie bei einem Axon Filamente und Mikrotubuli befinden. Entweder ist der Zellkern am Übergang vom inneren Segment zum Axon zu finden oder im Bereich des Axons. Das innere Segment bildet am apikalen Ende eine Synapse und stellt damit den Kontakt mit der nachgeschalteten Bipolarzelle her [26; 30; 32; 62].

Das äußere Segment wird permanent regeneriert. Alte Membranscheiben werden an der Spitze abgestoßen und vom Pigmentepithel phagozytiert (die der Stäbchen morgens, die der Zapfen abends). Neue Membranscheiben werden von dem inneren Segment nachgeschoben. Photorezeptoren sind terminal differenzierte Zellen, die nicht erneuert werden [26; 30; 60; 62].

1.3. Die Zilien

Die Zilien (Flimmerhärchen) sind schlanke - röhrenförmige, haarähnliche, 5 - 10 µm lange und 250 nm dicke Zellorganellen, die wie kleine Antennen aus der Zelloberfläche herausragen [1; 21; 26; 35; 40; 56; 59].

Die primären Zilien sind auf den meisten Zelltypen im Körper zu finden. Diese sind, bedingt durch ihre innere Struktur, von den motilen (beweglichen) Zilien zu unterscheiden. Die beweglichen Zilien sind nur in bestimmten Organen anwesend und besitzen eine bedeutende Rolle bei intra-, und extrazellulären Transportvorgängen. Dazu gehört die Zellbewegung, zum Beispiel der Spermien oder der Transport der Einzelle im Eileiter (sexuelle Reproduktion). Weiterhin spielen sie eine Rolle bei der Transportbewegung von Flüssigkeiten im Körper, beispielsweise in der Niere oder bei dem Transport des Schleims und der Schmutzstoffe entlang der Trachea aus der Lunge heraus [1; 3; 21; 26; 35; 40; 53; 56].

Im Gegensatz dazu dienen die primären Zilien als Bindeglieder und erfüllen eine Vielzahl von Funktionen als Mechano-, Chemo- und Osmosensoren sowie bei der Durchführung und Kontrolle von zahlreichen Signalwegen zwischen Zellen. Dadurch spielen sie eine wichtige Rolle bei der Koordination von Zellwachstum, Polarität und Differenzierung der Zelle [1; 3; 21; 26; 35; 40; 53; 56; 59].

Die Zilien sind von der Zellmembran umhüllt, die auch den Rest der Zelle umgibt. Das Axonem stellt das Grundgerüst der Zilie dar. Dieses Faserbündel besteht aus Mikrotubuli. Die primären Zilien weisen eine $9 \times 2 + 0$ -Anordnung auf (ohne die zentralen Mikrotubuli). Die motilen Zilien besitzen, durch zwei zusätzliche zentrale Mikrotubuli, eine $9 \times 2 + 2$ -Struktur der Mikrotubuli [1; 3; 21; 26; 35; 40; 53; 56; 59].

Hierbei werden zwei einzelne, voneinander getrennte, zentrale Mikrotubuli von neun Mikrotubuli-Dubletten (Doppelröhren) kranzförmig umgeben. Eine zentrale Hülle umgibt die zwei zentralen Mikrotubuli. Die peripheren Mikrotubuli-Dubletten beinhalten einen komplett aufgebauten A- und einen halbmondförmig angelagerten B-Tubulus. Durch Dyneinarme (innere und äußere) sind die peripheren Mikrotubuli-Dubletten verbunden. Hierbei reichen die Dyneinarme vom A-Tubulus einer Dublette zum B-Tubulus der nächsten Mikrotubuli-Dublette. Auf den primären Zilien sind keine Dyneinarme vorhanden. Die im Kreis angeordneten peripheren Mikrotubuli-Dubletten sind über Nexine (Brücken zwischen den Dubletten) ringförmig verbunden. Zu den zwei einzelnen zentralen Mikrotubuli besteht eine Verbindung über radiär angeordneten Speichen. Das Axonem durchzieht die ganze Zilie und ist im Cytoplasma über einen Basalkörper verankert. Der Basalkörper ist eine spezialisierte Zentriole mit einem Strukturmuster von 9×3 Mikrotubuli [1; 21; 53; 59].

Verantwortlich für die aktive Bewegung der motilen Zilien sind die Dyneine, die mit dem A-Tubulus fest verankert und mit dem B-Tubulus, der benachbarten peripheren Mikrotubuli-Dublette, reversibel verbunden sind. Der Bewegungsmechanismus ist energieabhängig und stellt ein Aneinandergleiten der peripheren Mikrotubuli-Dubletten bei gleichzeitiger Krümmung der Zilie dar. Hierbei dienen die Nexine zur Fixierung und Verankerungen der Mikrotubuli-Dubletten an der

1. Einleitung

Zilienbasis. Jede Zilie bewegt sich gegenüber ihrer Nachbarzilie zeitlich gering versetzt. Dadurch kommt es zu einer wellenförmigen Bewegung (metachrone Bewegung) [53; 59].

In der Abbildung 2 ist ein Photorezeptor mit verbindendem Zilium dargestellt. Der Photorezeptor ist unterteilt in das Außensegment, das verbindende Zilium und das Innensegment. Das Außensegment enthält einen Stapel aus flach liegenden Vesikeln, den Disks. In deren Diskmembran erfolgt der photochemische Prozess der Sehkaskade. Die notwendige Energie erhält das Außensegment aus dem Innensegment, in dem die Synthese der essentiellen Substanzen zur Phototransduktion erfolgt. Das Außen- und Innensegment ist über eine Zilie verbunden [1; 3; 21; 26; 35; 40; 53; 56; 59].

Das Photorezeptoraußensegment mit dem verbindenden Zilium ist eine in Struktur und Funktion spezialisierte primäre Zilie. Funktionell stellt sie eine Verbindungszilie dar. Die innere Struktur der Photorezeptor-Zilie entspricht einer primären Zilie [1; 3; 26; 40; 56].

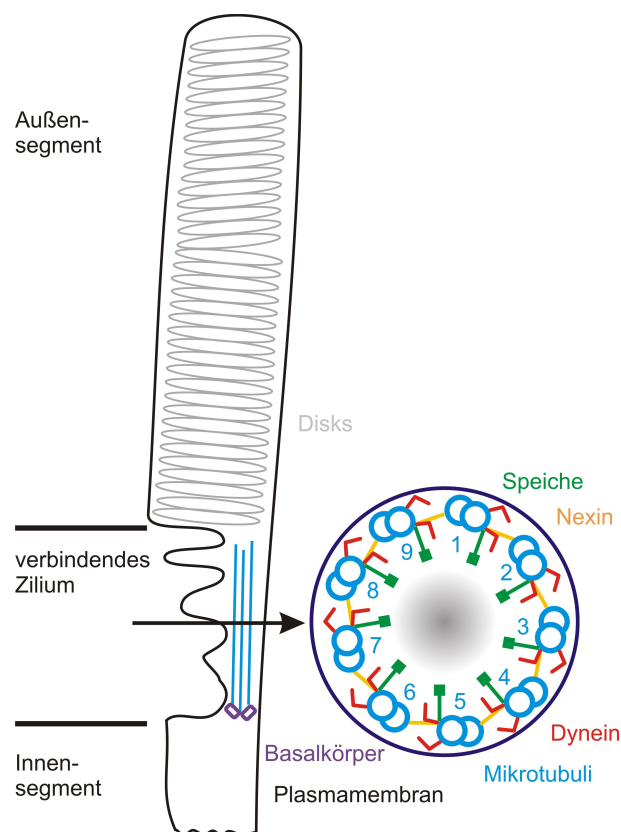


Abb. 2: Aufbau des Photorezeptors mit verbindendem Zilium

Das verbindende Zilium ist eine primäre Zilie.

(Mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. M. Preisling)

Funktionell dient die Photorezeptor-Zilie dem interflagellaren Transport (IFT) von Proteinen und essentiellen Substanzen (beispielsweise der retinalen Guanylatzyklase (RetGC), Rhodopsin, Transduzin oder Arrestin) und Lipiden (zur Erneuerung der Membranscheibchen). Diese werden bei der Phototransduktion, der Instandhaltung und Funktion des äußeren Segmentes benötigt (anterograde IFT, in Richtung der Zilie). Der anterograde IFT erfolgt von dem inneren zum

1. Einleitung

äußeren Segment, dem Axonem entlang. Ursächlich dafür ist die Synthese aller essentiellen Substanzen im inneren Segment. Der retrograde IFT, zur Basis (Richtung Zellkörper) ist für den Rücktransport des Materials zur Wiederaufbereitung zuständig [1; 3; 26; 40; 56].

Die Transportbewegungen werden durch molekulare Motoren ermöglicht. Der anterograde Transportweg erfolgt durch Kinesine (KIF3A, KIF3B) und der Retrograde durch Dynein1B. Der IFT-Transport stellt die ständige Erneuerung der Membranscheibchen des äußeren Segmentes sicher. Die neuen Membranscheibchen werden an der Basis des äußeren Segmentes nachgeschoben. Die Entsorgung findet am apikalen Ende statt. Findet der Abtransport nicht statt, stirbt die Zelle [1; 3; 21; 26; 40; 56].

Eine Sequenzvariation in Genen, die für Proteine kodieren, die zum Aufbau der Zilien und/oder den Proteintransport benötigt werden, führen zur Photorezeptordegeneration. Aufgrund des vielfältigen Vorkommens von primären Zilien auf vielen unterschiedlichen Zelltypen kann die Photorezeptordegeneration mit anderen klinischen Manifestationen verbunden sein, die unter dem Begriff Ziliopathien zusammengefasst werden [1; 3; 26; 40; 56].

1.4. Ziliopathien

Unter dem Begriff Ziliopathien wird eine große Vielfalt von Erkrankungen zusammengefasst, deren Ursache in einer Störung der Struktur und/oder Funktion von Zilien liegt. Die genetische Veränderung kann zum einen ein einzelnes Organ (oder Gewebe) betreffen (isolierte Ziliopathie). Zum anderen kann die Ziliopathie sich in einem Syndromspektrum manifestieren, wobei verschiedene Organe betroffen sein können. Dabei ist eine große phänotypische Variabilität zu verzeichnen. Die Pleiotropie der Zilienproteine basiert auf deren Organspezifität und der Protein-Protein-Wechselbeziehung [3; 21; 26; 27; 35; 40; 56].

Einen weiteren Einfluss auf die Manifestation hat die allelische Heterogenität. Diese führt aufgrund der funktionellen Eigenarten einer jeden Sequenzvariation zu vielfältigen phänotypischen Ausprägungen und zum Teil auch zu Syndromen, wie im Fall des *CEP290*. Hier werden isolierte Ziliopathien wie Retinitis pigmentosa, Leber`sche Kongenitale Amaurose und Nephronophthisis, wie auch ziliopathieassoziierte Syndrome wie zum Beispiel Joubert-Syndrom, Senior-Løken-Syndrom und Meckel-Gruber-Syndrom beschrieben. Aus der Vielzahl der betroffenen Organe kann die große Vielfalt der phänotypischen Manifestationen abgeleitet werden, in denen die Zilienfunktion für eine adäquate Entwicklung und Aufrechterhaltung der Gewebe eine bedeutende Rolle spielt. Zu diesen Organen zählen hauptsächlich das Auge und dort die Netzhaut (Netzhautdegeneration), die Niere (Nephronophthisis), das zentrale Nervensystem (Encephalocoele), mentale Retardierung, das Herz (Anomalien (Vitien: Pulmonalklappenstenose; Herzrhythmusstörungen), die Leber (Leberfibrose), die Bauchspeicheldrüse (Zysten), die Lunge (Bronchiektasien), die Nase (Anosmie) und das Ohr (Schwerhörigkeit). Weiterhin spielt die Zilienfunktion in der Embryologie eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung der

1. Einleitung

Achsendeterminierung (Situs inversus), der Links-rechts-Symmetrie, der Gliedmaßen (Polydaktylie) und orofazialer Strukturen (offener Gaumen). Zur sexuellen Reproduktion sind Zilien unerlässlich. Sie sind auf den Epithelien der Eileiter vorhanden. Die Motilität der Spermien, beispielsweise durch den Eileiter, erfolgt durch Flagellen. Die Flagellen der Spermien sind modifizierte bewegliche Zilien. Ist die sexuelle Reproduktion betroffen, kann eine Infertilität hervorgerufen werden [3; 14; 21; 27; 40; 56].

Die zentrale Steuerung der Nahrungsaufnahme wird von der Zilienfunktion mit beeinflusst. Dies wird als Ursache der Entstehung der Adipositas bei Ziliopathie-Patienten diskutiert [40].

Weiterhin spielen Zilien bei der Entwicklung von Gehirnstrukturen eine entscheidende Rolle, beispielsweise beim Hypocampus und Hypothalamus, da z.B. die Leptinrezeptoren der Neuronen des Hypothalamus auf der ziliären Membran lokalisiert sind [3; 14; 21; 27; 40; 56].

Häufig ist die primäre Zilie (Verbindungszilie) des Photorezeptors betroffen. Sie verbindet das äußere mit dem inneren Segment, und ermöglicht den Transport von molekularbiologischen Substanzen und Abbauprodukten. Dies ist entscheidend für das Aufrechterhalten und Funktionieren der Photorezeptoren. Die Zilie des Photorezeptors teilt wichtige regulierende Schlüsselmechanismen mit Zilien anderer Zelltypen. Sequenzvariationen der Photorezeptor-Zilie und/oder dessen Transportproteine kann zur Photorezeptordegeneration führen. Zusätzlich können weitere klinische Manifestationen in verschiedenen Organen, durch die Fehlfunktion der primären Zilie und/oder der Transportproteine, verursacht werden [26; 40; 56].

1.4.1. Frühkindliche Netzhautdystrophien

1.4.1.1. Leber'sche Kongenitale Amaurose (LCA)

Theodor Carl Gustav von Leber beschrieb im Jahre 1869, erstmals die Leber'sche Kongenitale Amaurose, die als schwere Sehbeeinträchtigung von Geburt an beobachtet wird. Diese Beobachtung bezeichnete er als eine tapeto-retinale Degeneration mit Amaurosis [11; 19; 55].

Die LCA ist eine Erbkrankheit, die meist autosomal-rezessiv vererbt wird. Es kommen jedoch auch Fälle mit einem autosomal-dominanten Erbgang vor [11; 46; 54; 55]. Die LCA stellt eine heterogene Gruppe von Netzhaut-Aderhaut-Dystrophien dar. Es liegt eine ausgeprägte klinische Heterogenität vor, die sich als Zapfen-Dystrophie, Zapfen-Stäbchen-Dystrophie und Stäbchen-Zapfen-Dystrophie darstellen kann [54].

Klinisch manifestiert sich die Leber'sche Kongenitale Amaurose mit einer ausgeprägten Sehbeeinträchtigung (mit Gesichtsfeldeinschränkung) oder Blindheit bei der Geburt oder kurz nach der Geburt (innerhalb des ersten Lebensjahres). Die Ausprägung ist individuell. Zum Teil ist noch eine Lichtwahrnehmung vorhanden, und in einigen Fällen wird eine geringe Sehschärfe erreicht. Diese Sehreste können für die Patienten in der Jugend noch einige Jahre von Nutzen sein [11; 19; 46; 54; 55].

In der Literatur werden weitere Erkrankungssymptome aufgelistet, die in Erscheinung treten

1. Einleitung

können: Nystagmus, Strabismus, herabgesetzte Blendungsempfindlichkeit, fehlende Reaktion auf Lichtreize, Störungen des Nacht- und Farbsehens, herabgesetzte oder fehlende Pupillen-Lichtreaktion, Hyperopie, Linsentrübung (Katarakt), Keratokonus und eine Photophobie sind möglich. Manche Patienten sind photophil. Sie wenden sich starken Lichtquellen zu [11; 46; 55].

Die Patienten können durch das okulodigitale Phänomen (Augenbohren) in Erscheinung treten, bei dem durch Druck mit den Fingern auf den Bulbus versucht wird, Lichtphänomene auszulösen [19; 46].

Im Frühstadium kann sich der Augenhintergrund sowohl unauffällig bis schwer atrophisch darstellen. Im Verlauf können sehr verschieden ausgeprägte Befunde festgestellt werden, die Pigmentepitheldefekte, knochenkörperförmige Ablagerungen, Blutgefäßverengungen, Aderhautatrophie und Optikusatrophie umfassen [11; 46; 54; 55].

Die genetischen Veränderungen betreffen bereits frühzeitig die Funktion der Stäbchen und Zapfen-Reizantworten. Aufgrunddessen sind im Ganzfeld-Elektroretinogramm (ERG) skotopische (Stäbchen) und photopische (Zapfen) Reizantworten nicht oder nur sehr gering ableitbar [11; 46; 54; 55].

Zu den ursächlich veränderten Genen gehören: *GUCY2D* (*LCA1*), *RPE65* (*LCA2*), *SPATA7* (*LCA3*), *AIPL1* (*LCA4*), *LCA5*, *RPGRIP1* (*LCA6*), *CRX* (*LCA7*), *CRB1* (*LCA8*), *CEP290* (*LCA10*), *IMPDH1* (*LCA11*), *RD3* (*LCA12*), *RDH12* (*LCA13*), *ALMS1*, *CABP4*, *CNGA3*, *IQCB1*, *KCNJ13*, *LRAT*, *MYO7a*, *PDE6C*, *TULP1*. Sequenzvariationen in diesen Genen liegen bei 70 - 80% der LCA-Patienten der Erkrankung zugrunde. Für die anderen Patienten mit LCA konnten aktuell die ursächlichen Gene noch nicht identifiziert werden [11; 46; 54; 55]. Sequenzvariationen in den fünf Genen, *AIPL1*, *CEP290*, *GUCY2D*, *RDH12* und *RPGRIP* stellen aktuell die häufigste Ursache der LCA dar. Phänotypisch können hier meist schwerwiegende Retina-Veränderungen verzeichnet werden [54; 55]. *CEP290* ruft circa 15 - 22% der Fälle (je Literaturangabe schwankend) und *GUCY2D* circa 12% der Fälle hervor [37; 70]. Eher sporadisch treten Sequenzvariationen in den Genen *RD3*, *LCA5*, *CABP4*, *IMPDH1*, *IQCB1*, *KCNJ13*, *PDE6C*, *SPATA7*, *TULP1*, *ALMS1*, *CNGA3* und *MYO7a* bei LCA auf [54; 55]. Vier dieser LCA verursachenden Gene kodieren für ziliäre Proteine und können zu Ziliopathien führen. Diese sind *CEP290*, *TULP1*, *RPGRIP* und *LCA5* [11].

Abhängig von der Sequenzvariation eines Proteins und dessen Restfunktion prägen die Patienten eine schwere Sehbeeinträchtigung bereits im ersten Lebensjahr aus, und werden in diesem Zusammenhang als LCA-Patienten klassifiziert. Im Gegensatz dazu berichtete von Leber in einer Publikation von 1916 über eine mildere Verlaufsform, der von ihm beschriebenen Erkrankung, die erst im sechsten bis siebten Lebensjahr begann und erst in der vierten Dekade zur Erblindung führte. Dieses Patientenkollektiv erfüllt nicht die Charakteristika der „klassischen“ LCA. Für diese Patienten prägten Lorenz und Mitarbeiter den Begriff frühkindliche Netzhautdegeneration (Early-onset severe retinal dystrophien, EOSRD). Der Begriff wird allerdings nicht einheitlich in der Literatur angewendet [68; 73].

1. Einleitung

Die EOSRD ist eine heterogene Erbkrankheit. Weleber und Kollegen beschreiben zum einen einen hauptsächlich autosomal-rezessiven Erbgang. In wenigen Fällen kann ein autosomal-dominanter Erbgang bei frühkindlichen Formen auftreten. Die autosomal-rezessive Form ist bei den Genen *AIPL1*, *CEP290*, *CRB1*, *GUCY2D*, *IQCB1*, *LCA5*, *LRAT*, *MERTK*, *RD3*, *RDH12*, *RPGRIP1*, *RPE65*, *SPATA7* und *TULP1* beobachtet worden, die autosomal-dominante Form bei den Genen *CRX* und *IMPDH1*. Die Liste der beteiligten Gene expandiert derzeit schnell, wobei in letzter Zeit vor allem Gene identifiziert wurden, die nur wenige Familien betreffen [55; 68; 73; 75; 77; 79; 80; 82].

1.4.1.2. Retinitis pigmentosa (RP)

Im Jahre 1855 prägte der Niederländer Franz Donders den Begriff Retinitis pigmentosa. Er beschrieb vor allem die knochenkörperähnlichen Pigmentablagerungen und die Gefäßveränderungen. Als Synonym wurde der Begriff Retinopathia pigmentosa eingeführt, da es sich nicht primär um eine Entzündung handelt (Retinitis = Entzündung der Netzhaut). Bei der klassischen RP sind am Augenhintergrund Pigmentverklumpungen und -ablagerungen zu finden. Aufgrund dessen wurde der Begriffsteil pigmentosa gewählt [7; 33; 48].

Die Retinitis pigmentosa stellt eine heterogene Gruppe von Netzhaut-Dystrophien dar. Es erfolgt eine chronisch progrediente Zerstörung der Photorezeptoren (meist bevorzugt zuerst die Stäbchen und später die Zapfen) und des Pigmentepithels der Retina [7; 19; 22; 26; 33; 48].

Sekundär kann die Degeneration anderer Netzhautschichten beobachtet werden, wie auch eine Optikusatrophie, Nachtblindheit, Gesichtsfeldeinschränkung, Visusreduktion bis Erblindung, Blendungsempfindlichkeit sowie Abnahme des Dämmerungs-, Kontrast- und Farbsehens [7; 19; 26; 33; 48].

Das Vorhandensein der klinischen Merkmale, ihr zeitliches Auftreten und deren Ausprägung ist individuell. Der Verlauf ist schleichend und kann sich über Jahrzehnte erstrecken. Die RP stellt derzeit die häufigste Ursache des Sehverlustes im mittleren Erwachsenenalter dar [19; 26; 33].

Die ophthalmologischen Befunde der klassischen Retinitis pigmentosa (Stäbchen-Zapfen-Dystrophie) sind knochenkörperähnliche Pigmentverklumpungen und -ablagerungen der äußeren und mittleren Netzhautperipherie. Die Netzhautarterien erscheinen sehr eng. Die Papille ist wachsgelb gefärbt und atrophisch [19; 26; 33].

Das ERG ist schon im Frühstadium des Krankheitsverlaufes stark reduziert bzw. unterhalb der Nachweisgrenze, wodurch sich teilweise Überlappungen zu den frühkindlichen Netzhautdegenerationen ergeben [19; 26].

Aufgrund der vielfältigen klinischen Überlappung werden mit dem Begriff Retinitis pigmentosa verschiedene Formen erblicher Netzhauterkrankungen verknüpft. An dieser Stelle werden daher einige Formen aufgelistet, die in der Literatur beschrieben werden:

1. klassische / primäre RP = Stäbchen-Zapfen-Dystrophie

2. inverse RP = Zapfen-Stäbchen-Dystrophie (zuerst sind hauptsächlich Zapfen betroffen)
3. Pseudo-Retinitis pigmentosa (Phänokopien)
(Ähnliche Veränderungen des Augenhintergrundes werden z. B. durch Entzündungen, Autoimmunerkrankungen oder Vergiftungen hervorgerufen)
4. Syndromale Retinitis pigmentosa
(Hierbei tritt die RP und andere schwerwiegende Augenveränderungen, verbunden mit weiteren Organerkrankungen auf. Hierzu zählen u. a. die Ziliopathien die im Verlauf näher erläutert werden) [19; 33].

Die RP ist eine Erbkrankheit. In der Literatur werden aktuell drei Vererbungswege beschrieben: autosomal-rezessiv, autosomal-dominant und geschlechtsgebundene Vererbung (X-chromosomal) [7; 19; 26; 33; 48].

Patienten mit autosomal-dominanter Vererbung weisen, im Gegensatz zu den autosomal-rezessiven und X-chromosomalen Formen, oft erst im späteren Lebensalter eine erhebliche Sehverschlechterung auf [19].

Je nach Literaturangabe schwanken die Angaben. Hosch und Kollegen berichten, dass die autosomal-dominante Form ca. 30 - 40% der RP-Fälle ausmacht, die autosomal-rezessive Vererbung 50 - 60% und die X-chromosomale Form 5 - 15%. Retinitis pigmentosa kann als isolierte Erkrankung wie auch als Syndrom mit extraokulären Symptomen assoziiert auftreten [26]. Für die X-chromosomale Retinitis pigmentosa wurden sechs Genorte beschrieben. Für zwei davon *RP2* und *RP3* (*RPGR*) sind die ursächlichen Gene bereits beschrieben und gehören in die Gruppe der ziliopathieassoziierten Gene [22; 82]. Ca. 80% der Patienten mit X-chromosomaler RP zeigen Sequenzvariationen im *RPGR*-Gen. *RPGR* interagiert mit *CEP290* [26]. Für *RP6*, *RP23*, *RP24* und *RP34* müssen die ursächlichen Gene noch identifiziert werden [22; 82].

Für den autosomal-dominanten Erbgang sind derzeit 23 und für den autosomal-rezessiven 39 identifizierte Loci beschrieben worden [82].

1.4.2. Ziliopathien

1.4.2.1. Senior-Løken-Syndrom (SLS)

Bei dem Senior-Løken-Syndrom (SLS) ist eine Kombination von Nephronophthisis (NPHP) und Netzhautdegeneration vorzufinden. Das SLS wird, wie die isolierte NPHP, autosomal-rezessiv vererbt [12; 27; 40].

Das Endstadium der Nierenerkrankung ist verbunden mit Niereninsuffizienz, Nierenversagen und Dialysepflichtigkeit. Ihr Verlauf ist chronisch und progressiv, und sie wird in drei Formen (die infantile, die juvenile und die adolescente Form) unterteilt [12; 27; 40].

Bei ca. 15 % der Patienten mit Nephronophthisis wurde eine Netzhautdegeneration festgestellt. Die Kombination NPHP und Netzhautdegeneration trat am häufigsten bei der juvenilen Form der Nephronophthisis auf [12; 27; 40].

1. Einleitung

In der Literatur wird die Netzhautdegeneration hauptsächlich in zwei Formen unterschieden: die Leber'sche Kongenitale Amaurose und die tapeto-retinale Degeneration. Die LCA stellt die schwerwiegendere Verlaufsform dar, die schon im Säuglingsalter auftreten kann (siehe 1.4.1.1. Leber'sche Kongenitale Amaurose (LCA)). Die tapeto-retinale Degeneration stellt die mildere Verlaufsform dar [12; 27; 40].

Mockel und Kollegen verweisen aktuell auf 11 *NPHP*-Gene (*NPHP 1-11*), die eine Nephronophthisis verursachen. Sie berichten, dass SLS-Fälle durch die *NPHP*-Gene (außer *NPHP7*) hervorgerufen wurden. Sequenzvariationen in *NPHP5* und *NPHP6* waren häufiger mit Netzhautdegenerationen verbunden, die in jüngerem Lebensalter begannen und einen schwereren Verlauf aufzeigten [40].

1.4.2.2. Joubert-Syndrom (JBTS)

Das Joubert-Syndrom wurde auch als Joubert-Bolthausen-Syndrom, Vermis-Agenesie und Cerebello-Parenchymale Störung IV bezeichnet [14]. Es gehört ebenfalls in den Komplex der ziliopathieassoziierten Syndrome und wird autosomal-rezessiv vererbt [12; 14; 17; 27; 40; 44; 47].

In der Literatur wird das JBTS durch Mittel- und Hinterhirnveränderungen (Vermis-cerebelli-Aplasie), Okzipitale Meningoenzephalozele, Hydrozephalus, degenerative Veränderungen der Retina (Netzhautdegeneration, Retina-Dystrophy, LCA), der Aderhaut und des Nervus opticus, Strabismus, Nystagmus (oft von Geburt an), Amblyopie, Ptosis, Kolobom der Aderhaut und der Retina, Drusenpapille, Hypotonie, Hyperpnoe, Tachypnoe, Apnoe (vor allem bei Säuglingen, Apnoe kann auch bei älteren Kindern vorkommen), Nierenveränderungen (Nephronophthisis, Zystennieren), Leberfibrose, Polydaktylie (der oberen und/oder unteren Extremitäten), Ataxie, Tremor, Protrusion der Zunge und endokrine Veränderungen charakterisiert. Des Weiteren kann eine Entwicklungsverzögerung und geistige Retardierung beobachtet werden [12; 14; 27; 40; 44; 47; 64].

Es besteht eine große Variabilität in dem klinischen Erscheinungsbild. Bei den Patienten werden verschiedene dargelegte phänotypische Merkmale, in unterschiedlicher Ausprägung, beschrieben. Die Ausprägung der klinischen Manifestationen muss nicht von Geburt an vorhanden sein, sondern kann sich im Laufe der Zeit entwickeln und verstärken [12; 14; 27; 40; 44; 47; 64].

Die Diagnose Joubert-Syndrom wird aufgrund der vorhandenen phänotypischen Manifestation gestellt. Dazu gehört das Molar-Tooth-Sign in der Magnetresonanztomografie-Aufnahme, als Folge der Vermisaplasie [12; 14; 40; 47].

Mockel und Mitarbeiter listen zehn Gene auf, die als ursächlich für das Joubert-Syndrom beschrieben wurden. Diese sind *INPP5P/JBTS1*, *AHI1/JBTS3*, *NPHP1*, *CEP290/NPHP6*, *TMEM67/MKS3/NPHP11*, *RPGRIP1L/NPHP8*, *ARL13B/JBTS8*, *CC2D2A/JBTS9*, *TMEM216/JBTS2* und *OFD1* [40].

1.4.2.3. Meckel-Gruber-Syndrom (MKS)

Das Meckel-Gruber-Syndrom ist eine schwere autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung. Diese Entwicklungsstörung findet in der frühen embryonalen Phase statt [12; 27; 40].

Die meisten Kinder versterben intrauterin oder perinatal. Selten überschreitet die Lebenserwartung der neugeborenen Kinder mehr als zwei Wochen. Dies ist abhängig von der Art und der Ausprägung der Entwicklungsstörung. Die Prognose ist grundsätzlich infaust [12; 27; 40].

Das MKS manifestiert sich klinisch in einer Multiorganbeteiligung. In der Literatur zählen zu den klassischen phänotypischen Manifestationen: zystisch-dysplastische Nierenveränderungen, kongenitale Leberfibrose, okzipitale Meningoenzephalozele und weitere Fehlbildungen des zentralen Nervensystems wie Dysgenese der Fossa rhomboidea und Anenzephalus. Dazu sind postaxiale Polydaktylien (der oberen und/oder unteren Extremitäten) bekannt. Weiterhin können degenerative Veränderungen der Retina wie Retinitis pigmentosa und Fehlbildungen in der Retina (Sehnervhypoplasie, Mikrophthalmie), im Herzkreislaufsystem und im Urogenitaltrakt auftreten sowie ein offener Gaumen und ein Situs inversus [12; 27; 40].

Mockel und Kollegen berichten derzeit über sieben ursächliche Gene für das Meckel-Gruber-Syndrom. Diese sind: *MKS1*, *MKS2* und *MKS3*, *CEP290*, *NPHP 3*, *RPGRIP1L* und *CC2D2A* [40].

1.4.2.4. Bardet-Biedl-Syndrom (BBS)

Das Bardet-Biedl-Syndrom gehört zu den ziliopathieassoziierten Syndromen und wird autosomal-rezessiv vererbt [12; 19; 40; 45].

Die phänotypische Manifestation zeigt sich in einer Multiorganbeteiligung. Die klinischen Manifestationen können von Patient zu Patient eine unterschiedliche Ausprägung zeigen [12; 19; 40; 45].

In der Literatur erfolgt daher eine Klassifizierung in primäre und sekundäre Merkmale. Zu den primären Merkmalen werden eine Netzhautdystrophie im Sinne einer Retinitis pigmentosa, Nierenerkrankungen (Niereninsuffizienz, Zysten, Dialysepflicht, vesikourethraler Reflux), Polydaktylie der oberen und/oder unteren Extremitäten, juvenile Adipositas mit lebenslangem Fortbestand, Hypogonadismus bei Männern und mentale Retardierung gezählt [12; 40; 45].

Als sekundäre Merkmale werden beispielsweise Strabismus, Katarakt, Anosmie, Brachydaktylie, Diabetes mellitus, Leberfibrose, Herzkreislaufveränderungen (Vitium: bikuspidale Aortenklappe, Pulmonalklappenstenose), Diabetes insipidus (Polyurie, Polydipsie), Ataxie, Koordinations- und Gleichgewichtsstörungen sowie verzögerte Sprachentwicklung, Verhaltensprobleme, leichte Spastik (vor allem der unteren Extremität), Zahnschiefstand, hochgewölbter Gaumen und urogenitale Fehlbildungen (beispielsweise Harnröhren-, Vorhautverengung, Hypospadie, Vaginalatresien) aufgeführt [12; 40; 45].

Die Augenveränderungen treten frühzeitig auf und führen zu einer schwerwiegenden visuellen Behinderung. Bei Patienten mit BBS und visueller Beeinträchtigung ist diese meist in den ersten 15

1. Einleitung

- 20 Lebensjahren progredient. Hauptsächlich anzutreffen sind Zapfen- und/oder Stäbchendystrophie, Aderhautdystrophie, Nacht- und Farbenblindheit, Astigmatismus, Strabismus und Katarakt. Die Stärke und das Fortschreiten der Veränderungen sind von Patient zu Patient sehr verschieden [40; 45].

Die Diagnose wird hauptsächlich durch das Vorhandensein der primären Merkmale gefestigt. Es müssen mindestens vier davon vorliegen. Sollten nur drei primäre Merkmale das klinische Bild ausmachen, reichen zwei sekundäre Merkmale, um die Diagnose Bardet-Biedl-Syndrom zu sichern [40].

Derzeit sind 18 Gene (*BBS1* - *BBS18*) für das BBS identifiziert worden, die ca. 80% der Patienten beschreiben. Dabei können in einem Patienten mehrere verursachende Gene Sequenzvariationen auftreten [40].

Mehrere *BBS*-Gene sind für andere Ziliopathien mit ursächlich, beispielsweise:

- BBS13* ist mit *MKS1* auch eine genetische Ursache für das Meckel-Gruber-Syndrom
- BBS14* ist mit *CEP290* ein zentrales Gen bei verschiedenen Ziliopathien [40; 45].

1.4.2.5. Usher-Syndrom

Das Usher-Syndrom ist eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung [19; 40].

Sie ist charakterisiert durch die Kombination von Hör- und Sehbehinderung. Die Schädigung der Stereozilien in der Schnecke des Innenohres stellt die Ursache für die Innenohrschwerhörigkeit dar. Die Sehbehinderung beruht auf einer Retinopathia pigmentosa [19]. Weitere Merkmale des Usher-Syndroms wie grauer Star und Gleichgewichtsstörungen sind möglich [81].

In der Literatur erfolgt eine Klassifizierung in drei Typen:
Typ 1: stellt die schwerste Form dieser Erkrankung dar, und ist charakterisiert durch eine Taubheit von Geburt an, schwere Gleichgewichtsstörungen und eine früh beginnende Sehbehinderung (Retinopathia pigmentosa schon im frühen Kindesalter: mit Nachtblindheit und Gesichtsfeldstörung);

Typ 2: die Hörbehinderung ist schwächer ausgeprägt im Gegensatz zum Typ 1 und die Retinopathia pigmentosa manifestiert sich im frühen Erwachsenenalter (Verringerung des Dämmerungs- und Nachtsehens);

Typ 3: die Hörbehinderung prägt sich erst im Laufe des Lebens aus und die Sehbehinderung im frühen Erwachsenenalter (seltener Typ) [19; 40; 81].

1.5. *CEP290*

Das *CEP290*-Gen befindet sich auf dem Chromosom 12q21.32 [4].

Das Gen hat 54 Exone und eine Länge von 2479 Aminosäuren (umfasst 93,2 kb) [4]. Das Genprodukt *CEP290* besitzt ein Molekulargewicht von 290 kDa. Das *CEP290* ist aus 13 coiled-coil-, drei Tropomyosinhomologie-, einer hook-, sechs RepA/RepB- und Proteinkinase enthaltene Domäne, einer myosinschwanzhomologen Region und eine BPNLS-Domäne (zweigeteiltes Lokalisierungssignal), ein nukleäres Lokalisierungssignal sowie einem ATP/GTP Bindungsmotiv (P-loop) aufgebaut (siehe Abb. 3: Domänen und bindende Regionen im *CEP290*-Gen) [4; 8; 11; 12; 23; 24; 39; 47; 58]. Die Möglichkeit, dass die Coiled-coil Domänen an der gesamten Konformation von *CEP290* beteiligt sind, wurde diskutiert. Sequenzvariationen in den Coiled-coil Domänen können die Zugänglichkeit für interagierende Proteine beeinflussen [11; 12]. Eine Bedeutung finden die RepA/RepB und Proteinkinase enthaltenden Domänen in der Beeinflussung der Regulation des Zellzyklus [58]. Jedoch ist die genaue Bedeutung und Funktion derzeit noch nicht geklärt [11; 12; 39].

Weiterhin lässt sich im mittleren Bereich des Proteins eine strukturelle Homologie zu sogenannten SMC-Proteinen (Structural Maintenance of Chromosoms) nachweisen. Bei den Proteinen SMC-1 und SMC-3 ist eine Interaktion mit dem Retinitis pigmentosa-GTPase Regulator (*RPGR*) bekannt. *RPGR* ist ein Protein, dass in primären Zilien und Zentrosomen exprimiert ist und dessen Sequenzvariationen zur Retinitis pigmentosa führen können. *RPGR* interagiert direkt oder indirekt mit ziliären Proteinen wie *CEP290*, und diese bilden ein oder mehrere Proteinkomplexe. Diese Proteinkomplexe können die Genese, Instandhaltung und Funktion von Zilien regulieren und sind hierbei an regulatorischen Signalwegen beteiligt. Die Aufgaben dieser Domänen und ihre Bedeutung sind aktuell nicht geklärt [8; 24; 38; 39; 49; 58].

CEP290 wird als ein Protein beschrieben, dass an den Zentrosomen und an der Basis von primären Zilien und von Verbindungszilien lokalisiert ist (ziliäres und centrosomales Protein). Weiterhin ist es in den Basalkörpern, Zellkernen, pericentriolären Satteliten und Dendriten der Geruchsneuronen vorzufinden [5; 8; 13; 24; 31; 39; 47].

In der Niere ist *CEP290* in den Zentrosomen und Basalkörpern der zilientragenden Zellen lokalisiert sowie in den Photorezeptoren der Netzhaut in der Verbindungszilie zwischen dem inneren und äußerem Segment der Photorezeptoren [4; 8; 13; 31; 39; 43].

CEP290 ist evolutionär bis zu *Chlamydomonas reinhardtii* konserviert, wo es zwischen den äußeren Mikrotubulus-Dubletten und der Übergangszonenmembran gefunden wurde. Die Übergangszone befindet sich zwischen dem Basalkörper und dem Axoneme. Verbunden sind die Mikrotubulus-Dubletten mit der Membran der Übergangszone durch Faserproteine, die sich zum einen im Längsschnitt keilförmig und im Querschnitt Y-förmig verankern [5; 13; 43].

Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen können zu Defekten in den Y- und keilförmigen Verankerungen führen. Hierbei können viele der quer gerichteten Y-förmigen Verankerungen der Faserproteine fehlen. Die keilförmigen längs gerichteten Strukturen können nicht vorhanden oder

1. Einleitung

in Richtung Mikrotubulus-Dublette zusammengebrochen sein. Das wird dahin gedeutet, dass *CEP290*-Sequenzvariationen in der Übergangszone dazu führen, dass die Zilienmembran mit der Mikrotubulus-Dublette nicht mehr komplett verbunden ist [5; 13].

Das verbindende Zilium ist für den Austausch und Transport von Proteinen zwischen dem inneren und dem äußeren Segment notwendig (siehe 1.3. Die Zilien) [1; 3; 26; 40; 56]. Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen führen zur Anhäufung von Proteinen der Photorezeptoraußensegmente. Der fehlerhafte Abtransport der Proteine der Photorezeptoraußensegmente kann zur Apoptose der Photorezeptoren führen [4; 5; 8; 13; 31; 43]. Bei LCA-Patienten wurde beobachtet, dass Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen eine schnelle Verringerung der Außensegmente der Photorezeptoren hervorrufen. Weiterhin wurde eine Reduzierung der äußeren Körnerschichtdicke festgestellt. Ein wesentlicher Anteil der zentralen Zapfen der Photorezeptoren blieb jedoch erhalten [37].

Craige und Mitarbeiter stellten in ihren Untersuchungen fest, dass einige *CEP290*-Sequenzvariationen eine Abnahme des retrograden IFT-Transports in dessen Geschwindigkeit und Frequenz aufzeigten. Gesteuert wird der IFT-Transport durch einen heterotrimeren KIF3A-KIF3B-KAP-Komplex und einen homodimeren KIF17-Motor. Für das Ungleichgewicht beim Transport von molekularbiologischen Substanzen, bei Sequenzvariationen in *CEP290*, ist nicht nur der IFT-Transport ursächlich. Das Fehlen oder die Veränderungen innerhalb der Struktur der Mikrotubulumembranverankerungen (keil- und Y-förmige Verankerungen) führen ebenfalls zu einem Ungleichgewicht innerhalb des IFT-Transportes [5; 13; 43].

Craige schildert des weiteren den Transport von an der Phototransduktion beteiligten Proteinen wie Opsin, Rhodopsin und Arrestin. Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen können hier zu einem Ungleichgewicht der Proteine führen [13].

Der mikrotubulus-assoziierte Proteintransport erfolgt im Photorezeptor, vom inneren zum äußeren Segment und umgekehrt, über die Verbindungszilie. Weiterhin übernimmt das Zentrosom eine Vielzahl von Funktionen im Zellzyklus [4; 5; 8; 13; 39; 43]. Sequenzvariationen in *CEP290* können zum einen isolierte Erkrankungen wie Erblindung bei Netzhautdystrophien (LCA, RP, EOSRD), zum anderen ziliopathieassoziierte Syndrome (SLS, JBTS, MKS, BBS, Usher-Syndrom) hervorrufen, weil primäre Zilien auf den meisten Zelltypen des menschlichen Organismus zu finden sind und sich an den verschiedensten Zellprozessen beteiligen. Dadurch können Sequenzvariationen in centrosomalen/ziliären Proteinen wie *CEP290* Erkrankungen mit einer großen Vielfalt von phänotypischen Manifestationen verursachen [4; 5; 8; 10; 11; 12; 13; 14; 23; 31; 39; 43; 47].

Veränderungen in *CEP290* sind mit bis zu 22% der Patienten die häufigste Ursache für die isolierte LCA [4; 10; 11; 12; 13; 23; 37; 47]. Die Assoziation von *CEP290* mit weiteren krankheitsverursachenden Proteinen kann ursächlich für Variationen des Phänotyps sein [10; 11; 12; 13; 14; 18; 39].

In der Literatur werden Interaktionen von *CEP290* mit *RPGR*, *CC2D2A*, *ATF4* beschrieben.

1. Einleitung

CEP290 aktiviert hierbei ATF4-vermittelte Transkription. ATF4 ist an Prozessen wie der Linsen- (Linsenfaserzellendifferenzierung) und Skelettentwicklung beteiligt [8; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 39].

CC2D2A kodiert für eine coiled-coil- sowie für eine C2-Protein-Domäne. Es besteht eine strukturelle Ähnlichkeit mit *RPGRIP1* und *RPGRIP1L*. *CC2D2A* Sequenzvariationen stehen in Verbindung mit autosomal-rezessiv vererbter geistiger Retardierung, Retinitis pigmentosa, Nierenzysten und Ziliendysfunktion. In Zilien ist *CC2D2A* in Basalkörpern colokalisiert mit *CEP290* zu finden. *CC2D2A* interagiert mit *CEP290*. Phänotypisch sind in der Literatur ziliopathieassoziierte Syndrome beschrieben wie das Joubert-Syndrom [14; 18].

Die Interaktion zwischen *CEP290* und PCM-1 (pericentriolar material 1, Hauptkomponente zentriolärer Satelliten) weist auf eine Beteiligung des *CEP290* bei der Rekrutierung von zentrosomalen Proteinen und bei dem Aufbau der cytoplasmatischen Mikrotubulusstruktur hin. Weiterhin sind *CEP290* sowie auch PCM-1 notwendig für die ziliäre Lokalisierung von Rab8. Rab8 spielt eine wichtige Rolle bei der Biogenese der ziliären Membran, und reguliert *BBS*-Proteinkomplexe [11; 12; 14; 31; 39].

Weitere Assoziationen existieren mit *RPGRIP1*, *TMEM67*, *AHI1*, *NPHP1*, *NPHP4*, *CP110*, Dynactin Untereinheiten p150Glurd und p50-Dynamitin, Kinesin Untereinheit KIF3A, Kinesin assoziiertes Protein (KAP3) und Retinitis pigmentosa GTPase Regulator (RPGRORF15) [8; 11; 12; 14; 39].

Alle Mutationsformen wie frühzeitige Stopcodons, Missense-, Nonsense-Mutationen, Splice-Site- und Frameshift-Mutationen wurden beschrieben. Diese treten über das gesamte *CEP290*-Gen verteilt auf. Die meisten Frameshift-Mutationen werden durch Deletionen und Insertionen hervorgerufen [4; 12; 23; 24].

Die genaue Bedeutung von *CEP290* in der menschlichen Retina wie auch in primären Zilien ist noch nicht genau aufgeklärt. Die klinische Manifestation zeigt eine ausgeprägte Variabilität. In der Literatur sind unterschiedliche Organbeteiligungen mit verschiedenen Ausprägungen wie auch Überlappungen der Organbeteiligungen beschrieben [4; 5; 10; 12; 13; 39; 43].

Bisher konnte hierbei keine klare Korrelation zwischen dem Genotyp und dem Phänotyp festgestellt werden [4; 12; 39].

Die häufigste menschliche *CEP290*-Sequenzvariation ist eine intronische Sequenzvariation (Intron 26, c.2991 + 1655 A > G). Die Veränderung führt durch kryptisches Splicing zu einem Frameshift. Hierbei werden durch einen starken Splice-Donor 128 bp zwischen Exon 26 und Exon 27 eingefügt. Hieraus resultiert ein Stopcodon an der Aminosäure Cystein 998 [4; 12; 23; 24; 31; 39].

1.6. Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war die Genotypisierung von Patienten mit frühkindlichen Netzhautdegenerationen zur Korrelation des phänotypischen Spektrums mit Sequenzvariationen des *CEP290*-Gens.

Hierzu lagen DNA-Proben von 176 Patienten vor, die an frühkindlicher Netzhautdegeneration erkrankt waren. 21 Exone des *CEP290*-Gens und das Intron 26 wurden in diesen DNAs über eine Screeninguntersuchung bewertet. Patienten mit Sequenzvariationsnachweis in einem dieser Exone wurden auf Sequenzvariationen in den restlichen der insgesamt 54 Exone gescreent. Weiterhin erfolgte bei identifizierten Sequenzvariationen eine Segregationskontrolle über Blutsverwandte.

Für die identifizierten Sequenzvariationen wurde anhand der vorliegenden klinischen Daten eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1. Das Patientenkollektiv

Als Grundlage dieser Arbeit dienten 176 DNA-Proben von Patienten mit frühkindlichen Netzhautdegenerationen.

Die Erkrankungen der Patienten waren als Retinitis pigmentosa (RP, simplex oder autosomal rezessiv), Leber'sche Kongenitale Amaurose (LCA), Joubert-Syndrom (JS) und frühkindliche schwere Netzhautdegeneration (EOSRD) diagnostiziert worden. Die EOSRD schloß frühe Formen generalisierter degenerativer Netzhauterkrankungen wie die erbliche retinale Degeneration (IRD), Zapfen-Stäbchen-Degenerationen (CRD), Stäbchen-Zapfen-Degenerationen (RCD) und Makuladegenerationen (MD) ein. Die Unterscheidung von LCA und EOSRD war fließend. Unter gesicherter LCA wurden alle Patienten erfasst, die vor dem ersten Lebensjahr einen Visus von 0,1 und schlechter und Antworten im Elektroretinogramm (ERG) unter der Nachweisgrenze zeigten. Für Patienten mit EOSRD konnten Visus und ERG im ersten Lebensjahr entweder nur anamnestisch ermittelt werden oder der Visus lag über 0,1 und im ERG konnten Restantworten gemessen werden.

2.2. Materialnachweis

Die verwendeten Chemikalien wurden soweit möglich in p.A. Qualität eingesetzt.

Tabelle 1: Chemikalien

<u>Chemikalie</u>	<u>Summenformel</u>	<u>Artikelnummer</u>	<u>Hersteller</u>
LE Agarose	$C_{12}H_{18}O_9$	870093	Biozym (Hess. Oldendorf)
Ammoniumperoxidisulfat	$H_8N_2O_8S_2$	001201-0500	Merck (Darmstadt)
Ammoniumchlorid	NH_4Cl	K298.1	Carl Roth GmbH & Co-KG (Karlsruhe)
EDTA 2Na 2*H ₂ O (Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat)	$C_{10}H_{16}N_2O_8$	8043.2	Carl Roth GmbH & Co-KG (Karlsruhe)
Essigsäure abs.	CH_3COOH	3738.2	Carl Roth GmbH & Co-KG (Karlsruhe)
Ethanol 99,8% vergällt mit 1% MEK	H_5C_2OH	K928.4	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid 1% Lösung	$C_{21}H_{20}BrN_3$	11608.0030	Merck (Darmstadt)
Glycerin > 98% Ph. Eur. wasserfrei	$C_3H_8O_3$	7530.1	Carl Roth GmbH & Co-KG (Karlsruhe)
LC-Green I		BCHM-ASY-005	BIOKE (Leiden NL)
Natriumhydrogencarbonat Nukleotide	$NaHCO_3$	1.06329-0500	Merck (Darmstadt)

2. Material und Methoden

dATP (100 µmol)	$C_{10}H_{16}N_5O_{12}P_3$	RO 142	MBI Fermentas
dCTP (100 µmol)	$C_9H_{16}N_3O_{13}P_3$	RO 152	(St. Leon-Rot)
dTTP (100 µmol)	$C_{10}H_{17}N_2O_{14}P_3$	RO 172	
dGTP (100 µmol)	$C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$	RO 162	
Paraformaldehyd	CH_2O	UN2213	Merck (Darmstadt)
Rotiphorese Gel 40 (19:1)		3030.1	Carl Roth GmbH & Co-KG (Karlsruhe)
Salpetersäure 65%	HNO_3	1.00456.2500	Merck (Darmstadt)
Silbernitrat	$AgNO_3$	7908.1	Carl Roth GmbH & Co-KG (Karlsruhe)
TEMED 89% (N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin)	$C_6H_{16}N_2$	2367.01	Carl Roth GmbH & Co-KG (Karlsruhe)
TRIS (Trishydroxymethyl- aminoethan)	$C_4H_{11}NO_3$	4855.3	Carl Roth GmbH & Co-KG (Karlsruhe)

Tabelle 2: Biochemikalien

<u>Marker</u>	<u>Artikelnummer</u>	<u>Hersteller</u>
Gene Ruler 100 bp DNA Ladder	SM0321	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
GoTaq DNA Polymerase 5u/µl	6082744330, M500B	Promega GmbH (Mannheim)

Tabelle 3: Papier

	<u>Artikelnummer</u>	<u>Hersteller</u>
Chromatography Paper 3 MM Chr 46x57 cm	3030917	Biometra Whatman (Göttingen)

Tabelle 4: Stammlösungen

<u>Stammlösung</u>	<u>Zusammensetzung</u>
10x TBE-Puffer: (Tris-Borat-EDTA-Puffer)	1 M Tris: 121,1 g/l 0,83 M Borsäure: 51,36 g/l 10 mM EDTA 2Na 2*H ₂ O: 3,72 g/l pH 8 ad 1 l ddH ₂ O
1x TE-Puffer: (Tris-EDTA-Puffer)	10 mM Tris 5 mM EDTA 2Na 2*H ₂ O pH 8 ad 100 ml ddH ₂ O
40% Rotiphorese-Acrylamidmischung	100 ml Gellösung
10% Polyacrylamidgel	10 ml 10xTBE 56,7 ml dH ₂ O

2. Material und Methoden

10% Polyacrylamidgel mit Glycerin	33,3 ml Rotiphorese 30%
	10 ml 10xTBE
	51,7 ml dH ₂ O
6% Polyacrylamidgel	33,3 ml Rotiphorese 30%
	5 ml Glycerin
	10 ml 10xTBE
	70 ml dH ₂ O
6% Polyacrylamidgel mit Glycerin	20 ml Rotiphorese 30%
	10 ml 10xTBE
	65 ml dH ₂ O
	20 ml Rotiphorese 30%
8% Polyacrylamidgel	5 ml Glycerin
	10 ml 10xTBE
	63,3 ml dH ₂ O
8% Polyacrylamidgel mit Glycerin	26,7 ml Rotiphorese 30%
	10 ml 10xTBE
	58,3 ml dH ₂ O
	26,7 ml Rotiphorese 30%
	5 ml Glycerin
dNTP-Mischung	je 12,5 µl 100 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
	In 950 µl 1x TE-Puffer

Tabelle 5: Kits

<u>Kit</u>	<u>Artikelnummer</u>	<u>Firmensitz</u>
Nucleospin Extract II	740609.250	Macherey-Nagel (Düren)

Tabelle 6: Primer der ersten Screeningserie

<u>Primername</u>	Sequenz	Produkt (bp)	Fragment
CEP2-3a	GTAAGGTGCTAGAAAACCAATAATACTGTG	557	Exon 2 bis 3
CEP2-3b	GGTGATGTAGATATTACCAGGTATTTTCAC		
CEP4-5a	GTGCTTACATTCCAGTATAAAGGCATATTG	510	Exon 4 bis 5
CEP4-5b	TGACAATTACATCCTAGGGAATACAAAA		
CEP10a	GGCTGCGTTTTAATTTTAATTTGGT	372	Exon 10
CEP10b	GACAGACAAAAATTCACATCCTAGAAAA		
CEP16-17c	TGCAGCTTATTTGAATGTTTTTAAGT	370	Exon 16 bis 17
CEP16-17d	CCAGACAACCTCACTTATCAATAATTCTTTT		
CEP21c	ACTATGATTTTACTGTTTTTCTCCACATTT	334	Exon 21
CEP21d	GAATTAATTCAAGGGGCATTTTCT		
CEP22a	CATATCTGTCAATTTGTCTTTCTTTGGG	282	Exon 22
CEP22b	CTACCAATGATTTTTGTTATTCACATGTAA		
NP6-i26a	AGAGATGGGGTTTCACCTTGTTAGC	245	Intron 26
NP6-i26b	TGTGGCAGTAAGGAGGATGTAAGAC		
CEP28a	ACAGCATGAGATTGACTTAAATATTATTGC	334	Exon 28
CEP28b	GAGATCCAGACAAACCACTTAACAATAA		
CEP31a	TTCACTGGAAAAATTTGAACTTACTACA	603	Exon 29
CEP31b	GGAGTTCCAGCTATGTTTGCACC		
CEP32a	CAACTGGCATATGAAAATAGAAGAACTTCG	250	Exon 30
CEP32b	AGTCTGGGCGACAGAGTGAGACT		
CEP35a	GATGAAGCATTTTAAAGGGAAA	423	Exon 31
CEP35b	CAAGAAAAGAAATACCACTTTAGGG		
CEP36a	GGAATTTTAGAAGATTGAAGAGAAAA	290	Exon 32
CEP36b	TTCCAAAAAAGAAGAGAGCTGA		
CEP37a	GCATTGAATTATACATGCCTATTGC	325	Exon 37
CEP37b	GGCATAGCAAACACTTATGTTTATCTTC		
CEP40-41a	TTCTGTTTTATGTTCCTTTTATCATTG	816	Exon 40 bis 41
CEP40-41b	TGTCACCTTAAGCATATAAGTCAGT		
CEP42-43a	AAATAACACTGGTAATTTTCCTACCTCC	724	Exon 42 - 43
CEP42-43b	CCAGTTTTTCATTACAATGGGTG		
CEP46a	TGTTTGCCTTTTCTTTTCAATGGC	196	Exon 46
CEP46b	CTGCTGAAACCAAAACAATGTATGGTA		
CEP54a	TTACAATTAAATCTCCTTGTTCAAAC	389	Exon 54
CEP54b	GGAGAACTGCTTATTTCCAAGTATA		

Tabelle 7: Primer der zweiten Screeningserie

Primername	Sequenz	Produkt (bp)	Fragment
Cp6a	GTTGTTGACTCATTTGAACCTCAA	260	Exon 6
Cp6b	GCCAGGTAACCTTGAACAGTGAAGAT		
Cp7a	TCGCACCACTGTACTCCAGCCTA	274	Exon 7
Cp7b	CAGTACTTAGAAGACTCCAGTCCTGG		
Cp8-9a	CCTTCTCATTTCTAATTACCGTTTTCC	439	Exon 8 bis 9
Cp8-9b	CAGGGAATTTACATGTAGGGCTAAATA		
Cp11a	GTTACATCAGTTTGCAACAACCTTG	173	Exon 11
Cp11b	AAAAAGAAAAAGTTATTATGTCAATTGAAA		
Cp12a	TGATAATGAAGAATGTTTTATTAACTTTCC	222	Exon 12
Cp12b	CTGGTTGATAAACAAAATTCTGTTAAGA		
Cp13a	CAAATGGTAAAAGGCATACTTGTACC	361	Exon 13
Cp13b	GAGAAAACCAATATTGACTTGACATTTT		
Cp14a	ACCATGTTGGGATCACTGATTTGA	269	Exon 14
Cp14b	GGAATGTTTTTAAATGGTATGCAG		
Cp15a	GGCATATGTACATTTTCTTTAGACTTA	384	Exon 15
Cp15b	GCATTTGAAAAAAGCATTAACTACTTAAT		
Cp18a	GTGTTGGAATAGTAGGAGGGTTATTTT	255	Exon 18
Cp18b	AGACAGAGCGAGACTCCGTCTC		
Cp19-20a	TGAAAATTATAGACTTGTGATATTTTGTG	883	Exon 19 bis 20
Cp19-20b	GAAAATCTCTCTAAAGTGATAGGGGAA		
Cp23a	GTGTTGCTTACAGATTTGGTGACTT	346	Exon 23
Cp23b	GAAGAAGAAGGGAAGAACAAAACAT		
Cp24-25a	CTATGATACCTCTTGTGTTGAGAAAAC	607	Exon 24 bis 25
Cp24-25b	ACCATCCTATCTTCTGCATATTTGA		
Cp26a	TGGCTAGTGCTTGACCAGAAAA	285	Exon 26
Cp26b	TGAAGAAAAATGGCTAATTTACAA		
Cp27a	AATGTCATTTTGTGGTATTGGTCTG	283	Exon 27
Cp27b	GTCAAATACTTCTTTTAACTAGCATAA		
Cp30a	GAATTTTGGCATTACTTAGAAAAGTGT	244	Exon 30
Cp30b	CTCCAACATCTAATGTAATTTAGGGA		
Cp33-34a	GCCTGTTATGTGCCTGATGTCT	616	Exon 33 bis 34
Cp33-34b	TCATTCTATGCATTGCCCTCAT		
Cp38a	CGAGATTGCGCTGCTGCACT	385	Exon 38
Cp38b	AATCTTCTCTAAAAGCAATCTACCACA		
Cp39a	ATTCATATAAAATGTCAGTTTTCTTTAAA	335	Exon 39
Cp39b	GTGTGTGTCTATGTCTAGCCACCA		
Cp44a	GTACAACAGAAAAAAGATGAAATGTGA	238	Exon 44
Cp44b	CTTTCATGCATTTTAACATGGAAA		
Cp45a	TCCAGTATGTCTTTTATGGCTTTTATT	256	Exon 45
Cp45b	CTAAGGAAGGAGTTTTAGGCATTAGA		
Cp47a	CCTGTTGTATTGTTGGTACTTCGTATT	282	Exon 47
Cp47b	CGTAAAATATCCCCTAAAATGATCA		
Cp48a	ATAAGATTATCTTTTATTTCTTTGTTTTGA	256	Exon 48
Cp48b	CAGTTTTTCCAAGAGGTATTAAGTAAAT		
Cp49a	AGCCCAGGTTATTTTTGTTTTCCAAT	372	Exon 49
Cp49b	CAGGTTATCCAGAATAGTGTGTCTTT		
Cp50a	AAATCAGTGACATAAATTATTTGCCA	257	Exon 50
Cp50b	GGAACATCTTGCGATATTATGCATT		
Cp51a	GCCTATGCGTGCTTTTGA	285	Exon 51

2. Material und Methoden

Cp51b	GTCTCTAGTTGTAGCAATTCGGAGTAT		
Cp52a	TTCTAGATTAGCTAATCATCAGCTGGA	230	Exon 52
Cp52b	CCAAAGCTTATCAGGAATTCGATTT		
Cp53a	CCATTACCTTGAAGCTCATTGCGTAGTG	190	Exon 53
Cp53b	ACAGCTGTTTTACAAAACGATACT		
Cp29a	CCTCACCAAAAATTGATGTATCTGA	288	Exon 29
Cp29b	GAATTGTATACCTGTAATTGGGTTTCTT		

Tabelle 8: Plastikwaren

<u>Pipettenspitzen</u>	<u>Artikelnummer</u>	<u>Firmensitz</u>
Pipettenspitzen 10 µl, farblos	720031	Biozym (Hess. Oldendorf)
Pipettenspitzen 1000 µl, blau	721020	Biozym (Hess. Oldendorf)
Pipettenspitzen 2500 µl, farblos	722501	Biozym (Hess. Oldendorf)
Kapillarspitzen 200 µl, farblos	929011	Biozym (Hess. Oldendorf)
Pipettenspitzen 200 µl	4844	Corning (Schiphol-Rijk, NL)
Pipettenspitzen 5 ml, einzeln	G-224-2	Brandt (Wertheim)
Pipettenspitze, konduktiv, 50µl	750215	Biozym (Hess. Oldendorf)
Pipettenspitze, konduktiv, 200µl	750225	Biozym (Hess. Oldendorf)
Reagiergefäß 0,2 ml, einzeln	711080	Biozym (Hess. Oldendorf)
PCR Softstrips 0,2 ml, farblos	711070	Biozym (Hess. Oldendorf)
Reagiergefäß 0,5 ml, einzeln	72699	Sarstedt (Nümbrecht)
Reagiergefäß 1,5 ml, einzeln	72690001	Sarstedt (Nümbrecht)
Reagiergefäß 2 ml, einzeln	72695500	Sarstedt (Nümbrecht)

2.3. Instrumenten- und Gerätenachweis

Tabelle 9: Instrumente und Geräte

<u>Pipetten</u>	<u>Artikelnummer</u>	<u>Hersteller</u>
Variable Pipette Reference 1 - 10 µl		Eppendorf (Hamburg)
Variable Pipette Reference 2 - 20 µl		Eppendorf (Hamburg)
Variable Pipette Reference 10 - 100 µl		Eppendorf (Hamburg)
Variable Pipette Reference 100 - 1000 µl		Eppendorf (Hamburg)
Transferpipette S-8; 0,5 - 10 µl		Brandt (Wertheim)
Transferpipette S-8; 5 - 50 µl		Brandt (Wertheim)
Transferpipette S-12; 0,5 - 10 µl		Brandt (Wertheim)
Transferpipette S-12; 5 - 50 µl		Brandt (Wertheim)
Transferpipette S; 0,5 - 5 ml		Brandt (Wertheim)
Multipipette stream		Eppendorf (Hamburg)
Gelausstecher	611001	Biozym Scientific GmbH (Oldendorf)
Pipettierroboter Freedom Evo 75, 2-Kanal	14082320	Tecan (Crailsheim)

2. Material und Methoden

Feinwaage	PA2102	OHAUS, Pine Brook, (USA)
<u>Zentrifugen</u>		
Sigma Zentrifuge 1-15PK		Sigma GmbH (Osterode)
Rotor: 24x2 ml	15300	
Sigma Zentrifuge 4K15		Sigma GmbH (Osterode)
Rotor: Festwinkel	12169	
Ausschwingrotor	11150	
Becher	13350	
Mikrotiterplatteneinsatz	13220	
Mini Centrifuge MCF-2360		LMS CO., LTO, (Tokyo)
<u>Schüttler</u>		
Heizschüttler RCT classic	01.632173	IKA Werke (Staufen)
WT 17		Biometra Whatman (Göttingen)
LAB Dancer S 40	01.627374	VWR (Darmstadt)
<u>Thermocycler</u>		
T Professional Basic Gradient		Biometra Whatman (Göttingen)
T Personal		Biometra Whatman (Göttingen)
Realplex und Mastercycler ep gradient S		Eppendorf (Hamburg)
<u>Agarose Gelkammern</u>		
Compact XS/S	070610001	Biometra Whatman (Göttingen)
Compact M	070610001	Biometra Whatman (Göttingen)
Compact L/XL	070610001	Biometra Whatman (Göttingen)
<u>Spannungsgeräte für Elektrophorese</u>		
Power Pack P 25		Biometra Whatman (Göttingen)
PS 305 T		Biometra Whatman (Göttingen)
PS 9009		Biometra Whatman (Göttingen)

2. Material und Methoden

Geldokumentation

Transilluminator Bio Doc Analyse

Biometra Whatman
(Göttingen)

Polyacrylamidgelelektrophoresekammern

Multigel long

Biometra Whatman
(Göttingen)

Maxigel

Biometra Whatman
(Göttingen)

Kühlthermostat

EH + F 12

Julabo (Selbach)

TB2 Thermoblock

Biometra Whatman
(Göttingen)

Bioline TM HTI

Höller und Hüttner AG
(Tübingen)

Dryer Mididry Typ D62

Biometra Whatman
(Göttingen)

Bio Photometer 8,5 mm

Eppendorf (Hamburg)

Präzisions-Küvette 10 mm x 8,5 mm

105.210-QS

Hellma Analytics (Müllheim)

2.4. Methoden

2.4.1. Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR stellte die Basis der Labortätigkeiten dieser Arbeit dar.

Sie ist ein Verfahren, mit dem ein bestimmter DNA-Abschnitt millionenfach amplifiziert werden konnte. Die Abläufe der Amplifikation ähneln den Reaktionsabläufen der natürlichen Replikation. Ein vorteilhafter Aspekt hierbei war die Möglichkeit, die PCR mit sehr geringer Menge an Patienten-DNA durchzuführen [25; 29; 42; 48; 59; 63].

Wie bei der Replikation synthetisierte eine DNA-Polymerase einen neuen DNA-Strang an einer einzelsträngigen Nukleinsäurematrize (Template-DNA). Dies erfolgte ausgehend von Startermolekülen. Als Startermoleküle wurden synthetische DNA-Oligonukleotide verwendet (einzelsträngige DNA-Primer mit 20 - 30 Nukleotiden Länge (Tabelle 6 und 7), die an die einzelsträngig vorliegende Template-DNA hybridisiert wurden. Die Primer waren komplementär zu den beiden Enden der zu amplifizierenden einzelsträngigen DNA-Sequenz. Von dem 3'-Ende der Primer aus synthetisierte eine hitzestabile DNA-Polymerase den neuen DNA-Doppelstrang [25; 29; 42; 48; 59; 63].

Eine PCR erfolgte in einem sich 35 mal wiederholenden Zyklus. Jeder Zyklus bestand aus einem Denaturierungs-, einem Annealing- und einem Elongationsschritt. Begonnen wurde mit einer thermischen Denaturierung des zu amplifizierenden DNA-Doppelstranges. Hierbei wurde dieser bei 94°C aufgeschmolzen und es entstand einzelsträngige Template-DNA. An die einzelsträngige Template-DNA wurden anschließend die Primer hybridisiert (Annealing). Bei welcher Temperatur das Annealing durchgeführt wurde, war abhängig vom Temperaturoptimum des jeweiligen Primer-Paares. Dieses wurde über eine Gradienten-PCR für jedes Primerpaar ermittelt. Im Anschluss wurde die Temperatur auf 72°C, dem Temperaturoptimum der hitzestabilen Polymerase, erhöht. Es erfolgte die Amplifikation des gewünschten Sequenzabschnittes (Elongation). Durch die Verwendung der hitzestabilen Polymerase wurde eine kontinuierliche Durchführung der PCR, ohne zusätzliche neue Enzymzugabe pro Zyklus, ermöglicht. Durch die Wiederholung der Zyklen fand eine exponentielle Vermehrung der gewünschten Sequenz statt [25; 29; 42; 48; 59; 63].

Im Anschluss an die PCR erfolgte zur Überprüfung der Amplifikate eine elektrophoretische Auftrennung auf einem Agarosegel.

Protokoll PCR-Ansatz:

Ein PCR-Ansatz wurde wie folgt pipettiert:

DNA-Probe (20 ng/μl)	5 μl
----------------------	------

Reaktionsmix:

Reaktionspuffer	5 μl
-----------------	------

MgCl ₂ (25 mM)	2 μl
---------------------------	------

dNTP-Mischung (1,25 mM)	4 μl
-------------------------	------

Primer a (10 pmol/μl)	1 μl
-----------------------	------

Primer b (10 pmol/μl)	1 μl
-----------------------	------

dd H ₂ O	7 μl
---------------------	------

<u>Taq-Polymerase</u>	<u>0,1 μl</u>
-----------------------	---------------

25,1 μl

Die angegebenen Bestandteile wurden in 0,2 ml Reaktionsgefäßen pipettiert. Anschließend erfolgte eine Durchmischung des Ansatzes auf einem Schüttler. Nach einer kurzen Zentrifugation wurden die Reaktionsgefäße im Thermocycler platziert und das primerspezifische Programm gestartet.

2.4.2. Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren und deren Nachweis

Zur Auftrennung von Nukleinsäuren wurden Gelelektrophoresen durchgeführt. Nukleinsäuren enthalten geladene Gruppen. Diese Ladung ermöglicht die Bewegung im elektrischen Feld (von der Kathode zur Anode) [29; 42; 61; 63].

Gelelektrophoresen stellen trägergebundene Systeme dar. Als Trägermatrix wurden Agarose oder Polyacrylamid gewählt. Die Trägermatrix stabilisierte die wässrige Trennphase und bildete, aufgrund seiner physikalischen Eigenschaften (dreidimensionale Netzstruktur, Porengröße), mikroskopische Poren in der Größenordnung der zu trennenden Teilchen aus. Dies erzeugte einen Siebeffekt des Gels. Dadurch konnten sich die Nukleinsäuren aufgrund ihrer Größe, bei gleicher Ladung, im elektrischen Feld unterschiedlich schnell bewegen und wurden je nach ihrer Größe aufgetrennt [29; 42; 59; 61; 63].

Die elektrophoretische Beweglichkeit von geladenen Teilchen ist abhängig von der Ladung der Nukleinsäuren; der Größe und Gestalt der Nukleinsäuren; der Porengröße der Trägermatrix; dem pH-Wert, Temperatur und Ionenstärke des verwendeten Puffers und der benutzten elektrischen Feldstärke [29; 42; 59; 61; 63].

Agarose- wie auch Polyacrylamidgele können zur Analyse und zur präparativen Isolierung von Nukleinsäuren dienen [29; 42; 61; 63].

2.4.2.1. Die Agarose-Gelelektrophorese

Agarose (ein lineares Polysaccharid) wird aus Seetang (roten Meeresalgen) gewonnen [61].

Die Agarose-Gelelektrophorese stellt eine Standardmethode zur Trennung, Identifizierung und Reinigung von DNA-Fragmenten (0,5 - 25 kb Länge) dar. In dieser Arbeit wurde sie verwendet, um die PCR-Produkte auf Größe und Reinheit zu überprüfen und um die Templates für die Sequenzierung (Abschnitt 2.4.2.5. Sequenzierung) vorzubereiten [29; 42; 59; 61; 63].

In der durchgeführten Agarose-Gelelektrophorese wurden 2 %ige Agarose-Gele verwendet. Hier zeigte sich eine gute Trennung der DNA-Fragmente mit einer Fragmentlänge von 0,1 bis 2 kb [29; 42; 63].

Protokoll Agarosegel-Ansatz:

Ein Agarosegel-Ansatz setzte sich zusammen aus:

50 ml Gel (verwendete Kämme: max. 20 Slots):

1 g Agarose

50 ml 1x TBE-Puffer

10 µl 1% Ethidiumbromid

Laufbedingungen: 45 min bei 100 Volt

100 ml Gel (verwendete Kämme: max. 50 Slots):

2 g Agarose

100 ml 1xTBE-Puffer

15 µl 1% Ethidiumbromid

Laufbedingungen: 60 min bei 100 Volt

250 ml Gel (verwendete Kämme: max. 208 Slots):

5 g Agarose

250 ml 1xTBE-Puffer

20 µl 1% Ethidiumbromid

Laufbedingungen: 90 min bei 120 Volt

Die Agarose wurde in einen Erlenmeyerkolben abgewogen und mit 1xTBE-Puffer versetzt. Der Erlenmeyerkolben wurde mit Aluminiumfolie abgedeckt und das Gemisch in der Mikrowelle aufgekocht (700 W 1 min), um die Agarose zu lösen. Das hierbei verdampfte Wasser wurde danach wieder hinzu gegeben und auf dem Schüttler vermengt. Nachdem die gelöste Agarose auf 37 - 40 °C abgekühlt war, wurde sie mit Ethidiumbromid versetzt und luftblasenfrei in den jeweiligen Gelträger gegossen. In das flüssige Gel wurden die Kämme eingesetzt. Nach Aushärten des Gels wurde der Gelträger in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit 1xTBE-Puffer

2. Material und Methoden

überschichtet. Die Kämme wurden senkrecht nach oben entfernt. In den ersten Slot jeder Reihe wurde ein DNA-Marker (Gene Ruler 100 bp DNA Ladder) zur Bestimmung der Fragmentgröße pipettiert. In die weiteren Slots wurden die PCR-Produkte (10 µl) eingebracht. Die Gelelektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur und den jeweiligen oben genannten Laufbedingungen. Nach beendeter Gelelektrophorese wurde das Agarosegel aus der Kammer entnommen und in den Transilluminator Bio Doc Analyser platziert. Mit Hilfe von UV-Licht konnten die aufgetrennten DNA-Banden dargestellt und fotodokumentiert werden.

2.4.2.2. DNA-Färbung im Agarosegel mit Ethidiumbromid

Eine Möglichkeit, DNA im Agarosegel sichtbar zu machen, war die Färbung des Gels mit Ethidiumbromid, einem roten Phenanthridin-Farbstoff. Ethidiumbromidmoleküle interkalieren zwischen die Basen der DNA. Dadurch veränderte sich das Anregungsspektrum des Ethidiumbromid. Seine Fluoreszenz gegenüber freiem Ethidiumbromid in Lösung wurde erhöht. Ultraviolettes Licht (254 - 260 nm) wurde von den Nukleinsäureketten absorbiert und an Ethidiumbromid weitergeleitet. Dadurch leuchteten im Agarosegel die Stellen hell auf, an denen sich Nukleinsäuren befanden. Die Lichtintensität war proportional zur vorliegenden DNA-Konzentration im Agarosegel und zur Länge der Nukleinsäuren (je kleiner die Moleküle desto geringer die Fluoreszenzverstärkung und Abbildung) [29; 42; 59; 61; 63; 76; 78].

2.4.2.3. Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP)

Die SSCP (deutsch: Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus) basierte auf der Polymerase-Kettenreaktion. Durch die Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse konnten die DNA-Fragmente (nach PCR-Amplifikation) auf mögliche Sequenzvariationen gescreent werden [42; 48; 63; 74].

Die SSCP beruht darauf, dass DNA-Einzelstränge aufgrund ihrer Basensequenz eine bestimmte Konformation einnehmen. Schon die Änderung einer einzelnen Base kann zu einer Konformationsänderung führen. Die Sequenzunterschiede führen zu einem veränderten Laufverhalten in der Elektrophorese und können durch das veränderte Bandenmuster im SSCP-Gel dargestellt werden [42; 48; 63; 74].

Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Einzelstränge ist abhängig von der Konformation der DNA, Art der Gelmatrix, dem verwendeten Puffer und der Temperatur [29; 48; 61; 63; 74].

Die Durchführung der Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse gliederte sich in folgende Schritte:

- Herstellung der PCR-Amplifikate und versetzen mit Probenauftragspuffer
- denaturieren der doppelsträngigen DNA in Einzelstrang-DNA durch Erhitzen
- anschließend abkühlen

2. Material und Methoden

auftrennen der Einzelstrang-DNA durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese
Visualisierung der DNA-Banden durch Silberfärbung [29; 42; 63; 74].

Ein Vorteil der SSCP ist, dass sie ein sehr sensitives Verfahren beim Screening auf Sequenzvariationen darstellt. Nachteilig zeigt sich, dass bei PCR-Amplifikaten, die länger als 300 bp waren, die Sensitivität nachließ [42; 48; 63].

PCR-Produkte mit einer großen Anzahl Basenpaare haben eine langsamere Laufgeschwindigkeit. Sie benötigen eine längere Laufzeit für eine bessere Aufspaltung. DNA-Amplifikate mit einer kleineren Basenpaaranzahl haben eine schnellere Laufzeit und benötigen eine stärkere Gellmatrix [29; 42; 63].

In dieser Arbeit wurden 10%ige Gele mit 6%igem Sammelgel und 8 %ige SSCP-Gele hergestellt und verwendet. Welches Gel eingesetzt wurde, war abhängig von der Anzahl der Basenpaare des untersuchten PCR-Produktes. Um die Konformationsänderungen im SSCP-Gel optimal darzustellen, wurden die Gelgrößen, der Laufpuffer (0,5 oder 1 x TBE), die Spannung [V], der Stromfluß [mA] und die Laufzeit variiert. Jedes PCR-Produkt wurde in einem SSCP-Gel ohne Glycerinzusatz und in einem SSCP-Gel mit Glycerinzusatz untersucht. PCR-Produkte über 330 bp wurden auf 8%igen Gelen und PCR-Produkte unter 330 bp auf 10%igen Gelen aufgetrennt.

Tabelle 10: verwendete SSCP-Gele

<u>Primerpaar</u>	<u>Anzahl der Basenpaare</u>	<u>SSCP-Gel</u>
10 ab	372 bp	8% und 10% + 6%
16/17 cd	370 bp	8% und 10% + 6%
21 cd	334 bp	8% und 10% + 6%
22 ab	282 bp	10% + 6%
28 ab	334 bp	8% und 10% + 6%
32 ab	250 bp	10% + 6%
35 ab	423 bp	8%
36 ab	290 bp	10% + 6%
37 ab	325 bp	10% + 6%
46 ab	196 bp	10% + 6%
54 ab	389 bp	8% und 10% + 6%
l26 ab	245 bp	10% + 6%

Protokoll SSCP-Gel-Ansatz:

SSCP-Puffer:

1 ml Formamid (deionisiert)
100 ml 1% Bromphenolblau
100 ml 1% Xylene-cyanol
20 ml 0,5 M Na⁺ EDTA
pH 8

Ein SSCP-Gel-Ansatz setzte sich zusammen aus:

Sammelgel 10% und 6%

20 ml Ansatz 10% (verwendete Kämme: max. 24 Slots):

15 ml PAA 10% in TBE ohne bzw. mit Glycerin
15 µl TEMED
150 µl APS 10%

und

20 ml Ansatz 6% Gel (verwendete Kämme: max. 24 Slots):

5 ml PAA 6% in TBE ohne bzw. mit Glycerin
5 µl TEMED
50 µl APS 10%

45 ml Ansatz 10% Gel (verwendete Kämme: max. 36 Slots):

35 ml PAA 10% in TBE ohne bzw. mit Glycerin
35 µl TEMED
350 µl APS 10%

und

45 ml Ansatz 6% Gel (verwendete Kämme: max. 36 Slots):

10 ml PAA 6% in TBE ohne bzw. mit Glycerin
10 µl TEMED
100 µl APS 10%

20 ml Ansatz 8% Gel (verwendete Kämme: max. 24 Slots):

20 ml PAA 8% in TBE ohne bzw. mit Glycerin
20 µl TEMED
200 µl APS 10%

40 ml Ansatz 8% Gel (verwendete Kämme: max. 36 Slots):

40 ml PAA 8% in TBE ohne bzw. mit Glycerin
40 µl TEMED
400 µl APS 10%

Die Laufbedingungen variierten:

- im Stromfluß
- der Laufzeit
- der Spannung
- dem TBE-Laufpuffer

Tabelle 11 (SSCP-Gele: Laufbedingungen, Laufzeit in Abhängigkeit Exon/Intron) fasst die verwendeten Laufbedingungen der SSCP-Elektrophorese zusammen.

Tabelle 11: SSCP-Gele: Laufbedingungen, Laufzeit in Abhängigkeit Exon/Intron

Gel	Laufbedingungen	Laufzeit (Stunden/Minuten)	Exon/Intron
10% + 6%, Maxigel	1xTBE, 1200V, 30mA, 40W	14 h/840 min	Exon 22, Exon 32, Exon 46
10% + 6%, Maxigel	1xTBE, 1200V, 40mA, 40W	15 h/900 min	Exon 22
10% + 6%, Maxigel	1xTBE, 1200V, 35mA, 40W	16 h/960 min	Exon 16/17, Exon 21, Exon 22, Exon 54, Intron 26
10% + 6%, Maxigel	1xTBE, 1200V, 45mA, 40W	18,16 h/1090 min	Exon 10, Exon 54
10% + 6%, Maxigel	1xTBE, 1200V, 35mA, 40W	20 h/1200 min	Exon 10, Exon 28
10% + 6%, Multigel-long	0,5xTBE, 150V	12 h/720 min	Exon 32
10% + 6%, Multigel-long	1xTBE, 160V	12 h/720 min	Intron 26
10% + 6%, Multigel-long	1xTBE, 200V	14 h/840 min	Exon 22
10% + 6%, Multigel-long	1xTBE, 150V	14,3 h/ 860 min	Exon 36, Exon 37
10% + 6%, Multigel-long	1xTBE, 150V	16 h/960 min	Exon 22, Exon 54
8%, Maxigel	1xTBE, 1200V, 45mA, 40W	11 h/660 min	Exon 54
8%, Maxigel	0,5xTBE, 1200V, 45mA, 40W	12 h/720 min	Exon 54
8%, Maxigel	0,5xTBE, 1200V, 45mA, 40W	14 h/840 min	Exon 54
8%, Maxigel	1xTBE, 1200V, 30mA, 40W	14 h/840 min	Exon 10, Exon 28
8%, Multigel-long	0,5xTBE, 200V	14 h/840 min	Exon 10, Exon 16/17, Exon 21, Exon 35
8%, Multigel-long	1xTBE, 200V	14 h/840 min	Exon 35

Für ein SSCP-Gel wurden zwei Glasplatten benötigt, welche vor dem Zusammensetzen mit Ethanol gründlich gereinigt werden mussten. Die Glasplatten wurden nach Herstellerbeschreibung zu einer Gelkassette zusammengesetzt.

Die Inhaltsstoffe des Polyacrylamidgeles (wie oben aufgelistet) wurden in einen Erlemeyerkolben

2. Material und Methoden

gemischt. Danach wurde das flüssige Gel in die Gelkassette luftblasenfrei gegossen und mit einem Kamm (mit gewünschter Taschenanzahl) versehen. Bei der Verwendung von 10% + 6% Gel erfolgte zuerst das Giessen des 10% Trenngels. Das 6% Sammelgel wurde auf das Trenngel gegossen, nachdem dieses ausgehärtet war. Nach Aushärten des Geles wurde überschüssige Gelmasse, der Kamm und die Silikondichtung entfernt und die Gelkassette in die Elektrophoreseapparatur eingebaut. Das Polyacrylamidgel wurde mit Laufpuffer versetzt und die Geltaschen gereinigt.

1 µl PCR-Produkt wurde mit 6 µl Laufpuffer in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß gemischt und bei 94 °C für 10 min in einem Heizblock denaturiert. Danach wurde der Probenansatz sofort in eine Zentrifuge gegeben und für 5 min bei 4 °C abgekühlt und zentrifugiert. Nach dem Abkühlen wurde die Probe in die vorgesehene Tasche des Gels pipettiert und die Elektrophorese nach oben genannten Bedingungen gestartet.

2.4.2.4. Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Die Visualisierung der entstandenen DNA-Bandenmuster in den Polyacrylamidgelen erfolgte mit der Silberfärbung.

Hierbei entstand ein Komplex zwischen den Silberionen und den Seitenketten der DNA. Die DNA-Banden stellten sich braun bis schwarz dar. Gestoppt wurde die Reaktion durch Essigsäure bei ausreichender Kontrastierung. Die Silberfärbung ist ein sensitiver Nachweis für Proteine und Nukleinsäuren [29; 42; 61; 63].

Protokoll Silberfärbung:

10% Ethanol:

90 ml dH₂O absolut

10 ml Ethanol abs.

1% Salpetersäure:

15,4 ml konz. Salpetersäure (65%)

984,6 ml dH₂O

Ablauf der Silberfärbung:

Fixierer: 10% Ethanol (absolut vergällt)

Oxidierer: 1% Salpetersäure (HNO₃)

Silberlösung: 0,012 M Silbernitrat (AgNO₃)

Waschlösung: A. bidest.

Entwickler: 0,5% w/v Paraformaldehyd

0,28 M Natriumcarbonat (100 ml)

Stopplösung: 5% Essigsäure

2. Material und Methoden

Nach beendeter SSCP-Gelelektrophorese wurde das Gel aus der Gelkassette entnommen und in einer Plastikwanne auf einem Taumelschüttler gefärbt. Alle weiteren Schritte fanden bei Raumtemperatur statt.

Dabei schwamm das Gel frei in der Färbelösung. Beim Wechsel der Lösungen wurde die Vorhergehende vollständig aus der Wanne entfernt bevor die Nächste zugeführt wurde. Zunächst wurde das Gel in 10% Ethanol für 10 min fixiert und anschließend für 3 min in 1% Salpetersäure oxidiert. Nach Inkubation des Gels für 20 min im 0.012 M Silbernitrat wurde das überschüssige Silbernitrat für 1 min in destilliertem Wasser ausgewaschen. Das gewaschene Gel wurde zunächst mit Entwickler gewaschen, um überschüssiges Silbernitrat abzufangen, bis sich der Entwickler schwarz verfärbte. Anschließend wurde die Kontrastierung mit frischem Entwickler fortgeführt, bis sich die DNA-Banden ausreichend darstellten. Bei guter Kontrastierung des Bandenmusters wurde der Vorgang durch Inkubation in 5% Essigsäure für 10 min gestoppt. Nach Beendigung der Färbung wurden überschüssige Bereiche des Gels abgeschnitten. Anschließend wurde das Gel auf Fließpapier und unter einer Cellophanschicht auf dem Geltrockner für 2 Stunden bei 100 °C im Vakuum getrocknet.

Bei einer größeren Anzahl von SSCP-Gelen wurde die Färbung auf dem Biolane™ HTI durchgeführt.

2.4.2.5. Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde nach dem von Sanger et al. (enzymatische Sequenzierung) 1977 entwickelten Verfahren durchgeführt. Die Methode wird auch als Kettenabbruch- oder Didesoxynucleotid-Verfahren bezeichnet. Sie beruht auf einer polymerase-gestützten Elongation und wird in der aktuell angewandten Form als zyklische Sequenzierung mit einer thermostabilen Polymerase durchgeführt. Der Unterschied zur oben aufgeführten PCR-Reaktion besteht darin, dass nur ein Primer (Sequenzierungsprimer) verwendet wird und zu den 2'-Desoxynucleotidtriphosphaten (dNTPs) zusätzlich 2',3'-Didesoxynucleotidtriphosphat (ddNTPs) hinzugegeben wird. Bei der Polymerisation werden dNTPs wie auch ddNTPs als Substrat zur Kettenverlängerung von der Polymerase eingebaut. Der Einbau der ddNTPs führt aber zum Abbruch der Polymerisation. Die Ursache dafür liegt in der fehlenden 3'-Hydroxygruppe der ddNTPs, die keine Verlängerung der Molekülkette erlauben. Es entsteht eine Mischung von DNA-Fragmenten unterschiedlichster Kettenlängen, die durch eine Kapillargelelektrophorese aufgetrennt werden und mittels Fluoreszenzfarbstoffmarkierung (für jedes der vier ddNTPs eine andere Farbe) detektiert werden. Über das Elektropherogramm kann die Sequenz nach dem Primer ausgelesen und mit einer Referenzsequenz verglichen werden [29; 42; 48; 63].

Die eigentliche Sequenzierung erfolgte bei einem kommerziellen Anbieter (Seqlab, Göttingen).

In dieser Arbeit wurden DNA-Proben, welche auffällige DNA-Bandenmuster in der SSCP-Gelelektrophorese zeigten, als 50 µl PCR-Ansatz hergestellt und auf einem Agarosegel, wie oben

2. Material und Methoden

beschrieben aufgetrennt (siehe 2.4.2.1. Die Agarose-Gelelektrophorese und 2.4.2.2. DNA-Färbung im Agarosegel mit Ethidiumbromid). Nach abgelaufener Elektrophorese wurden die PCR-Produkte mit einer Stanze unter UV-Licht als Gelblöckchen aus dem Agarosegel ausgestanzt und in beschriftete Tubes gegeben. Die DNA wurde aus den Gelblöckchen mit dem NucleoSpin Extract II nach Angaben des Herstellers isoliert. Anschließend wurde der DNA-Gehalt gemessen und die Sequenzierreaktion mit 60 ng Template DNA und 10 pMol Primer im 14 µl Reaktionsansatz zur Sequenzierung durch den kommerziellen Anbieter eingeschickt.

Die Sequenzierungsdaten wurden elektronisch übermittelt und mit Hilfe der Analysesoftware Gentle mit einer Referenzsequenz verglichen [75; 77; 79; 80; 82].

2.4.2.6. High Resolution Melting (HRM)

Die High Resolution Melting Analyse (Schmelzkurvenanalyse) stellte ein weiteres Verfahren zum Screening von PCR-Produkten dar. Es hat eine hohe Sensitivität, Sequenzvariationen in PCR-Amplifikaten zu detektieren. Im Gegensatz zur Single-Strand Conformation Polymorphismus Analyse war diese Methode ein schnelleres Untersuchungsverfahren [16; 34; 57; 69; 72].

In dieser Arbeit wurde die Methode mit Hilfe der Realplex (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Untersucht wurden die Exone mit einer großen Basenpaaranzahl (Exon 2-3 (557 bp), Exon 4-5 (510 bp), Exon 31 (603 bp), Exon 40-41 (816 bp), Exon 42-43 (724 bp)), welche durch die SSCP nicht mehr aussagekräftig überprüft werden konnten. Weiterhin erfolgte die Untersuchung der Exone der zweiten Serie, bei Patienten mit Sequenzvariationen in der ersten Serie.

Die High Resolution Melting Analyse erforderte keine Trennungsschritte während des Ablaufes wie bei der oben aufgeführten Single-Strand Conformation Polymorphismus Analyse. Amplifikation (quantitative PCR) und High Resolution Melting Analyse eines PCR-Ansatzes erfolgten im selben Reaktionsgefäß nacheinander. Die PCR-Produkte waren dadurch der Umgebung weniger ausgesetzt. Das Risiko einer Verschmutzung, wie bei PCR und SSCP beschrieben (mögliche Verschmutzungsreaktionen durch Wechsel der Instrumente während des Ablaufes), der PCR-Amplifikate konnte verringert werden [16; 20; 34; 57; 69; 72].

Es wurde der Fluoreszenzfarbstoff LC-Green I, von BIOKE (Leiden NL), verwendet. Dieser wurde dem PCR-Ansatz hinzugegeben. LC-Green I interkalierte während der Amplifikation in die doppelsträngige DNA. Vorteil dieses Farbstoffes war, dass er folgende PCR-Schritte nicht hemmt. Nach erfolgter Amplifikation war ein hohes Fluoreszenzniveau vorhanden, aufgrund vieler doppelsträngiger DNA-Amplifikate, an die LC-Green I vergleichbar Ethidiumbromid unter Verstärkung der emittierten Fluoreszenz bindet [34; 57; 69; 72].

Danach wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Hierzu wurde die doppelsträngige DNA erhitzt bis zu dem Punkt, an dem sich die Doppelhelix in ihre Einzelstränge trennte. Die Schmelztemperatur war dabei spezifisch für das jeweilige PCR-Amplifikat. Das Fluoreszenzniveau fiel hierbei ab, da LC-Green I beim Schmelzvorgang von der einzelsträngigen DNA freigesetzt wird.

2. Material und Methoden

Die Verringerung des Fluoreszenzniveaus wurde mit Hilfe der Realplex-Software aufgezeichnet, verarbeitet und als Schmelzkurve visuell dargestellt [16; 34; 57; 69; 72].

Die hier verwendete Auswertesoftware „Device independent Melting Analysis (DiMA)“ wurde von Herrn Dr. Matthäus Pilch entwickelt.

Bei einer Sequenzvariation der doppelsträngigen DNA veränderte sich die Schmelztemperatur und damit die Form der Schmelzkurve. Dieser Unterschied wurde durch die Software graphisch, über die Entstehung abweichender Schmelzkurvenprofile, dargestellt [16; 20; 57; 69; 72].

Proben, die in der HRM-Analyse auffällig waren, wurden wie oben beschrieben zum Sequenzieren verschickt und ausgewertet (siehe 2.4.2.5. Sequenzierung).

3. Ergebnisse

3.1. Das Patientenkollektiv

Dieser Arbeit lagen zur Screeninguntersuchung DNA-Proben von 176 Patienten zugrunde. 92 Patienten (52,3 %) waren weiblich und 69 Patienten (39,2%) waren männlich.

Alle Patienten im Kollektiv waren an einer Netzhautdegeneration mit frühem Beginn erkrankt. Die Diagnosen bei der Erstvorstellung umfassten LCA, EOSRD (einschließlich Zapfen-Stäbchen-, Stäbchen-Zapfen-Degenration und generalisierte Formen), RP (simplex oder autosomal rezessiv) und JBTS.

3.2. Identifizierte Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen

3.2.1. Ablauf der Screeninguntersuchung

Das Screening wurde in mehreren Schritten durchgeführt. Zunächst erfolgte die Untersuchung der Patienten auf das Vorliegen der häufigsten Sequenzvariation des *CEP290*-Gens (c.2991+1655A>G). Danach wurden diejenigen Exone einer Screeninguntersuchung unterzogen, in denen, bei Beginn der Arbeit, in der Literatur bereits Sequenzvariationen berichtet wurden. Dies waren insgesamt 21 der 54 kodierenden Exone (2-3, 4-5, 10,16-17, 21, 22, 28, 31, 32, 35, 36, 37, 40-41, 42-43, 46 und 54).

Bei auffälligen Bandenmusteränderungen in der SSCP erfolgte eine Sanger-Sequenzierung des auffälligen PCR-Produktes.

Wies ein Patient eine Sequenzvariation in einem der untersuchten Exone oder Introne auf, wurden die restlichen Exone anschließend über ein High-Resolution Melting (HRM) Screening untersucht. Auffällige PCR-Produkte wurden mittels Sanger-Sequenzierung auf Sequenzvariationen untersucht.

3.2.2. Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen – Ergebnisse des Mutationsscreenings

Aus dem Patientenkollektiv wiesen von den insgesamt 176 untersuchten Patienten 38 (21,6%) Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen auf (Tabellen 12, 15 und 16). Es konnten 24 verschiedene Sequenzvariationen festgestellt werden. Diese wurden in 16 Exonen, über das gesamte *CEP290*-Gen verteilt, (Exon 10, 14, 17, 20, 21, 22, 23, 31, 35, 36, 37, 39, 40, 46, 48 und 54) und drei Intronen (begrenzt auf den Bereich Intron 22, 26 und 28) nachgewiesen.

Bei 24 der 38 (63%) Patienten konnten homozygote und compound heterozygote Sequenzvariationen identifiziert werden (Tabelle 15).

Bei 21 der 38 (55%) Patienten wurde die unabhängige Herkunft der Sequenzvariation von der Mutter und dem Vater durch eine Segregationsprüfung bestätigt.

Tabelle 12: Übersicht über die Häufigkeit in der ursächlichen Sequenzvariationen korrelierten Patienten im Vergleich zur Patientenkohorte

Hier einige Änderungen nach den Tabellen mit Mutationen	Patienten	Allele	Gesamtanteil Patienten [%] / Allele [%]*	Anteil Mutationen Patienten [%] / Allele [%]*
Patienten	176	352		
Ohne Sequenzvariationen	139	278	81,5	
Mit Sequenzvariationen	38	62	21,5 / 17,61	
Homozygote Sequenzvariationen	9	18	5,1	37,5
Compound heterozygote Sequenzveränderungen	15	30	8,5	62,5
Einfach heterozygote Sequenzveränderungen	14	14	7,9 / 3,9	37,8 / 22,9
Häufige Sequenzvariationen				
c.2991+1655A>G	20	27	11,4 / 7,7	52,6 / 43,5
c.4723A>T	8	10	4,5 / 2,8	21,1 / 16,1
c.2119_2123dupCAGCT	5	5	2,8 / 1,4	13,2 / 8,1

*für einfach Heterozygote

Einundzwanzig (87,5%) der 24 in dieser Arbeit im *CEP290*-Gen identifizierten Sequenzvariationen sind in den Mutations-Datenbanken (www.biobase-international.com; www.exac.broadinstitute.org; www.medgen.ugent.be/cep290base; www.retina-international.org) bereits erfasst. Ihre Annotation wurde mit Mutalyzer 2 (www.mutalyzer.nl/check) gegen die aktuelle Referenzsequenz (RefSeq NG_008417.1) geprüft.

Die drei häufigsten bisher in der Literatur beschriebenen Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen waren: c.2991+1655A>G (p.C998*, Intron 26; intronische Splice-Site-Mutation), c.4723A>T (p.K1575*, Exon 36) und c.5587-1G>C (Exon 41) [11; 12; 17; 23].

Für die Sequenzvariationen im Intron 26 (c.2991+1655A>G (p.C998*)) und Exon 36 (c.4723A>T (p.K1575*)) konnte dies im untersuchten Patientenkollektiv bestätigt werden. Die Sequenzvariation c.5587-1G>C (Exon 41) konnte bei den hier untersuchten Patienten nicht identifiziert werden. Stattdessen fand sich die Sequenzvariation c.2119_2123dupCAGCT fünf Mal in den hier untersuchten Patienten.

Tabelle 13 fasst die verschiedenen identifizierten Sequenzvariationen zusammen und Abbildung 3 stellt diese graphisch dar. Die in dieser Arbeit identifizierten Sequenzvariationen liegen in verschiedenen Domänen und beeinflussen unterschiedliche Protein-Protein-Interaktionen. Hierbei wird die Verteilung der Sequenzvariationen über das gesamte *CEP290*-Gen deutlich.

Tabelle 13: Zusammenfassung der in dieser Arbeit identifizierten pathogenen Sequenzvariationen und deren Lokalisation in den Domänen des CEP290-Proteins

Domäne	Bindungs-partner	Exon / Intron	Nukleotid	erwarteter Effekt	Referenz
1 Coiled-coil, Transmembrandomänenhomologie	Homo- und Heterodimerisierung	Exon 10	c.837_838insACGA	p.H280Tfs*19	[12; 39; 58]
2 Coiled-coil	Homo- und Heterodimerisierung	Exon 14	c.1298A>G	p.D433G	[12; 39; 58]
3 Coiled-coil		Exon 17	c.1665_1666delAA	p.K555Nfs*20	[12; 39; 58]
4 Coiled-coil	Homo- und Heterodimerisierung	Exon 20	c.1984C>T	p.Q662*	[12; 39; 58]
5 Coiled-coil	<i>NPHP5, CC2D2A</i>	Exon 21	c.2119_2123dupCAGCT	p.T709Sfs*11	[12; 14; 18; 39; 58]
6			c.2279_2280delTT	p.F760*	
7		Intron 22	c.2367+1G>A		
8 Coiled-coil , SMC Homologie	<i>NPHP5, CC2D2A</i>	Exon 24	c.2578G>T	p.G860*	[12; 14; 18; 39; 58]
9 Coiled-coil , Hook, Homologie, SMC Homologie	<i>CC2D2A</i>	Intron 26	c.2991+1655>AG	p.C998*	[12; 14; 18; 39; 58]
10		Intron 28	c.3310-1G>C		
11 Coiled-coil , Hook Homologie	Rab8a	Exon 31	c.3640dupG c.3758G>A	p.E1214Gfs*7 p.R1253H	[11; 12; 39; 58]
13 Coiled-coil, Myosin Homologie	Homo- und Heterodimerisierung	Exon 35	c.4452_4455delAGAA	p.K1484fs	[12; 39; 58]
14		Exon 36	c.4723A>T	p.K1575*	
15			c.4805C>T	p.T1602M	
16		Exon 37	c.4963delA	p.R1655Efs*6	
17			c.4962_4963delAA		
18			c.4966_4967delGA	p.E1656Nfs*3	
19			c.4966delG	p.E1656Nfs*3	
20		Exon 39	c.5254C>T	p.E1656Kfs*5	
21		Exon 40	c.5428A>C		
22		Exon 46	c.6277delG	p.R1752W p.N1810H p.V2093Sfs*4	
23 Coiled-coil, Myosin Homologie, KID Homology		Exon 48	c.6604delA	p.I2202Lfs*24	[12; 39; 58]
24 C-Terminus		Exon 54	c.7394_7395delAG	p.E2465Vfs*2	[12; 39; 58]

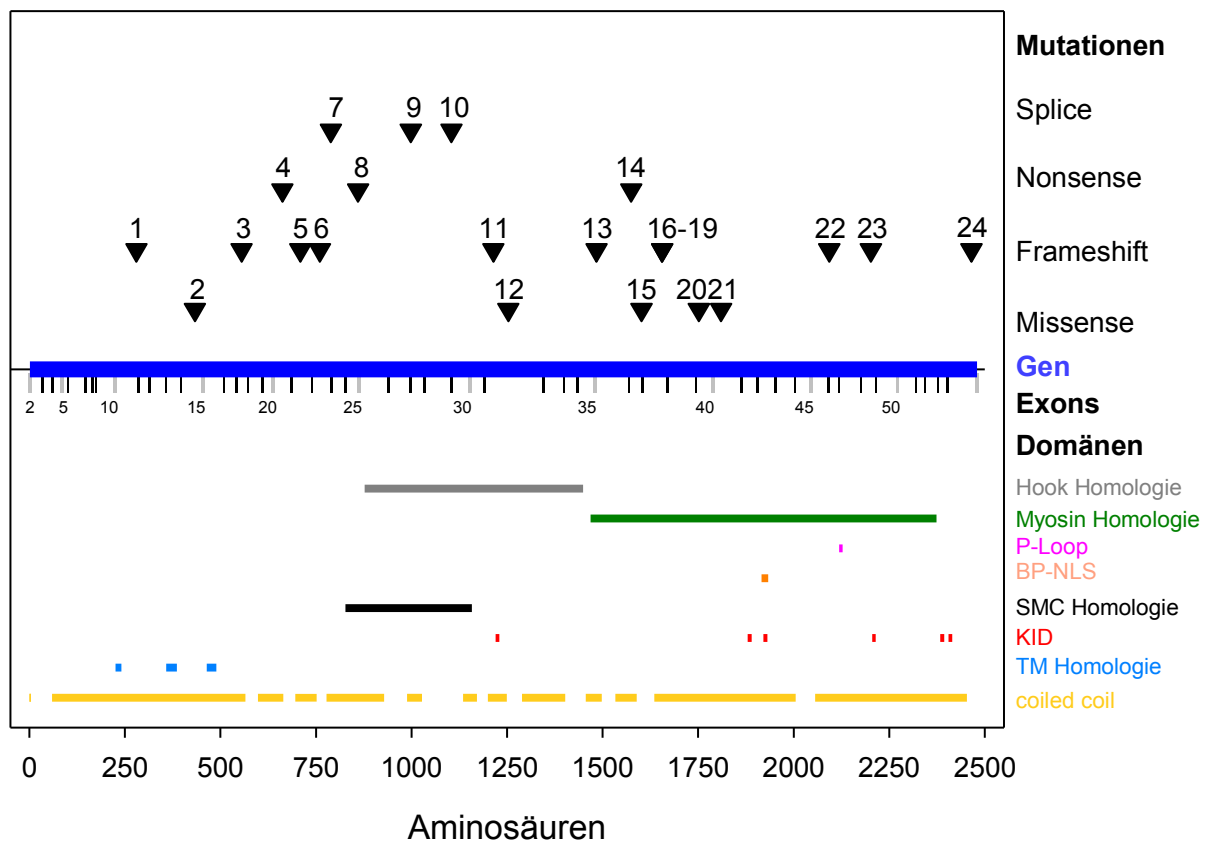


Abb. 3: Domänen und bindende Regionen im CEP290-Gen

Die Dreiecke zeigen die Position der identifizierten Sequenzvariationen an. Die Zahlen über den Dreiecken entsprechen der fortlaufenden Nummerierung in Tabelle 13. Der Zahlenstrahl gibt die relative Positionierung der Exone an. Die Balken entsprechen der Positionierung der beschriebenen Domänen [11; 12; 14; 18; 39; 58].

Sofern die Funktion der einzelnen Domänen bekannt ist, ist dieses in Tabelle 13 zusammengefasst. Dies umfasst auch die bekannten Protein-Protein-Interaktionen des CEP290-Proteins. [11; 12; 39; 58].

3.3. Mutationsformen

Es konnten alle Mutationsformen, wie Missense-, Nonsense-, Splice-Site- und Frameshift-Mutationen, im CEP290-Gen identifiziert werden. Dabei wurden die Frameshift-Mutationen sowohl durch Deletionen als auch durch Insertionen hervorgerufen [4; 12; 23; 24].

Tabelle 14: Häufigkeiten der identifizierten Mutationen

Mutationsform	Anzahl	Exon / Intron
Missense-Mutationen	5	14, 31, 36, 39, 40
Nonsense-Mutationen	3	20, 23, 36
Splice-Site-Mutationen	3	IVS22, IVS26, IVS28
Deletionen	10	17, 22, 35, 37, 46, 48, 54
Insertionen	1	10
Duplikationen	2	21, 31

Bei allen Patienten, bei denen die Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen ursächlich waren, lagen zwei Sequenzvariationen vor. Lediglich Patient 2065.01 wies drei unterschiedliche Sequenzvariationen in drei verschiedenen Exonen (Exon 23, Exon 31 und Exon 39) auf.

Alle in dieser Arbeit identifizierten Sequenzvariationen sind in den Tabellen 15 und 16 den jeweiligen Patienten zugeordnet worden.

Die verschiedenen Mutationsformen verteilen sich dabei über das gesamte Gen (Abb. 3). Lediglich die Splice-site-Mutationen fanden sich zwischen Exon 20 und Exon 30.

3.3.1. Splice-Site Mutationen

Im Intron 26 wurden bei 20 Patienten (11,4%) des Patientenkollektivs die Sequenzvariation c.2991+1655A>G nachgewiesen. Diese sehr häufige Sequenzvariation führt zu einem aberranten Spleißvorgang verbunden mit einer Insertion eines 128 bp großen Sequenzabschnitts zwischen Exon 26 und 27. Hieraus resultiert eine Veränderung der Aminosäuresequenz nach Exon 26 und ein Einschleusen eines vorzeitigen Stopcodons an Aminosäure 998. Dies führt zu einem funktionslosen Genprodukt [11; 12; 23; 63; 75; 79; 80; 82].

Im Intron 22 wurde bei Patient 2157.01 ein Austausch von Guanin durch Adenin an der ersten Basenposition des Introns identifiziert (c.2367+1G>A). Diese Veränderung wirkt sich direkt auf das Spleißverhalten des Introns aus, weil dadurch der Splice-Donor inaktiviert wird. In der Folge wird das folgende Intron nicht ausgespleißt und im Leseraster in das Genprodukt mit eintranslatiert. Das nächste Stop-Codon im neuen Leseraster führt dann zu einem vorzeitigen Ende der Translation [63; 80].

Patient 1911.02 wies im Intron 28 einen Basenaustausch von Guanin durch Cytosin an der letzten Basenposition des Introns 28 auf (c.3310-1G>C). Hierbei kommt es zu einem Verlust einer Splice-Acceptor-Site und dies führt mindestens zum Verlust des nachfolgenden Exons. Durch die so entstehende Leserasterverschiebung kommt es zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation [63; 75; 79; 80].

Damit wurden alle Formen einer Splice-site-Mutation (tief intronisch, Splice Donor und Splice Acceptor) gefunden.

3.3.2. Nonsense-Sequenzvariation

Insgesamt wurden drei verschiedene Nonsense-Mutationen bei 11 Patienten nachgewiesen. Die häufigste (acht Patienten) war ein Austausch von Adenin durch Thymin an Position 4723 in Exon 36 (c.4723A>T). Das hieraus resultierende Stopcodon an der Aminosäureposition 1575 führt, wie auch die anderen Nonsense-Mutationen, zu einem vorzeitigen Translationsstop [11; 12; 23; 63; 75; 79; 80; 82]. Alle Nonsense-Mutationen lagen in der Mitte des Genproduktes wodurch große Teile des Genproduktes verloren gehen. Aufgrund des Nonsense Mediated Decay (NMD) ist anzunehmen, dass bereits das Transkript des *CEP290*-Gens aufgrund dieser Sequenzvariationen in der Qualitätskontrolle aussortiert wird und diese Sequenzvariationen daher als Null-Mutationen zu werten sind [7; 9; 28; 71].

3.3.3. Missense-Mutation

Insgesamt wurden fünf Missense-Mutationen bei fünf Patienten nachgewiesen. Die Missense-Mutationen lagen im zentralen Bereich des Gens über Exon 14 bis Exon 40 verteilt vor. Missense Mutationen haben ein sehr breites Funktionsspektrum von leichten (hypomorphen) Funktionseinschränkungen bis hin zur Null-Mutation. Die Funktionen der hier vorliegenden Missense-Mutationen werden in der Diskussion im Zusammenhang mit den phänotypischen Daten bewertet [63; 79; 80].

3.3.4. Leserasterverschiebungen

13 der Patienten mit Sequenzvariationen hatten Mutationen, die das Leseraster verändern. Diese Leserasterveränderungen wurden durch Deletionen, Insertionen und Duplikationen hervorgerufen. Die Leserasterveränderungen führten zu vorzeitigen Translationsabbrüchen, die über das gesamte Gen verteilt waren. Es ist zu erwarten, dass die Genprodukte dieser Leserasterverschiebungen alle ebenso, wie die Nonsense-Mutationen, dem NMD unterliegen und damit Null-Mutationen darstellen [7; 9; 28; 60; 63; 70; 71; 74; 75; 79; 80].

Tabelle 15: Identifizierte pathogene Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen bei Patienten im homozygoten und compound heterozygoten Zustand

Patient	Maternale Sequenzvariation			Paternale Sequenzvariation			Referenz
	Exon / Intron	Nukleotid	erwarteter Effekt	Exon / Intron	Nukleotid	erwarteter Effekt	
homozygot							
0622.01	Intron 26	c.2991+1655A>G	p.C998*	Intron 26	c.2991+1655A>G	p.C998*	[23]
0668.01	Intron 26	c.2991+1655A>G	p.C998*	Intron 26	c.2991+1655A>G	p.C998*	[23]
1278.01	Intron 26	c.2991+1655A>G	p.C998*	Intron 26	c.2991+1655A>G	p.C998*	[23]
1601.01	Intron 26	c.2991+1655A>G	p.C998*	Intron 26	c.2991+1655A>G	p.C998*	[23]
1630.03	Intron 26	c.2991+1655A>G	p.C998*	Intron 26	c.2991+1655A>G	p.C998*	[23]
1945.01	Intron 26	c.2991+1655A>G	p.C998*	Intron 26	c.2991+1655A>G	p.C998*	[23]
2381.01	Intron 26	c.2991+1655A>G	p.C998*	Intron 26	c.2991+1655A>G	p.C998*	[23]
1423.01	Exon 36	c.4723A>T	p.K1575*	Exon 36	c.4723A>T	p.K1575*	[51; 66]
2428.01	Exon 36	c.4723A>T	p.K1575*	Exon 36	c.4723A>T	p.K1575*	[51; 66]
compound heterozygot							
1264.01	Intron 26	c.2991+1655A>G	p.C998*	Exon 21	c.2119_2123dupCAGCT	p.T709Sfs*11	[23]
2107.01	Intron 26	c.2991+1655A>G	p.C998*	Exon 21	c.2119_2123dupCAGCT	p.T709Sfs*11	[23]
2276.01	Intron 26	c.2991+1655A>G	p.C998*	Exon 21	c.2119_2123dupCAGCT	p.T709Sfs*11	[23]
2157.01	Intron 26	c.2991+1655A>G	p.C998*	Intron 22	c.2367+1G>A		[23; 44; 46]
1911.02	Intron 26	c.2991+1655A>G	p.C998*	Intron 28	c.3310-1G>C		[23; 65]
2664.01	Intron 26	c.2991+1655A>G	p.C998*	Exon 35	c.4452_4455delAGAA	p.K1448Nfs*4	[23]
1506.01	Intron 26	c.2991+1655A>G	p.C998*	Exon 36	c.4723A>T	p.K1575*	[23; 51; 66]
2803.01	Intron 26	c.2991+1655A>G	p.C998*	Exon 36	c.4723A>T	p.K1575*	[23; 51; 66]
1016.02	Intron 26	c.2991+1655A>G	p.C998*	Exon 37	c.4963delA	p.R1655Efs*6	[23; 44; 46]
0772.02	Intron 26	c.2991+1655A>G	p.C998*	Exon 40	c.5428A>C	p.N1810H	[23; 44; 46]
1802.01	Intron 26	c.2991+1655A>G	p.C998*	Exon 46	c.6277delG	p.V2093Sfs4*	[6; 23]
2065.01	Exon 31	c.3758G>A,	p.R1253H	Exon 23	c.2578G>T	p.G860*	rs763801479 [44; 46]
	Exon 39	c.5254C>T	p.R1752W				rs748471942
2365.01	Exon 31	c.3640dupG	p.E1214Gfs*7	Exon 48	c.6604delA	p.I2202Lfs*24	[44; 46; 51]
2359.01	Exon 36	c.4723A>T	p.K1575*	Exon 37	c.4962_4963delAA	p.E1656Nfs*3	[51; 66]
2677.01	Exon 36	c.4723A>T	p.K1575*	Exon 20	c.1984C>T	p.Q662*	[2; 51; 66]

Tabelle 16: Identifizierte pathogene Sequenzvariationen im CEP290-Gen bei Patienten im einfach heterozygoten Zustand

Patient	Sequenzvariation			Referenz
	Exon / Intron	Nukleotid	erwarteter Effekt	
0926.01	Exon 10	c.837_838insACGA	p.H280Tfs*19	[44; 46]
2084.01	Exon 14	c.1298A>G	p.D433G	[44; 46]
0291.01	Exon 17	c.1665_1666delAA	p.K555Nfs*20	[6]
0325.01	Exon 21	c.2119_2123dupCAGCT	p.T709Sfs*11	[23]
0738.01	Exon 21	c.2119_2123dupCAGCT	p.T709Sfs*11	[23]
1004.01	Exon 37	c.4966_4967delGA	p.E1656Nfs*3	[44; 46]
1061.01	Exon 22	c.2279_2280delTT	p.F760*	[44; 46]
0334.01	Intron 26	c.2991+1655A>G	p.C998*	[23]
1384.01	Intron 26	c.2991+1655A>G	p.C998*	[23]
1135.01	Exon 36	c.4723A>T	p.K1575*	[51; 66]
2561.01	Exon 36	c.4723A>T	p.K1575*	[51; 66]
2619.01	Exon 36	c.4805C>T	p.T1602M	[44; 46]
1223.01	Exon 37	c.4966G>T	E1656*	[23]
1221.01	Exon 54	c.7394_7395delAG	p.E2465Vfs*2	[44; 46]

3.3.5. Isokodierende Polymorphismen im CEP290-Gen

Ein Teil der identifizierten Sequenzvariationen rufen keine krankheitsverursachende Sequenzvariation hervor. Dabei handelt es sich um isokodierende Sequenzvariationen und intronische Sequenzvariationen. Sequenzvariationen außerhalb der kodierenden Sequenzen führen nur bedingt zu Veränderungen des Gendprodukts. Befinden sie sich innerhalb der kodierenden Sequenzen oder an ungenutzten Spleißstellen im Intron, kann eine genetische Erkrankung durch eine Veränderungen des Spleißverhaltens hervorgerufen werden [7; 29; 42; 63]. Die in dem vorliegenden Patientenkollektiv identifizierten Polymorphismen lagen alle außerhalb der kodierenden Sequenzen und waren in den Mutationsträgern einfach heterozygot, so dass sie nicht als ursächlich in Betracht kamen [7; 29; 42; 63].

Tabelle 17 fasst diese Sequenzvariationen zusammen.

Tabelle 17: Isokodierende Polymorphismen im CEP290-Gen

Exon	Nukleotidänderung	Aminosäure	Patienten / dbSNP		Referenz
			Allele	rs-Nummer	
Intron 3	c.180+56T>A		1 / 1		NEU
Intron 4	c.250+163C>T		1 / 1		[44; 46]
Exon 21	c.2055T>C	p.A685	24 / 27	rs45465996	[23]
Intron 21	c.2217+33A>T		1 / 1		[44; 46]
	c.2217+16A>C		1 / 2		[44; 46]
Exon 22	c.2268G>A	p.S755	16 / 16	rs2468255	[6]
	c.5568G>A	p.S765	5 / 5		NEU
	c.2340G>A	p.Q780	21 / 21		[44; 46]
Exon 28	c.3273G>A	p.E1091	1 / 1		[44; 46]
Exon 31	c.3939T>G	p.N1313	2 / 2		[44; 46]
Exon 32	c.4185A>G	p.Q1395	1 / 1	rs371530941	[44; 46]
	c.4119A>G	p.K1373	2 / 2	rs117122459	[44; 46]

3. Ergebnisse

Intron 35	c.4704+46delT	1 / 1	rs11356711	[6]
Exon 36	c.4705-45T>A	3 / 3		[44; 46]

Den hier aufgeführten Daten ist zu entnehmen, dass das in dieser Arbeit einbezogene Patientenkollektiv die größte Anzahl der identifizierten Polymorphismen in den Exonen 21 und 22 aufwies (Tabelle 17).

3.4. Augenärztliche Daten der Patienten mit Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen

Die augenärztlichen Daten wurden in dieser Studie retrospektiv erhoben. Insgesamt konnten aus dem untersuchten Patientenkollektiv 38 von 176 Patienten (21,6%) mit Sequenzvariationen identifiziert werden. 24 Patienten (13,6%) hatten eine ursächliche Kombination verschiedener *CEP290*-Sequenzvariationen und 14 (8%) waren einfach heterozygot, so dass die Mutation bei diesen als nicht ursächlich für die Erkrankung bewertet werden musste. Tabellen 19 und 20 fassen die klinischen Untersuchungsergebnisse aus den Krankenblättern zusammen.

Von den 24 Patienten mit Nachweis einer ursächlichen Sequenzvariation waren neun Patienten männlichen Geschlechts (37,5%), 15 waren weiblichen Geschlechts (62,5%).

Die Erstdiagnose der 24 Patienten mit identifizierten Sequenzvariationen unterteilte sich wie in Tabelle 18 angegeben.

Tabelle 18: Übersicht über die Diagnosen der Patienten mit nachgewiesenen ursächlichen Sequenzvariationen

Erkrankung	Patienten	Anteil [%]
LCA	14	58,3
EOSRD	10	41,7
JBTS	0	0
RP (autosomal-rezessiv)	0	0

Zur Erfassung des Phänotyps standen Krankenblätter der Patienten zur Verfügung. Die klinischen Untersuchungen fanden teilweise außerhalb der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Justus-Liebig Universität Giessen statt.

Die Häufigkeit der Untersuchungen variierte zwischen einem und sechs Mal. Die Untersuchungen fanden im Säuglings-, Kindes-, Jugend-, jungen Erwachsenen- und Erwachsenenalter statt. Das Alter bei der Erstvorstellung der Patienten lag im Median bei 14,6 Jahren (Bereich ein Monat bis 81 Jahre).

In der folgenden Zusammenfassung der phänotypischen Daten liegt der Fokus auf Patienten mit ursächlichen Sequenzvariationen.

Die augenärztlichen Ergebnisse sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

Für die 24 Patienten mit ursächlichen Sequenzvariationen lagen in 22 Fällen Daten einer Untersuchung vor. 14 der 22 Patienten wurden im Verlauf mehrfach an der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde des Universitätsklinikums Gießen untersucht. Im Mittel waren die Patienten 2,27

Mal (+/-1,45 Mal) zur Untersuchung in der Klinik.

Das Durchschnittsalter bei Erstvorstellung war 3,5 (+/-6,1) Jahre, der Median lag bei 0,9 Jahren.

Allen 24 Patienten gemeinsam war eine frühkindliche schwere Sehbeeinträchtigung. Die Ausprägung variierte individuell. Die Ausprägung der Reaktion auf Licht, bei den hier eingeschlossenen Patienten, steht in keiner direkten Abhängigkeit zum Alter. Bei den Patienten, mit erfolgter Kontrolluntersuchung, zeigte sich, dass die schwere Sehbeeinträchtigung im Verlauf der Erkrankung relativ stabil blieb.

Ein oculodigitales Phänomen wiesen lediglich zwei der 24 Patienten auf.

Die Tabellen 19 und 20 fassen die phänotypischen Daten der Patienten mit ursächlichen und einfach heterozygoten Sequenzvariationen zusammen. Von fünf der 38 Patienten mit identifizierten Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen lagen keine Krankenblätter vor. Tabelle 19 beinhaltet die phänotypischen Daten der Patienten mit homozygoten und compound heterozygoten Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen. Tabelle 20 beinhaltet die Daten der Patienten mit einfach heterozygoter Sequenzvariation.

Tabelle 19: Daten der augenärztlichen Untersuchung der Patienten mit homozygoten und compound heterozygoten Sequenzvariationen im CEP290-Gen

<u>Patient</u> <u>Geschlecht,</u> <u>Herkunft,</u> <u>Blutsver-</u> <u>wandtschaft</u> <u>Erkrankung</u>	<u>Alter</u>	<u>Visus</u>	<u>Refraktion</u> <u>(Sphäre / Zylinder /</u> <u>Winkel)</u>	<u>Nystagmus</u>	<u>Augenhintergrund</u> <u>Fundusautofluoreszenz</u>	<u>Extraokuläre</u> <u>Befunde</u>	<u>OCT</u>	<u>ERG</u>	<u>VEP</u>
Homozygote Sequenzvariationen 0622.01 W, türkisch, n. konsang. LCA	39 J	k.A.		k.A.	k.A.		k.A.	k.A.	k.A.
0668.01 W, deutsch, n. konsang LCA	8 Mo	LSP	OD +10,0 / -2,0 / 0 OS +10,0 / -1,0 / 0°	↔↔	OU: P: PV	IDDM	k.A.	uNG	k.A.
1278.01 M deutsch, n. konsang LCA	13 Mo	NL		↔	k.A.		k.A.	k.A.	k.A.
1423.01 W, österreich, n. konsang LCA	2 Mo 11 Mo 2 J 4,4 J	NL LSP OU: 0,02, BL OD: 0,02 OS: 0,008	OU +9,0 / +1,0 / 90 OD +9,0 OS+9,0 / +1,0 / 90 OU +9,0 / -0,5 / 0	∅ ↔ ↔↔ ↔↔	OU: Ma: FWR ∅, P: PV OU: Ma: FWR ∅, P: PV n.m. OU: Ma: MWR ⊕, FWR ∅, P: PV Abb. 6 und FAF: vgl. Abb. 8		k.A. k.A. k.A. k.A.	k.A. k.A. k.A. sk RA / ph uNG	k.A. k.A. k.A. k.A.
1601.01 M, deutsch, n. konsang, LCA	3 J 4 J 5,9 J 6,9 J	OD 0,3 OS 0,2 OU: 0,12 OD 0,15 OS 0,12 OD 0,15 OS 0,12	OD -0,5 / -1,25 / 28 OS 0plan / -1,5 / 162° OD -0,5 / -1,0 / 21 OS 0 / -1,5 / 180 OD -1,5 / -1,5 / 25 OS -1,5 / -2,0 / 164 OD -2,5 / -1,5 / 20 OS -1,75 / -2,5 / 165	∪ ∪ k.A. ∪	OU: NHA, AHA, PV OU: NHA, AHA, Ma: PV Abb. 6 OU: NHA, AHA, Ma: MWR ∅, PV OU: NHA, Ma: MWR ∅, PV, P: KK FAF: vgl. Abb. 8	Asthma bronchiale, VWD1	k.A. OU: FE Abb. 9 FE	uNG k.A. k.A. k.A.	k.A. k.A. k.A. k.A.

3. Ergebnisse

	8,2 J	OD 0,19 OS 0,12	OD -1,5 / -1,5 / 97 OS -1,5 / -2,0 / 177	↻	OU: NHA, M: MWR ∅, PV, P: KK	Abb. 9	k.A.	k.A.
	9,2 J	OD 0,2 OS 0,32	OD -4,0 / -2,0 / 13 OS -3,25 / -3,0 / 163	↻	Abb. 6	FE	k.A.	k.A.
	10,8 J	OU 0,3	OD -5,0 / -2,5 / 9 OS -4,0 / -4,25 / 163	↻		FE	k.A.	k.A.
1630.03 W, deutsch- spanisch, n. konsang. LCA	4 Mo	NL	OD +2,5 / -2,5 / 5 OS +2,0 / -2,5 / 65	↔	OU: Ma: MWR ⊕, FR ∅, SEV	k.A.	k.A.	RA
	11 Mo	LSP		↔	OU: Ma: FR ∅, PV, P: KK, PV, AHA	k.A.	k.A.	k.A.
	4 J	LSP	OD +9,0 / -1,5 / 45 OS +9,0 / -1,5 / 140	⊆	OU: P: PV FAF: vgl. Abb. 8	PRD	k.A.	k.A.
1945.01 M, türkisch, konsang. EOSRD	2 J	HBW		k.A.	OU: o.A.	AEV	k.A.	k.A.
	3,4 J	LSP	OD +6,0 / -1,75 / 165 OS +7,0 / -1,5 / 170	∅	OU: Ma: FWR ∅, MWR ⊕, G: ><	AEV	k.A.	uNG
	3,6 J	HBW	OD +8,0 / -2,5 / 20 OS +8,0 / -5,0 / 170	k.A.	OU: Ma: PV, MWR ⊕		k.A.	k.A.
	4,8 J	LSP			OU: Ma: PV, MWR ⊕			
	9,8 J	LSP				Abb. 9		
2381.01 W, deutsch, n. konsang. LCA	1,4 J	NL	OU +5,5	⊕	OU: Ma: MWR ∅, G: ><	k.A.	k.A.	k.A.
2428.01 W, deutsch, n. konsang. EOSRD	77 J	OD: 0,2 OS: 0,05		∅	OU: Ma, homogen, P: PV	NH ↓, FE ∅ uNG		k.A.
	81 J	OD: 0,1 OS: HBW			OU: Ma: AT, P: PV, AT	k.A. Abb. 9	k.A.	k.A.
compound heterozygot								
0772.02 M, deutsch, n. konsang. LCA	1 J	NL	OD +9,5 / -0,5 / 90 OS +9,0 / -0,5 / 110	↔⊆	OU: Ma + P: PV Abb. 7	k.A.	uNG	uNG
	6 J	LSP	OD +8,0 / 0 / 0 OS +9,0 / 0 / 0	k.A.	OU: Ma: MWR ∅, P: PV	k.A.	uNG	k.A.
1016.02 W, österreich., n. konsang. LCA	3 J	LSP	OU +6,0 / 0 / 0	k.A.	OU: o.A.	k.A.	k.A.	k.A.
	4 J	LSP	OU +8,0 / 0 / 0	⊕	OU: o.A.	k.A.	uNG	uNG
1264.01 M, dänisch, n. konsang.	k.A.	k.A.		k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.

3. Ergebnisse

LCA								
1506.01 M, deutsch, n. konsang. LCA	9 J BL	OU: 0,02	OD +6,75 / +1,25 / 90 OS +6,5 / +1,75 / 75	⊂	OU: P: \otimes , \nearrow , Ma: gehämmert	k.A.	sk / ph uNG	RA
	14 J	OD 0,04 OS 0,05 BL	OD +6,25 / +1,25 / 110 OS +6,5 / +1,0 / 80	\subseteq	OU: P: \otimes , \nearrow , Ma: gehämmert, P: KK	k.A.	k.A.	k.A.
1802.01 W, deutsch, n. konsang. LCA	23,8 J	OU: 0,1	OD +10 / -1,25 / 180 OS 9,5 / -0,75 / 3	$\leftrightarrow \cup$	OU: Ma: MWR \emptyset , G: \gg , P: PV, KK Abb. 7 und FAF: vgl. Abb. 8	n.m.	sk / ph uNG	k.A.
1911.02 M, deutsch, n. konsang. EOSRD	3 Mo 11 Mo	NL NL	OU +8,0 / 0 / 0 OU +10 / 0 / 0	$\leftrightarrow \subseteq$ $\leftrightarrow \subseteq$	OU: Ma: MWR \oplus OU: P: KK	k.A. k.A.	k.A. k.A.	k.A. k.A.
	16 Mo 2,3 J	NL NL	OD +6,0 / 0 / 0 OS +7,5 / 0 / 0	\leftrightarrow \leftrightarrow	OU: Ma: MWR \emptyset , P: PV, wF OU: P: PV, wFI	k.A. k.A.	k.A. k.A.	uNG k.A.
	4,4 J 5,25 J	NL NL		k.A. \oplus	OU: o.A. n.m. FAF: vgl. Abb. 8	k.A. k.A.	k.A. k.A.	k.A. k.A.
2065.01 W, türkisch, n. konsang. EOSRD	10 Mo 3 J 4 J 5,25 J 5,75 J 7 J 12 J	HBW Bin: 0,08 OD: 0,16 OS: 0,12 OU: 0,125 OD: 0,2 OS: 0,2 OU: 0,1 OU: 0,1	OD +7,50 / -1,50 / 10 OS +7,50 / -1,00 / 75 OD +6,00 / -1,50 / 11 OS +6,00 / -1,00 / 75 OD: +5,75 / -2,5 / 11 OS: +5,75 / -2,5 / 170 OD +5,75 / -3,0 / 3 OS +5,75 / -3,25 / 1, OD: +5,0 / -2,5 / 12 OS: +5,5 / -2,75 / 170 OD +7,0 / -2,5 / 8 OS +6,75 / -2,5 / 164 OD +2,5 / -2,5 / 8 OS: +1,75 / -2,75 / 168	$\subseteq \leftrightarrow$ $\subseteq \leftrightarrow \cup$ $\leftrightarrow \cup$ $\leftrightarrow \cup$ \leftrightarrow $\leftrightarrow \cup$ \oplus	OU: MWR $\downarrow \downarrow$ OU: o.A. OU: o.A. OU: Ma: MWR \emptyset , P: PV Abb. 7 OU: Ma: MWR \emptyset , P: PV OU: Ma: MWR $\downarrow \downarrow$, P: PV, G: \gg Abb. 7 OU: Ma: MWR \emptyset , P: PV, G: \gg Abb. 7 und FAF: vgl. Abb. 8	k.A. k.A. k.A. Abb. 9 k.A. PRD Abb. 9	sk RA / phk.A. uNG k.A. uNG k.A. uNG k.A. k.A.	k.A. k.A. k.A. k.A. k.A. k.A.
2107.01 W, deutsch, n. konsang.	4 Mo 1 J 4,8 J	NL NL LSP	n.u.	\emptyset \subseteq	OU: Ma: MWR \emptyset , P: PV OU: Ma: MWR \emptyset , P: PV Abb. 7	k.A. k.A. k.A.	uNG uNG	uNG k.A.

3. Ergebnisse

LCA	9,8 J LSP	n.u.		OU: Ma: MWR, G: ><, KK: ∅ EV ⊕⊕	P: NHA	n.u.	
2157.01 M deutsch, n. konsang. EOSRD	1 J LSP	OU +8,0	↔	OU: P: PV, PEA	k.A.	k.A.	k.A.
	4 J	OU: 0,003	↔∪	OU: S: ✱, G: ><, Ma: ~, P: PV, wFI	k.A.	uNG	uNG
2276.01 W, deutsch, n. konsang. LCA	20 J NL	OD +6,5 / 0 / 0 OS +5,5 / 0 / 0	∅	OU: OA, NHA, G: ∅	Autismus	k.A.	k.A.
2359.01 W, deutsch, n. konsang. EOSRD	9 Mo LSP	OD +7,5 / -1,0 / 0 OS +7,0 / -1,0 / 0	↔∪	OU: Ma: MWR ∅, P: FI	MEV	k.A.	sk RA / ph uNG
2365.01 W, österreich., n. konsang. EOSRD	7 Mo NL		⊆∪	OU: Ma: MWR ∅, P: PV		k.A.	uNG
2664.01 W, deutsch, n. konsang. EOSRD	1 J NL	OD +6,75 / -1,0 / 30 OS +6,0 / -1,25 / 51	k.A.	OU: G: ><		k.A.	uNG
	1,5 J NL		k.A.	OU: G: ><		k.A.	k.A.
2677.01 W, deutsch, n. konsang. EOSRD	5 Mo NL		↔	OU: Ma: MWR ⊕		k.A.	k.A.
	9 Mo NL	OD +8,5 / -0,75 / 20 OS +9,0 / -1,0 / 0	↔	OU: Ma + P: PV		k.A.	RA
2803.01 M, deutsch, n. konsang. EOSRD	3 Mo NL		↔	OU: ua		n.u.	uNG
	15 Mo NL	OD +7,0 / -2,0 / 20 OS +6,0 / -1,5 / 15	↔	OU: Ma: ua,		n.u.	n.u.

Tabelle 20: Daten der augenärztlichen Untersuchung der Patienten mit einfach heterozygoten Sequenzvariationen im CEP290-Gen

<u>Patient</u> <u>Geschlecht,</u> <u>Herkunft,</u> <u>Blutsver-</u> <u>wandtschaft</u> <u>Erkrankung</u>	<u>Alter</u>	<u>Visus</u>	<u>Refraktion</u> <u>(Sphäre / Zylinder /</u> <u>Winkel)</u>	<u>Nystagmus</u>	<u>Augenhintergrund</u> <u>Fundusautofluoreszenz</u>	<u>Extraokuläre</u> <u>Befunde</u>	<u>OCT</u>	<u>ERG</u>	<u>VEP</u>
0291.01 M, deutsch, n. konsang. LCA	5 Mo 2 J 14 J	NL NL NL		↺ ↔↔ ↔↔	Fundus flavus Ma: MWR ∅ o.A. OU: P: KK		k.A. k.A. k.A.	k.A. sk / ph uNG k.A.	⊕ k.A. k.A.
0325.01 M, deutsch, n. konsang. LCA	44 J	NL		⊕	k.A.	EGM	k.A.	sk / ph uNG	k.A.
0334.01 W, deutsch, n. konsang. RP, ar	21 J 24 J 30 J	OD: 0,04 OS: 0,1 OD: 0,03 OS: 0,04 OD: 0,2 OS: 0,2	OD: -9 / 1 / 0 OS: -8 / -2 / 0 OD -3,5 / -1,75 / 177 OS -3,0 / -2,5 / 9 OD: -3,5 / -2,0 / 174 OS: -3,0 / -2,0 / 10	↔	OU: S: ✱, P: PV, KK		k.A.	k.A.	k.A.
0738.01 W, deutsch, n. konsang. LCA	3 Mo 1 J	LSP LSP		↔↔ ∅	OU: o.A. OU: Ma: FR ∅, P: PV	EV⊕	k.A. k.A.	k.A. k.A.	uNG k.A.
0926.01 M, deutsch, n. konsang LCA	4 J	LSP		↔	k.A.	Ax	k.A.	k.A.	k.A.
1004.01 M, mexikanisch, n. konsang. LCA	8 Mo	k.A.		k.A.	k.A.		k.A.	sk / ph uNG	k.A.
1061.01 W, deutsch- türkisch, n. konsang. LCA	9 Mo	LSP		⊕	OU: o.A.		k.A.	sk / ph uNG	k.A.

3. Ergebnisse

1135.01 M, österreich., n. konsang. LCA	1 J LSP, BL	OU +6,0 / 0 / 0	↔	OU: Ma: MWR ⊕		k.A.	sk uNG / ph RA	uNG
1221.01 M, k.A. LCA	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.		k.A.	k.A.	k.A.
1223.01 M, kanadisch, n. konsang. LCA	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.		k.A.	k.A.	k.A.
1384.01 M, deutsch, n. konsang. LCA	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.		k.A.	k.A.	k.A.
2084.01 W, deutsch, n. konsang. CRD	7 J OU: 0,1	OD -0,75 / -1,25 / 10 OS -1,25 / -1,75 / 172	k.A.	OU: M: PV		OU: M: AS	OD: ↓↓ OS: uNG	k.A.
	8 J OU: 0,05	OD: -1,0 / -0,75 / 175 OS: -1,25 / -1,75 / 170						
	9 J OD: LSP OS: HBW	OD -1,00 / -0,75 / 175 OS -1,00 / -1,25 / 176	k.A.	OU: M: PEA, PV, P: PV		k.A.	sk / ph uNG	k.A.
	10 J OD: 0,01 OS: 0,02	OD: -0,5 / -1,5 / 24 OS: -0,25 / -1,25 / 166	k.A.	OU: M: PV MWR ∅, S: ☀, G: ><		OU: AS	ph uNG	k.A.
	12 J OD: LSP OS: HBW	OD -5,25 / -1,75 / 180 OS -3,25 / -2,25 / 172	k.A.	OU: Ma AT; S: ☀ P: KK+		k.A.	k.A.	k.A.
2561.01 W, deutsch, n. konsang. LCA	1 J k.A.		⊕	k.A.	MH, MEV	k.A.	k.A.	k.A.
	4 J LSP		↔	OU: o.A.		n.m.	k.A.	k.A.
2619.01 W, deutsch, n. konsang. CRD	42 J OD: 0,8 OS: 1,0	OD -1,5 / -0,25 / 105 OS -1,75 / -0,25 / 120	k.A.	OU: Ma: AT, P: PV		k.A.	sk RA / ph ua	k.A.
	43 J OU 1,25	OD: -2,25 / -0,5 / 85 OS: -2,5 / 0 / 0	k.A.	OU: Ma: AT, P: PV		OD>OS: PRD	k.A.	k.A.

3. Ergebnisse

Abkürzungen zu den Tabellen 19 und 20:

AEV: allgemeine Entwicklungsverzögerung, AHA: Aderhautatrophie, AS: Aufhebung des Schichtkontrastes, AT: Atrophie, Ax: Ataxie, Bin: binokular, BL: Blendung, EGM: Epilepsie, Grand Mal, EV: Entwicklungsverzögerung, FAF: Fundusauofluoreszenz, FE: foveale Einsenkung, FI: Flecken (wFI: weiße Flecken), FR: Foveolarreflex, G: Gefäße, HBW: Handbewegung, IDDM: Diabetes mellitus Typ I, J: Jahre, k.A.: keine Angabe, KK: Knochenkörperchen, LSP: Lichtscheinprojektion, M: männlich, Ma: Makula, MEV: motorische Entwicklungsverzögerung, Mo: Monate, MWR: Makulawallreflex, MH: Muskelhypotonie, n.m.: Untersuchung nicht möglich, n.u. nicht untersucht, NHA: Netzhautatrophie, NL: nulla lux, o.A.: ohne Auffälligkeiten, OA: Optikusatrophie, OD: rechtes Auge, OS: linkes Auge, OU: beide Augen, P: Peripherie, PEA: Pigmentepithelatrophie, ph: photopisch, PRD: Degeneration der Photorezeptorschicht, PV: Pigmentveränderungen, RA: Restantworten, SEV: Sprachentwicklungsverzögerung, S: Sehnerv, sk: skotopisch, ua: unauffällig, uNG: unter der Nachweisgrenze, VWD1: von Willebrand Syndrom 1, W: weiblich; rotatorische Komponente ↻ Pendelnystagmus ↔, Rucknystagmus ≙, ↓: erniedrigt, ↓↓ stark erniedrigt, ↑↑↑: sehr stark erhöht, ↑: erhöht, ↑↑: stark erhöht, ↓↓↓: sehr stark erniedrigt, ∅: nicht vorhanden, ↗: schräg, ⊕: vorhanden, ><: verengt, +: leicht, ++: mittel, +++: stark, ✱: heller, wachsgelb, abgeblasst, ⌚: verzögert

Visus und Refraktion

Bei 22 der 24 Patienten mit ursächlichen Sequenzvariation war eine Dokumentation des Visus vorhanden (Abb. 4).

Sieben (29,2%) der 24 Patienten wiesen bei der Erstvorstellung keine Fixation einer hellen Lichtquelle auf. Diese Ergebnisse wurden innerhalb des ersten Lebensjahres erhoben. Bei einem der Patienten, für den Daten aus einer Wiedervorstellung vorlagen, besserte sich die Reaktion auf eine Lichtquelle innerhalb der ersten Lebensdekade nicht. Alle Patienten, die über das zweite Lebensjahr hinaus beobachtet werden konnten, zeigten in den Folgeuntersuchung zumindest eine Lichtscheinprojektion. Diese Patienten wurden zwischen einem halben Jahr und 72 Monaten untersucht.

Acht der 24 Patienten erreichten eine Lichtwahrnehmung, zum Teil mit Wahrnehmung von Handbewegungen. Sieben Patienten erreichten einen messbaren Visus (Abb. 4).

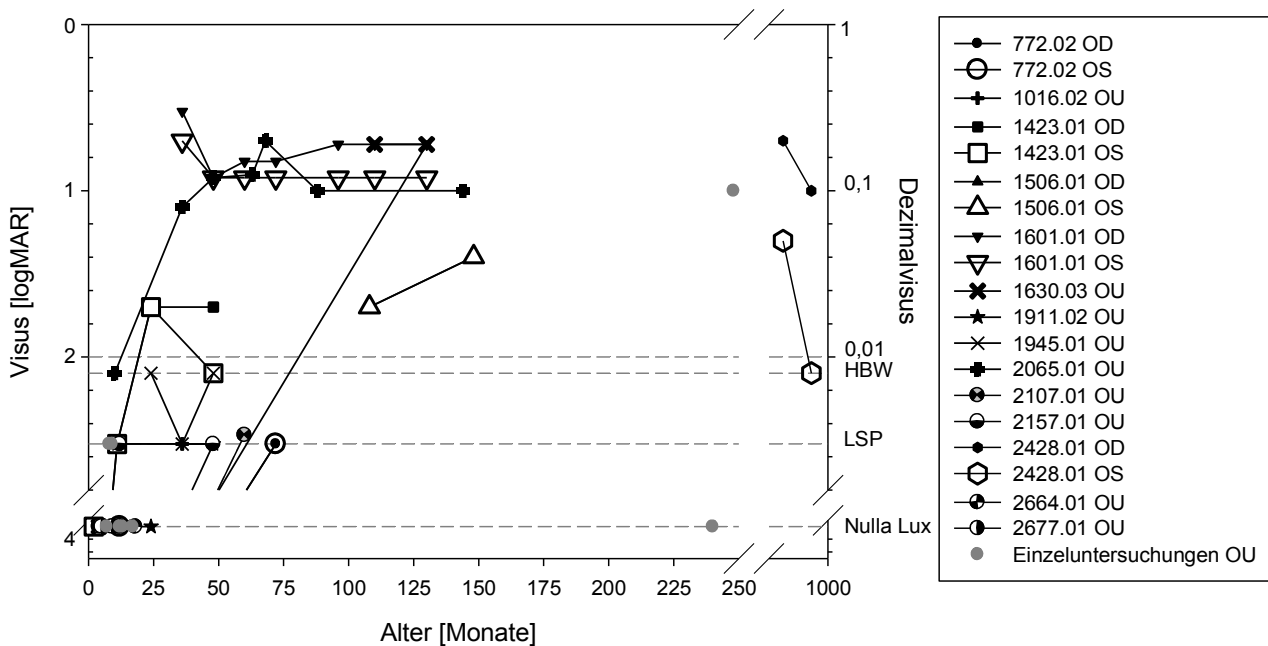


Abb. 4: Entwicklung des Visus mit dem Alter bei Patienten mit homozygoten und compound heterozygoten *CEP290*-Sequenzvariationen

OD: rechtes Auge, OS: linkes Auge, OU: beide Augen, Visusangaben in (logMAR: negativer dekadischer Logarithmus des Minimum Angle of Resolution): 4: keine Lichtwahrnehmung / Fixation (Nulla lux), 2,5: Lichtscheinprojektion (LSP), 2,1: Handbewegungen (HBW), 1: Visus 0,1

Das rechte und das linke Auge waren vergleichbar betroffen. Es ist ersichtlich, dass die Ausprägung der Reaktion auf Licht, bei den hier eingeschlossenen Patienten, in keiner direkten Abhängigkeit zum Alter steht. Alle Patienten wiesen generell einen stark reduzierten Visus unter 0,05 auf. Lediglich einzelne Fälle (1601.01, 2065.01, 2428.01) erreichten einen besseren Visus um 0,1 und besser (Tab. 19 und Abb. 4). Ein Unterschied zu den einfach heterozygoten Mutationsträgern war nicht festzustellen (Tab. 20).

Ein Zusammenhang zwischen dem Visus und der Art der Sequenzvariation lässt sich ebenfalls nicht aufzeigen. Die identischen Sequenzvariationen bzw. funktionell vergleichbaren Sequenzvariationen finden sich sowohl bei Patienten mit weniger stark reduziertem Visus als auch bei Patienten mit stark reduziertem Visus (Tab. 19).

Bei 17 der 24 Patienten (70,8%) konnte die Refraktion bestimmt werden. Die Untersuchung erfolgte bei sieben Patienten einmal, bei weiteren sechs Patienten zweimal, bei zwei Patienten dreimal und bei zwei Patienten siebenmal innerhalb von 11 Jahren. Dabei zeigte sich, dass die Patienten eine starke Hyperopie hatten (mittleres sphärisches Äquivalent: 6,4 dpt, +/-3,3 dpt, Median: 7,5 dpt).

3. Ergebnisse

In den Folgeuntersuchungen zeigte sich, dass sich die Weitsichtigkeit zu einer normalen Refraktion entwickelte.

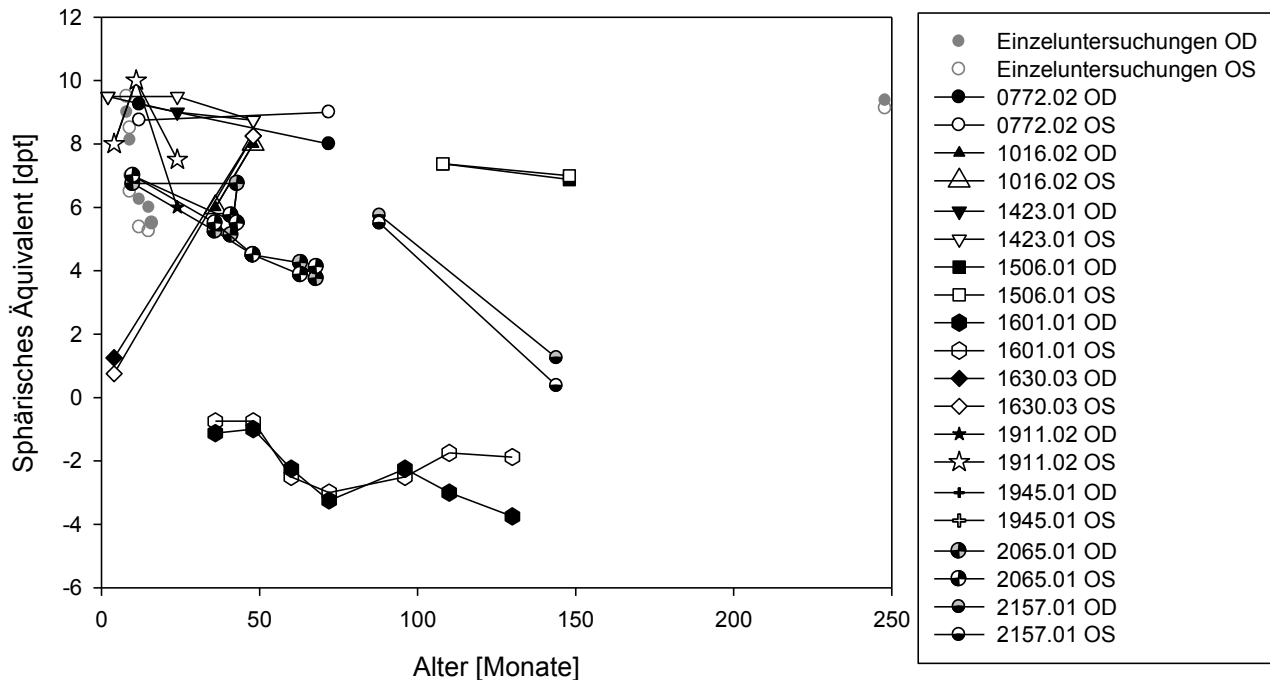


Abb. 5: Refraktion bei Patienten mit ursächlichen Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen

Die Refraktion wurde als sphärisches Element (Refraktion + 1/2x Zylinder) berechnet und gegen das Alter aufgetragen.

Der einzige myope Patient (1601.01) wies gleichzeitig einen weniger stark reduzierten Visus auf (Tab. 19).

Elektrophysiologische Untersuchungen

Ganzfeld-ERG (ffERG)

Bei 17 (70,8%) der 24 Patienten wurde ein Ganzfeld-Elektroretinogramm (ffERG) nach ISCEV-Standard durchgeführt. 14 Patienten wurden einmal untersucht. Bei zwei Patienten wurden zwei und bei einem Patient vier Untersuchungen durchgeführt. Das ffERG von 13 (76,5%) der 17 Patienten mit identifizierten Sequenzvariationen und durchgeführter Untersuchung zeigten Antworten unter der Nachweisgrenze, sowohl bei skotopischen als auch photopischen Ableitungsbedingungen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass beide Photorezeptorsysteme, die Stäbchen und die Zapfen, schwer durch die veränderten Genprodukte betroffen waren [19; 33; 59; 60].

Restantworten konnten bei drei Patienten (Patient 1423.0, vier Jahre; Patient 2065.01, zehn Monate; Patient 2359.0, neun Monate) am rechten Auge gemessen werden, während am linken Auge die Amplituden der Ganzfeld-ERG-Antworten bereits unter der Nachweisgrenze waren.

Visuell-evozierte Potentiale (VEP)

Bei acht (33,3%) der 24 Patienten wurden je einmal visuell-evozierten Potentiale (VEP) abgeleitet. Bei fünf Patienten (0772.02, 1630.03, 1911.02, 2107.01 und 2359.01) wurde das VEP im ersten Lebensjahr abgeleitet und zeigte mit einer Ausnahme Antworten unter der Nachweisgrenze. Lediglich bei Patient 1630.03 konnten reproduzierbare Restantworten abgeleitet werden. Drei weitere Patienten (1264.01, 1506.01 und 2157.01) des Patientenkollektivs wurden nach dem ersten Lebensjahr untersucht. Hierbei waren die VEP mit Ausnahme von Patient 1506.01, der im Alter von neun Jahren noch Restantworten zeigte, unter der Nachweisgrenze.

Nystagmus

Ein Nystagmus wurde bei 21 (87,5%) der 24 Patienten dokumentiert. 11 Patienten wurden einmal untersucht, fünf zweimal, ein Patient dreimal, ein Patient viermal ein weiterer fünfmal, ein Patient sechsmal und ein Patient siebenmal.

Bei Patienten mit dokumentiertem Nystagmus wurde dieser als Zeichen eines sensorischen Defekts bereits innerhalb des ersten Lebensjahres dokumentiert bzw. bei der Erstvorstellung im weiteren Verlauf der Kindheit.

Der Nystagmus stellte sich als Pendelnystagmus dar. Dabei war die Bewegung sowohl gleichmäßig als auch ruckartig oder verbunden mit einer rotatorischen Komponente.

Augenhintergrund

Für 21 (%) der 24 Patienten mit ursächlichen Sequenzvariationen lagen Daten über den Augenhintergrund vor. Für 15 (62,5%) der 24 Patienten konnte die Funduskopie photographisch dokumentiert werden. Für 21 Patienten lagen Beschreibungen der Ergebnisse der Funduskopie vor. Hiervon wurden sechs Patienten einmal, acht Patienten zweimal, drei Patienten dreimal, ein Patient viermal, zwei Patienten fünfmal und ein weiterer Patient siebenmal untersucht.

Die Funduskopie ergab ein breites Spektrum an Augenhintergrundveränderungen. In den Fundusuntersuchungen wurde ein unauffälliger Augenhintergrund bei den ersten Untersuchungen im ersten Lebensjahr beschrieben. Ein fehlender Makulawall- und Foveolarreflex (Abb. 6 und 7) fand sich bei 12 Patienten. Pigmentverschiebungen, Pigmentepitheldefekte und Pigmentepithelatrophie sowie knochenkörperartige Pigmentverklumpungen waren bei fortgeschrittenen Stadien zu finden, während die Engstellung der Gefäße dagegen bereits sehr früh vorlag (Abb. 6 und 7).

Augenhintergrundveränderungen bei homozygoten Sequenzvariationen

Die häufigste gefundene Sequenzvariation, in den gescreenten Patienten, war die tief intronische Sequenzvariation im Intron 26 (c.2991+1655 A>G), die zur Nutzung einer kryptischen Spleißstelle führt.

3. Ergebnisse

Daten zur Funduskopie waren bei fünf (0668.01, 1601.01, 1630.03, 1945.01 und 2381.01) der sieben Patienten, mit homozygoter Sequenzvariation im Intron 26, vorhanden. Die Untersuchungen wurden zwischen dem vierten Lebensmonat und dem achten Lebensjahr durchgeführt. Eine Photodokumentation des Augenhintergrundes war nur bei zwei der sieben Patienten möglich. Veränderungen im Bereich der Makula und/oder in der Peripherie wurden bei jedem der fünf Patienten mit homozygoter Sequenzvariation im Intron 26 beschrieben (Tab. 19, Abb. 6). Pigmentveränderungen wurden im ersten Lebensjahr bei Patient 0668.01 (acht Monate, Tab. 19) und Patient 1630.03 (11 Monate, Tab. 19) beschrieben, während für andere Patienten (Patient 2381.01 im Alter von 1,4 Jahren, Patient 1945.01 mit 3,4 Jahren) in diesem Alter nur verengte Gefäße berichtet wurden. Patient 1601.01 (Abb. 6) und Patient 1945.01 wurden erstmals im dritten bzw. vierten Lebensjahr vorgestellt. Zu diesem Zeitpunkt hatten sich die Pigmentveränderungen der Makula bereits entwickelt. Patient 1601.01 (Abb. 6) wies ab dem sechsten Lebensjahr zusätzlich Knochenkörperchen in der Peripherie auf, die bei Patient 1630.03 bereits im elften Lebensmonat ausgeprägt waren und mit der vorliegenden Aderhautatrophie korrespondierten. Die Funduskopie zeigte bei Patient 1601.01 im Alter von drei Jahren als Zeichen einer progressiven Erkrankung ebenfalls eine Netzhaut- und Aderhautatrophie (Abb. 6). Patient 1423.01 wies eine homozygote Sequenzvariation im Exon 36 (c.4723A>T, p.K1573*) auf. Zwischen dem zweiten Lebensmonat und dem vierten Lebensjahr wurde der Patient vier Mal in der Spezialambulanz vorgestellt. Dabei wurden Pigmentveränderungen beschrieben (Abb. 6 und 8) und die Makula zeigte keinen Foveolarreflex. Allerdings wurde im vierten Lebensjahr ein Makulawallreflex beschrieben (Abb. 6).

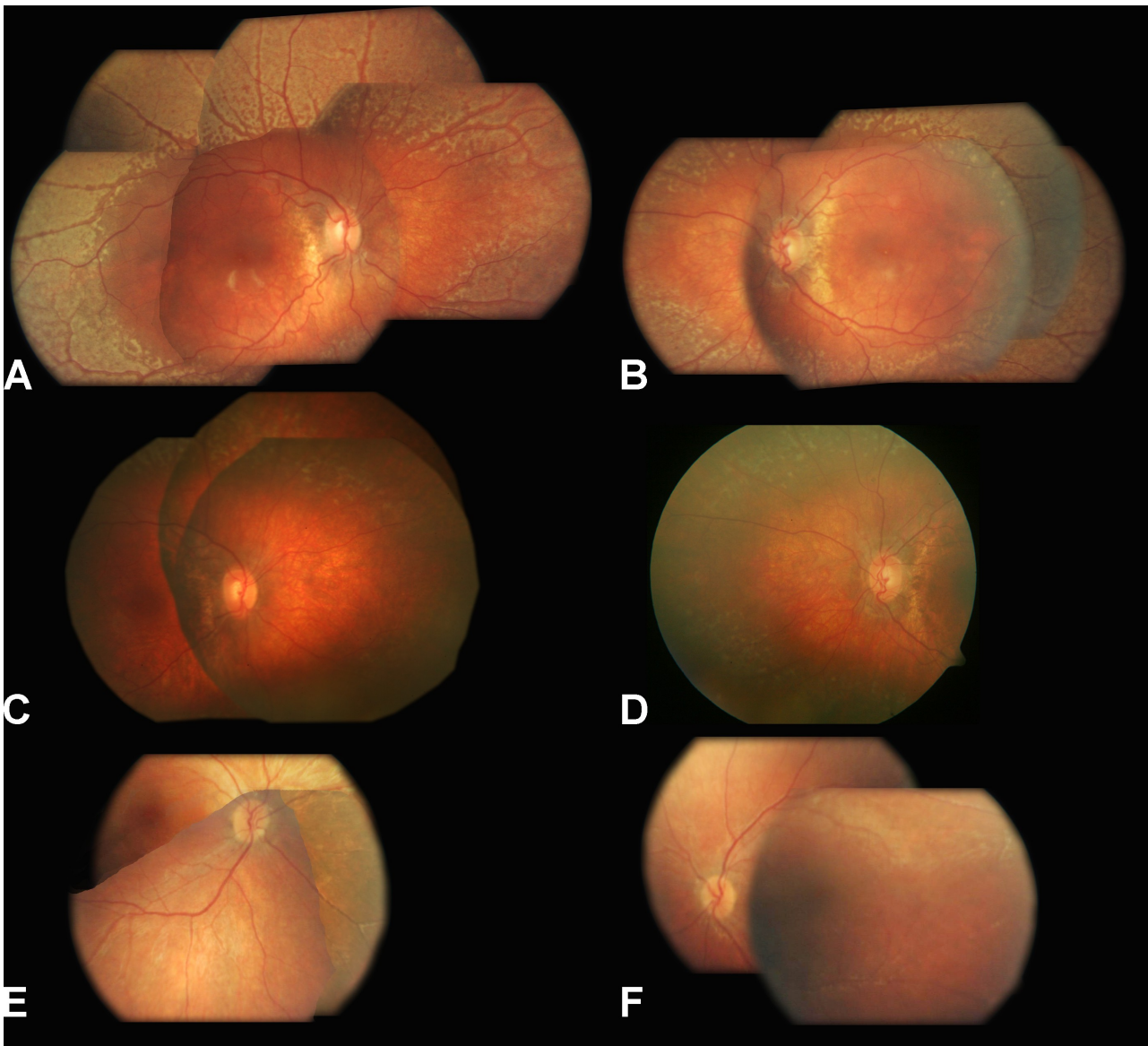


Abb. 6: Augenhintergrundveränderungen bei Patienten mit homozygoten *CEP290*-Sequenzvariationen

Patient 1601.01 (c.2991+1655A>G homozygot) mit besser erhaltenem Visus im Alter von 4,25 Jahren (A) rechtes Auge, B) linkes Auge) und 9,2 Jahren (C) rechtes Auge, D) linkes Auge). Es zeigt sich eine deutliche Netzhautdegeneration mit Aderhautatrophie bei ausgeprägten Pigmentveränderungen in der Peripherie. Die Makula ist hypoplastisch und ohne Wallreflex, Patient 1423.01 (c.4723A>T p.K1573*) homozygot) zeigt im Alter von 4,4 Jahren (E) rechtes Auge und F) linkes Auge) entsprechende Veränderungen.

(Mit freundlicher Genehmigung von Prof. B. Lorenz)

Damit folgen alle Patienten mit homozygoten Mutationen einer allgemeinen Entwicklung, sind aber trotz identischer ursächlicher Sequenzvariation unterschiedlich im ersten Auftreten und der Progression der Augenhintergrundveränderungen.

Augenhintergrundveränderungen bei compound heterozygoten Sequenzvariationen

15 der 24 Patienten mit identifizierten Sequenzvariationen wiesen compound heterozygote Sequenzvariationen auf. Der Augenhintergrund wurde bei 14 der 15 Patienten dokumentiert.

Für die Patienten 1016.02 (im dritten und vierten Lebensjahr) und 2803.01 (im dritten und fünfzehnten Lebensmonat) wurden keine Auffälligkeiten in der Funduskopie beschrieben.

Acht der 12 Patienten wiesen Pigmentveränderungen auf. Diese wurden zwischen dem ersten vierten Lebensmonat und dem 24. Lebensjahr beschrieben. Wie bereits bei den Patienten mit homozygoten Mutationen traten die Pigmentveränderungen während der ersten Lebensjahre auf (Patient 2065.01, Abb. 7). Bei vier der 12 Patienten (1506.01, 2276.01, 2359.01 und 2664.01) sind keine Pigmentveränderungen dokumentiert. Patient 2359.01 wies Flecken in der Peripherie auf. Knochenkörperchen wurden bei den Patienten 1506.01 (mit 14 Jahren), 1802.01 (mit 23,8 Jahren) und 1911.02 (mit 11 Monaten) dokumentiert. Verengte Gefäße wurden auch bei den Patienten mit compound heterozygoten Sequenzvariationen beschrieben. Bei sieben (Tab. 19, Abb. 7) der 12 Patienten konnte im Verlauf der Untersuchungen kein Makulawallreflex festgestellt werden. Diese Untersuchungen erfolgten hauptsächlich innerhalb des ersten Lebensjahres. Mit zehn Monaten wurde der Makulawallreflex bei Patient 2065.01 bereits als stark erniedrigt beschrieben wie auch mit acht Jahren. Patient 1911.02 zeigte in der Untersuchung mit vier Monaten einen Makulawallreflex, welcher in der Kontrolle mit 16 Lebensmonaten nicht mehr gesehen wurde. Nach Beschreibung eines Makulawallreflexes im Alter von fünf Monaten bei Patient 2677.01 wurde dieser in der Kontrolluntersuchung mit neun Monaten nicht mehr festgestellt. Eine weitere Auffälligkeit in den Augenhintergrundspiegelungen war eine Optikusatrophie. Diese wurde bei Patient 2276.01 mit 20 Jahren zusammen mit einer Netzhautatrophie und nicht vorhandenen Gefäßen beschrieben.

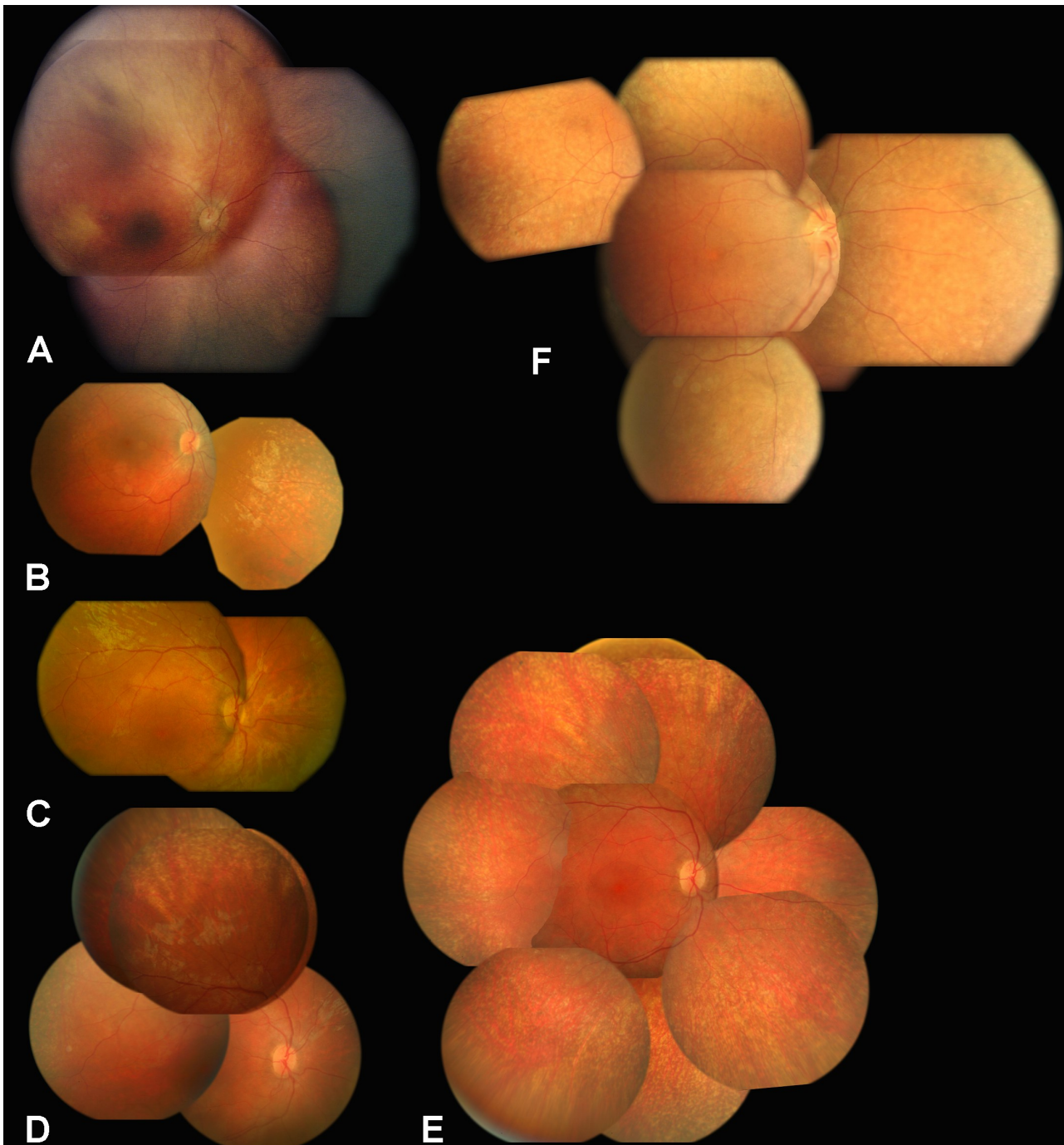


Abb. 7: Augenhintergrundveränderungen bei Patienten mit compound heterozygoten CEP290-Sequenzvariationen

Dargestellt sind die rechten Augen der Patienten A) 0772.02 (c.2991+1655A>G, c.5428A>C (p.N1810H)) im Alter von einem Jahr, B) Patient 2107.01 (c.2991+1655A>G, c.2119_2123dupCAGCT) im Alter von 4,8 Jahren, Patient 2065.01 ([c.3758G>A, (p.R1253H), c.5254C>T (p.R1752W)], c.2578G>T (p.G860*)) im Alter von C) 5,25 Jahren, D) 7,25 Jahren, E) 12 Jahren und F) Patient 1802.01 (c.2991+1655A>G, c.6277delG) im Alter von 23,8 Jahren.

(Mit freundlicher Genehmigung von Prof. B. Lorenz)

Zusammenfassend ist die Untersuchung des Augenhintergrundes, wie bereits bei den Patienten

3. Ergebnisse

mit homozygoten Sequenzveränderungen festgestellt, zwar in der Entwicklung vergleichbar, zeigte aber kein einheitliches Bild in der Progression und dem Beginn der einzelnen Symptome, auch wenn die jeweiligen Patienten die gleiche Sequenzvariation aufwiesen. Am häufigsten konnte bei den Patienten mit homozygoter und compound heterozygoter Sequenzvariation Pigmentveränderungen als Zeichen der Netzhautdegeneration und ein fehlender Makulawallreflex als Zeichen der Makuladegeneration festgestellt werden. Dies wurde vor allem im ersten Lebensjahr beschrieben, konnte aber auch erst im fortgeschrittenen Kindesalter auftreten.

Die Ergebnisse der Augenhintergrunduntersuchungen zeigen, dass die morphologischen Veränderungen, bei den in die Untersuchung eingeschlossenen Patienten, in keiner direkten Abhängigkeit zum Alter oder der genetischen Veränderung stehen.

Fundusautofluoreszenz

Die Fundusautofluoreszenz (FAF) wurde bei sechs (25%) der 24 Patienten mit ursächlichen Sequenzvariationen dokumentiert (Tab. 19, Abb. 8). Dabei wurden Daten zwischen dem vierten und dem 29. Lebensjahr erfasst. Die Patienten zeigten in jedem Untersuchungsalter, und unabhängig von der ursächlichen Mutation, einen auffälligen Ring erhöhter FAF um die Makula. Die FAF in der Makula blieb dabei etwas in der Intensität zurück, gegenüber in der Peripherie um den Ring erhöhten FAF. In der äußeren Peripherie stellt die FAF sich wieder erhöht dar und hatte einen scheckigen Aspekt (vgl. Fundusphotographie 1601.01 Abb. 8 und 2065.01 Abb. 8). Die FAF spricht für einen Erhalt des retinalen Pigmentepithels bei gleichzeitiger Degeneration der Photorezeptoren in den Bereichen erhöhter FAF. Die ringförmige FAF um die Makula findet sich regelmäßig bei Patienten mit Stäbchen-Zapfen-Degenerationen wie z.B. der Retinitis pigmentosa. Dort entwickelt sich die ringförmige FAF mit der fortschreitenden Erkrankung. Dies spricht für eine sehr frühe Degeneration bei den Patienten mit ursächlichen *CEP290* Sequenzvariationen. Die peripher erhöhte FAF spricht für eine sehr frühe Beteiligung der Stäbchen und deckt sich so mit der Beobachtung eines frühzeitigen Verlustes des Gesichtsfeldes [19; 33; 59; 60]. Alle Patienten, bei denen die FAF aufgezeichnet werden konnte, mit Ausnahme von 1911.02, hatten eine Lichtwahrnehmung und erreichten teilweise sogar einen Visus von 0,1 (Tab. 19).

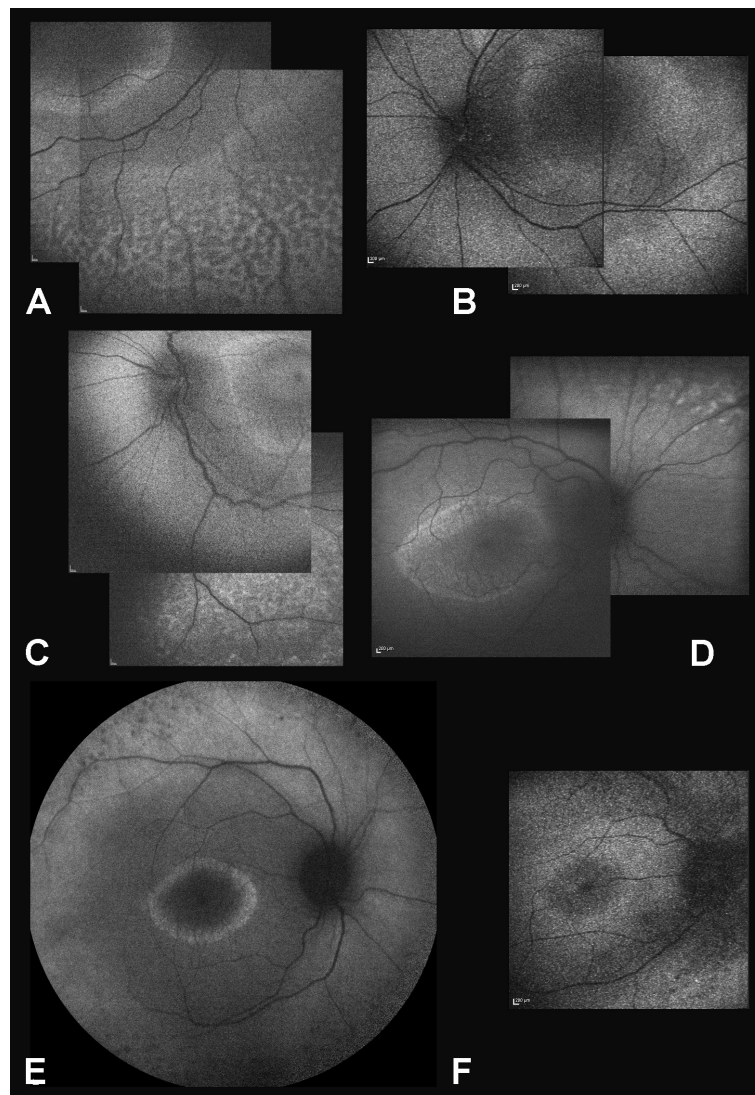


Abb. 8: Fundusautofluoreszenzdokumentation bei Patienten mit ursächlichen *CEP290*-Sequenzvariationen

A) Patient 1630.03 im Alter von 4,2 Jahren, B) Patient 1423.01 im Alter von 4,4 Jahren, C) Patient 1911.02 im Alter von 5,25 Jahren, D) Patient 1601.01 im Alter von 6,9 Jahren, E) Patient 2065.01 im Alter von 12 Jahren F) Patient 1802.01 im Alter von 23,8 Jahren.

(Mit freundlicher Genehmigung von Prof. B. Lorenz)

Spectral-Domain Optische Kohärenztomographie (OCT)

Bei sechs (25%, Tab. 19) der 24 Patienten des Patientenkollektivs mit ursächlichen Sequenzvariationen konnten OCT-Untersuchungen durchgeführt werden. Die geringe Zahl der Untersuchten lag vor allem an der Mitarbeit der Patienten, die aufgrund des Patientenalters und des Nystagmus erschwert war.

Die Patienten waren bei den Untersuchungen zwischen drei und 81 Jahre alt.

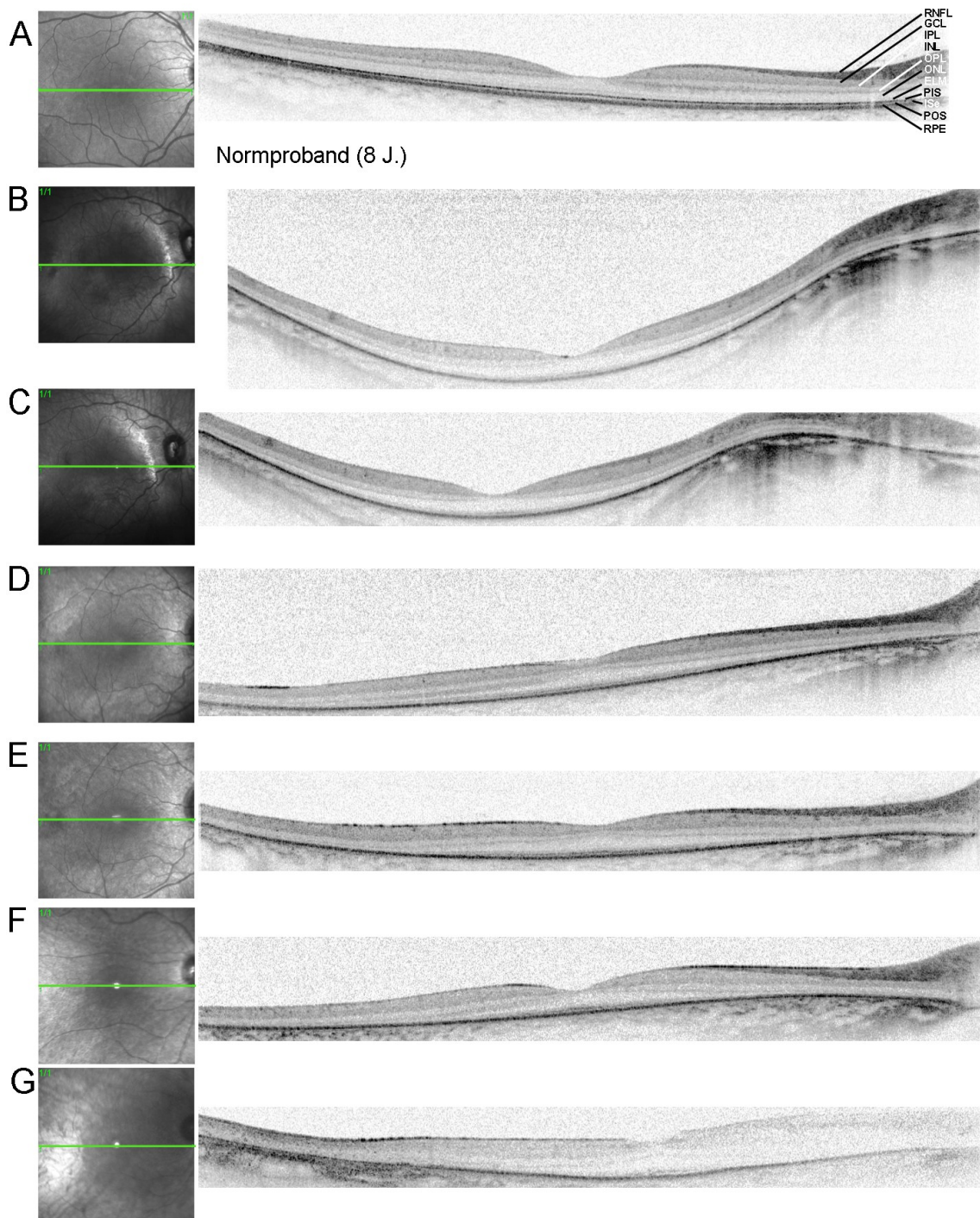


Abb. 9: Spectral-Domain optische Kohärenztomographie (SD-OCT) bei Patienten mit ursächlichen Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen

Die Abbildung zeigt exemplarisch SD-OCT-Aufnahmen als Einzelscan durch die Makula des rechten Auges von vier Patienten in verschiedenen Altersstufen. In Abbildung A) ist zum Vergleich ein Normalbefund im Alter von 8 Jahren dargestellt. B) und C) zeigen die Netzhautschichtung von Patient 1601.01 (c.2991+1655A>G homozygot) im Alter von 5,9 (Visus: 0,15) und 8,2 Jahren (Visus: 0,19). D) zeigt die Netzhautschichtung von Patient 2065.01 ([c.3758G>A, (p.R1253H), c.5254C>T (p.R1752W)], c.2578G>T (p.G860*)) im korrespondierenden Alter von 5,25 (Visus: 0,125) und E) von 12 Jahren (Visus: 0,1). F) zeigt die Netzhautschichtung von Patient 1945.01

3. Ergebnisse

(c.2991+1655A>G homozygot) im Alter von 9,8 Jahren (Visus: Handbewegungen) und G) zeigt einen fortgeschrittenen Befund bei Patientin 2428.01 (c.4723A>T (p.K1573*) homozygot) im Alter von 81 Jahren (Visus: 0,1).

(Mit freundlicher Genehmigung von Prof. B. Lorenz)

Für die Patienten 1601.01 und 2065.01 waren Untersuchungen im Verlauf der Erkrankung über fünf bzw. sieben Jahre dokumentiert. Dabei waren die ersten Aufnahmen von 1601.01 mit einem Time-Domain OCT-Gerät durchgeführt worden (TD-OCT, Stratus 3, Carl Zeiss Meditec Inc., Dublin, Calif., USA). Ein TD-OCT wurde ebenfalls für Patientin 1802.01 verwendet, während Patient 2863.01 mit einem handgehaltenen Spectral-Domain-Gerät (ENVISU, Biotigen, Leitz, Wetzlar) untersucht wurde. Alle weiteren OCT-Untersuchungen wurden mit einem stationären SD-OCT-Gerät (Spectralis, Heidelberg Engineering, Heidelberg) durchgeführt.

Die beschriebenen Veränderungen umfassten periphere degenerative Veränderungen im Bereich der äußeren Netzhautschichten, eine generelle Reduktion der Netzhautdicke und eine reduzierte Darstellbarkeit der Schichtung der Netzhaut (Abb. 9). Dabei waren die Schichten, die den Photorezeptoren zugeordnet sind (POS, ISe, PIS, ELM, ONL, OPL), außerhalb der Makula deutlich reduziert bzw. mit zunehmender Peripherie nicht mehr nachweisbar. Zentral in der Fovea fanden sich bei allen Patienten darstellbare Reste der photorezeptorassoziierten Schichten. Dabei waren die verbliebenen Schichten der Photorezeptoraussensegmente deutlich in ihrer Struktur verändert und auf einen kleinen Bereich der Fovea beschränkt. Die verbleibende Netzhautschichtung korreliert dabei gut mit der erhaltenen Sehschärfe der Patienten [19; 33; 59; 60].

Extraokuläre Symptome

Bei acht Patienten (33,3%) der 24 Patienten mit ursächlichen Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen wurden zusätzliche Symptome außerhalb des Auges beschrieben (Tab. 19).

Dazu gehörten Autismus, Ataxie, Diabetes mellitus Typ I, Asthma bronchiale und van Willebrand Syndrom I, motorische Entwicklungsverzögerung, Muskelhypotonie, Sprachentwicklungsverzögerung und eine schwere allgemeine Entwicklungsstörung mit Störung des sozialen Interaktionsverhaltens sowie globale Entwicklungsretardierung.

Extraokuläre Symptome im Umfang eines Joubert Syndroms, das ebenfalls mit *CEP290*-Sequenzvarianten assoziiert ist, wurden mit Ausnahme verschiedener Entwicklungsverzögerungen nicht beschrieben. Vor allem ziliopathieassoziierte Nierenbefunde lagen nicht vor [3; 14; 21; 27; 40; 56].

Ethnische Herkunft, Familienanalyse

Angaben zur Herkunft der Patienten oder einer eventuellen Konsanguinität der Eltern lagen für alle Patienten vor. Die ethnische Herkunft ist unter dem Aspekt von Interesse, dass die

3. Ergebnisse

Allelfrequenzen der genetischen Variationen, je nach Herkunftsland, verschieden sein können und, dass der genetische Hintergrund unter der Fragestellung extraokulärer Symptome bei Ziliopathien herkunftsbedingt und im Rahmen ethnischer Vorschriften bei der Partnerwahl zusätzliche Risiken aufweisen kann. Eine Konsanguinität der Eltern z.B. führt zu einem erhöhten Risiko des Kindes, an einer genetischen Erkrankung zu erkranken [7; 15; 28; 33; 48; 52; 53; 61; 63].

Deutscher Abstammung waren 16 Patienten und drei Patienten waren österreichischer Abstammung. Ein Patient war deutsch-spanischer Herkunft. Ein Patient stammte aus Dänemark und drei Patienten hatten türkische Wurzeln. Eine Konsanguinität der Eltern lag lediglich bei einem Patient türkischer Herkunft vor. Hier lag zusätzlich eine allgemeine Entwicklungsverzögerung vor.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Genotypisierung von Patienten mit frühkindlicher Netzhautdegenerationen zur Korrelation des phänotypischen Spektrums mit Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen.

Dieser Screeninguntersuchung lagen DNA-Proben von 176 Patienten zugrunde. Gemeinsam war diesen Patienten eine frühkindliche Netzhautdegeneration.

Aus dem vorliegenden Patientenkollektiv wiesen von den 176 Patienten insgesamt 38 Patienten (21,6%) Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen auf.

Von den Betroffenen mit ursächlichen Mutationen waren neun Patienten männlichen Geschlechts (37,5%) und 15 waren weiblichen Geschlechts (62,5%). Da die Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung verursachen, ist die Geschlechtsverteilung unter den Patienten mit ursächlichen Sequenzvariationen als zufällig zu betrachten [4; 12; 23; 24].

Die Einstiegsdiagnose der 24 Patienten mit ursächlichen Sequenzvariationen unterteilte sich in 14 Patienten (58,3%) mit LCA und zehn Patienten (41,7%) mit EOSRD. Gemeinsam war allen Patienten, dass sie an einer schweren Sehbeeinträchtigung mit frühem Beginn litten. LCA ist die häufigste isolierte Augenerkrankung mit schwerer Sehbeeinträchtigung bei frühkindlicher Netzhautdegeneration [4; 5; 8; 10; 11; 12; 13; 14; 23; 31; 39; 43; 47]. LCA stellt auch im Patientenkollektiv dieser Screeninguntersuchung die häufigste Diagnose dar. Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen insofern mit der Literatur überein, dass Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen mit eine der häufigsten Ursachen (15% [37] bzw. 6-22% [70]) für die schweren frühkindlichen Netzhautdegenerationen darstellt und aufgrund der Diagnose in den ersten Lebensmonaten in die Gruppe der LCA eingeordnet wird [37; 54; 55; 70]. Mit einem Nachweis ursächlicher Mutationen bei 13,6% der untersuchten Patienten in dieser Studie decken sich die Ergebnisse mit den Literaturvorgaben [4; 5; 8; 10; 11; 12; 13; 14; 23; 31; 37; 39; 43; 47; 70].

4.1. Technische Bewertung

4.1.1. Bewertung der Single Strand Conformation Polymorphismus (SSCP)-Analyse

Die SSCP-Analyse ist ein sensitives Verfahren zur Durchführung eines genetischen Screenings von PCR-Produkten auf Sequenzvariationen. Ausschlaggebend ist hier die Konformationsänderung in mutierten PCR-Produkten, die eine Änderung des Laufverhaltens und folglich des Bandenmuster in einer Acrylamid-Gelelektrophorese erzeugt [29; 42; 63]. Die Durchführung der SSCP-Analyse bot sich bei der Größe der Patientenkohorte (176 DNA-Patienten-Proben) dieser Screeninguntersuchung an. Mit jedem SSCP-Gelansatz wurden je nach Kammgröße 24 - 36 Patientenproben abgearbeitet.

Um die Kosten der Sequenzierung zu verringern, erfolgt zur Eingrenzung der Anzahl der Proben die Durchführung der SSCP-Analyse, da diese einfach in der Handhabung und kostengünstig ist. Bei Fragmenten bis 200 bp besteht, laut Literatur, eine Sensitivität von ca. 80% [29; 42; 63].

4. Diskussion

Mit zunehmenden Größen des PCR-Produktes nimmt die Sensitivität ab. Je größer die Anzahl der Basenpaare eines PCR-Produktes ist, umso langsamer ist die Laufgeschwindigkeit und umso länger ist die benötigte Laufzeit für eine optimale Aufspaltung zur Darstellung der DNA-Bandenmuster. Hierbei verringert sich die Rate der detektierten Sequenzvariationen [29; 42; 63].

Die Problematik der Abnahme der Sensitivität bei Zunahme des PCR-Produktes verdeutlicht sich in dieser Arbeit an den Exonen 10 (372 bp), 16/17 (370 bp) und 54 (389 bp). Um bei allen Patienten verwertbare Ergebnisse in diesen drei Exonen zu erreichen, waren mehrere Gelläufe nötig. Die Gelläufe erfolgten unter verschiedenen Laufbedingungen sowie auf SSCP-Gelen verschiedener Gelstärke (Tabelle 11). Exon 54 war für das Screenen durch die SSCP-Analyse nicht optimal geeignet. Zur Darstellung der Bandenmuster der PCR-Amplifikate waren viele Wiederholungsläufe auf 8% und 10%+6% Maxigelen nötig. Die Laufbedingungen variierten von 0,5 oder 1xTBE, 35 mA oder 45 mA sowie in der Laufzeit (8%-Gel: 960-1090 min., 10%+6%-Gel: 660-840 min.).

Patient 1264.01 wies in der SSCP-Analyse im Intron 26 ein unauffälliges Bandenmuster auf. Hierbei würde prinzipiell keine Sequenzierung erfolgen. Jedoch konnte durch die Sequenzierung der Patienten-Probe 1264.01 im Intron 26 die Sequenzvariation c.2991+1655A>G (p.C998*) identifiziert werden. Hierbei war in dieser Arbeit die Nachweisempfindlichkeit der SSCP nicht gegeben, obwohl Intron 26 eine kleinere Basenpaar-Anzahl besitzt (245 bp).

Hiermit verdeutlicht diese Screeninguntersuchung, dass die SSCP-Analyse keine hundertprozentige Sensitivität besitzt, auch nicht in Bereichen kleinerer Basenpaar-Anzahl.

Des weiteren ist nachteilig, dass die Position der Sequenzvariation nicht durch die Bandenmuster angezeigt wird.

Nicht zu vernachlässigen war, dass der SSCP-Analyse eine PCR zur Herstellung der analysierten DNA-Fragmente vorausgehen muss. Hierbei besteht die Gefahr, dass die DNA-Amplifikate unspezifisch mutieren, weil die Amplifikation nicht vollständig vorbildgetreu abläuft. Der Einsatz von DNA-Polymerasen mit Proofreading-Aktivität vermied dies soweit, dass die Anzahl der veränderten PCR-Produkte keinen ausreichenden Umfang annahm, um in der SSCP-Analyse dargestellt werden zu können [29; 42; 48; 63; 74].

4.1.2. Bewertung der High Resolution Melting (HRM)-Analyse

Die HRM-Analyse ist ein weiteres hier angewandtes Verfahren zur Screening-Untersuchung von PCR-Produkten auf Sequenzvariationen.

Dieses Verfahren besitzt eine hohe Sensitivität, um Sequenzvariationen zu detektieren. In Bezug auf die Durchführungsdauer stellt sie eine schnellere Untersuchungsmöglichkeit als die SSCP-Analyse dar. Des weiteren ist die HRM-Analyse nicht auf einen bestimmten Basenpaar-Größenbereich beschränkt. Hier besteht die Möglichkeit, Größenbereiche, die in der SSCP-Analyse nicht mehr optimal durchführbar sind oder reduziert verwertbare Ergebnisse erbringen,

durch die High Resolution Melting Analyse zu untersuchen [16; 34; 57; 69; 72].

Die einzelnen Schritte der HRM-Analyse, wie in Abschnitt 2.4.2.6. dargestellt, erfolgen nacheinander im selben Reaktionsgefäß. Der Vorteil, im Gegensatz zur SSCP, besteht darin, dass die Amplifikation und HRM-Analyse eines PCR-Ansatzes nacheinander im selben Gefäß erfolgt und somit im selben Reaktionsansatz, was einen großen Zeitgewinn bietet. Die Überprüfung der hergestellten PCR-Amplifikate auf einem Agarosegel muss zusätzlich erfolgen, um unspezifische PCR-Produkte zu identifizieren und die Schmelzkurven interpretieren zu können. Hierbei wird ersichtlich, dass im Gegensatz zur SSCP der Zeitfaktor und Arbeitsaufwandfaktor deutlich verringert sind. Weiterhin können mehr PCR-Amplifikate in einem Lauf der High Resolution Melting Analyse (96 Slots) gescreent werden (Faktor 2 bzw. 1,3), als durch einen Lauf eines 8% (48 Proben/ Lauf) oder 10%+6% Maxi-SSCP-Gels (72 Proben / Lauf) [16; 34; 57; 69; 72].

Nachteilig ist hier zu erwähnen, dass die Kosten der HRM-Analyse, die der SSCP-Analyse übersteigen, da die notwendigen Thermocycler teurer in der Anschaffung und Unterhaltung sind. Der weiteren stellt der verwendete Fluoreszenzfarbstoff LC-Green I einen deutlichen Kostenfaktor dar. Jedoch ist der Zeitfaktor in der Durchführung deutlich geringer als im Ablauf mit PCR, SSCP-Gel und Sequenzierung. Weiterhin ist die Analyse der Schmelzkurve wiederholbar. In der Zusammenschau verringert sich hierbei der Kostenfaktor im Verlauf der vermehrten Durchführungen [16; 34; 57; 69; 72].

Technisch konnte der Ansatz nicht optimal durchgeführt werden, weil ein optimales Temperaturprofil innerhalb des Cyclers nicht erreicht wurde. Hierbei mussten mehrere Wiederholung zur Optimierung erfolgen.

Weiterhin kann festgehalten werden, dass mit Hilfe der HRM-Analyse nicht so viele Sequenzvariationen wie mit der SSCP-Analyse detektiert werden konnten. Jedoch kann hier kein optimaler Vergleich gezogen werden, da mit der Durchführung der SSCP-Analyse nicht dieselben Exone und Introne gescreent wurden wie mit der HRM-Analyse. Die HRM-Analyse diente der Untersuchung der Exone mit vielen Basenpaaren. Die SSCP war bei dieser Basenpaarzahl nicht mehr sensitiv genug.

4.2. Pathogenes Potential der Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen

CEP290 wird bisher als Protein beschrieben, das an den Zentrosomen und an der Basis von primären und sekundären Zilien nachgewiesen wurde [5; 8; 13; 24; 31; 39; 47]. *CEP290* ist zwischen der äußeren Mikrotubulus-Dublette und der Übergangzone zu finden. Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen können zu Defekten in den Y- und keilförmigen Verankerungen innerhalb der Übergangzone führen, wobei die quer gerichteten Y-förmigen Verankerungen der Faserproteine fehlen und die keilförmigen längs gerichteten Strukturen fehlen oder zusammengebrochen sind [5; 13]. Das Resultat ist eine Reduzierung der Verbindung der Zilienmembran mit der Mikrotubulus-Dublette [5; 13; 43]. Dies stört das Gleichgewicht im IFT,

4. Diskussion

welcher über das verbindende Zilium den Austausch und Transport von Proteinen aus dem inneren in das äußere Segment der Photorezeptoren durchführt [5; 13; 43]. Hierbei erfolgt die Versorgung des Außensegments der Photorezeptoren mit Proteinen zur Herstellung, Aufrechterhaltung und Stabilisierung der Membranscheiben des äußeren Segments [4; 5; 8; 13; 24; 31; 43; 47].

Weiterhin erfolgt der Transport von Proteinen, die an der Phototransduktion beteiligt sind, wie Opsin, Rhodopsin und Arrestin. Eine Sequenzvariation im *CEP290*-Gen kann ein Ungleichgewicht dieses Transportes hervorrufen [4; 5; 8; 13; 31; 43].

Das Tiermodell der rd16 Maus (retinal degeneration 16 mouse model) umfasst Mäuse mit einem Phänotyp, der einer frühen Netzhautdegeneration mit autosomal-rezessiver Vererbung (Frameshift-Deletion: Aminosäure 1599-1897) ähnelt [4; 8; 13]. Die rd16 Mäuse beginnen am 18. postnatalen Tag eine Verringerung der Stäbchen- und Zapfenfunktion aufzuweisen [4]. Hier konnte die Lokalisation von *CEP290* und deren Beteiligung am Transport der Phototransduktion beteiligten Proteinen bestätigt werden. Durch die Sequenzvariation im *CEP290*-Gen wurde ein Fehltransport von Opsin erzeugt. Ein direkter Effekt durch die Sequenzvariation auf die Mikrotubulus-Dublette-Motorproteine (Dynein, Kinesin II) konnte hierbei nicht nachgewiesen werden [4; 8; 13]. Eine vergleichbare Sequenzvariation wies das Patientenkollektiv dieser Arbeit nicht auf. Allerdings waren 16 der 24 Sequenzvariationen kleine Leserasterverschiebungen und Nonsense-Mutationen, die zu einem Verlust des Genproduktes führten und damit funktionell der Mutation im rd16 Modell glichen.

Die Umverteilung von Proteinen, die an der Phototransduktion beteiligt sind, sehen Craige und Mitarbeiter als ursächlich für die Degeneration der Netzhaut an [8; 13].

Ein weiteres Tiermodell lag bei Katzen (rdAc Katzen) vor. Ebenso wie die rd16 Mäuse war der Phänotyp der rdAc Katzen, dem einer frühen Netzhautdegeneration vergleichbar. Bei den rdAc Katzen wurde die Sequenzvariation durch einen aberranten Spleißvorgang im Intron 50 hervorgerufen [4]. In dieser Arbeit waren drei der 24 detektierten Sequenzvariation Splice Site-Mutationen und damit der Mutation im rdAc-Katzenmodell vergleichbar. Unter anderem fällt darunter die häufigste nachgewiesene Sequenzvariation des *CEP290*-Gens (c.2991+1655A>G).

Für diese existiert ein Zebrafischtiermodell. Hier wurde die Sequenzvariation im *CEP290*-Gen der Zebrafische erzeugt. Die betroffenen Tiere wiesen Körperkrümmungsdefekte, eine Größenreduktion des Kupfferschen Vesikels und eine Sehkraftminderung auf. Die phänotypische Ausprägung der genannten Merkmale war unterschiedlich [4]. In den aktuell untersuchten Patienten stellte die Sequenzvariation im Intron 26 (c.2991+1655A>G) ebenfalls die häufigste Sequenzvariation im *CEP290*-Gen dar. Die Patienten dieser Arbeit wiesen auch eine schwere Sehbeeinträchtigung auf. Die schwere Sehbeeinträchtigung reichte von „keine Reaktion auf helles Licht“ bis „Reaktion auf helles Licht“ (Lichtscheinprojektion, Handbewegung) und lesefähigem Visus (bis 0,3). Skelettveränderungen wurden nicht dokumentiert.

Baye und Mitarbeiter berichten, dass die N-terminale Region für die Veränderungen im Visus verantwortlich ist. Der Erhalt der N-terminalen Region von *CEP290* reichte aus, um bei den

4. Diskussion

Zebrafischen die Sehkraftminderung zu verhindern [4]. Im Gegensatz dazu wurden in den Tiermodellen rd16 Maus und rdAc Katze Veränderungen der C-terminalen Region die Eigenschaft zugesprochen, die Sehkraft zu beeinträchtigen. Die C-terminale Region zeigte sich in dem Zebrafisch-Modell verantwortlich für die Ausbildung der Körperachse [4; 13]. Eine mögliche Schwäche oder Instabilität im Bereich der N- und C-terminalen Regionen sehen Baye und Kollegen als ursächlich an, um eine Veränderung der Eigenschaft oder der Lokalisation eines interagierenden Proteins hervorzurufen [4].

Die genaue Bedeutung von *CEP290* in der menschlichen Retina, wie auch in primären Zilien, ist noch nicht abschließend geklärt [3; 4; 5; 8; 13; 31; 43; 47].

Die Domänen des *CEP290* werden in 13 coiled-coil, drei homologe Tropomyosin-, eine hook-, sechs RepA/RepB und Proteinkinase enthaltene Domäne, eine homologe Myosinschwanzregion und eine BPNLS-Domäne (zweigeteiltes Lokalisierungssignal), ein nukleäres Lokalisierungssignal sowie ein ATP/GTP Bindungsmotiv (P-loop) unterteilt [4; 8; 11; 12; 23; 24; 39; 47]. Weiterhin lässt sich im mittleren Bereich des Proteins eine strukturelle Homologie zu sogenannten SMC-Proteinen (Structural Maintenance of Chromosoms) nachweisen [8; 24; 39].

Die Bedeutung und Funktion aller Domänen, bindenden Regionen und derzeit bekannten Assoziationen mit weiteren Proteinen im *CEP290*-Gen erlauben keine Rückschlüsse auf das pathogene Potenzial [11; 12; 39].

Coiled-coil Domänen sind über das *CEP290*-Protein verteilt und können so an der Konformation von *CEP290* beteiligt sein. Außerdem können Sequenzvariationen in den Coiled-coil Domänen die Zugänglichkeit für interagierende Proteine beeinflussen [11; 12]. Wie Tabelle 13 und Abbildung 3 zu entnehmen ist, liegen die meisten Sequenzvariationen im Bereich einer coiled-coil Domäne.

11 der 15 Patienten mit compound heterozygoter Sequenzvariation tragen die Sequenzvariation im Intron 26 (c.2991+1655A>G) und eine weitere Sequenzvariation im *CEP290*-Gen. Die Sequenzvariation im Intron 26 (c.2991+1655A>G) ist die am häufigsten identifizierte Sequenzvariation in dieser Arbeit. Dies geht mit der Literatur überein [11; 12; 17; 23].

Die Spleißaktivität dieser kryptischen Spleißstelle ist nicht vollständig. Dadurch werden sowohl Produkte mit eingespleißtem Intron 26 erzeugt als auch korrekt gespleißte Produkte [23]. Der Umfang, in dem eine Photorezeptorzelle korrekt gespleißte Produkte mit entsprechender Funktion erzeugt, bestimmt damit die Aktivität der Photorezeptorzelle und die Progression der Degeneration. Dadurch unterliegen Patienten mit c.2991+1655A>G Sequenzvariation einer individuellen Ausprägung der Erkrankung [3; 11; 12; 14; 17; 21; 23; 27; 40; 56; 63; 75; 79; 80; 82].

Die Sequenzvariationen in Exon 23 und den Splice-Sites von Intron 26 und Intron 28 beeinflussen die SMC-homologe Domäne. Bei dieser Domäne ist eine Interaktion mit dem Retinitis pigmentosa-GTPase Regulator bekannt [8; 24; 39]. Die Sequenzvariationen in Exon 21 und den Splice-Sites von Intron 22, Intron 26 und Intron 28 beeinflussen die *CC2D2A* bindende Region. *CC2D2A* ist in

4. Diskussion

Zilien im Basalkörper nachgewiesen worden. Hier besteht eine Co-Lokalisation mit *CEP290*. *CC2D2A* weist eine strukturelle Ähnlichkeit mit *RPGRIP1* und *RPGRIP1L* auf. Autosomal-rezessiv vererbte geistige Retardierung, Retinitis pigmentosa, Nierenzysten und Ziliendysfunktion (wie Joubert-Syndrom) wurden mit Sequenzvariationen in *CC2D2A* bisher in Verbindung gebracht [14; 18]. Sequenzvariationen innerhalb der SMC-homologen Domäne wie auch in der *CC2D2A* bindenden Region führen zu pathologischen Veränderungen der Netzhaut. Ein Verlust der Interaktion mit *CC2D2A* würde daher den Phänotyp der Patienten dieser Arbeit bei Sequenzvariationen von Exon 23 und den Splice-Sites von Intron 26 und Intron 28 erklären [12; 14; 18; 39; 58].

18 der 24 Patienten mit homozygoter oder compound heterozygoter Sequenzvariation, die in dieser Arbeit detektiert wurden, besitzen mindestens eine Sequenzvariation im Intron 26 (c.2991+1655A>G). Alle gemeinsam weisen eine schwere Sehbeeinträchtigung auf. Bei Patient 1945.01 besteht der Hinweis auf eine mögliche Ziliendysfunktion. Dieser Patient weist eine schwere globale Entwicklungsretardierung auf. Wie ausgeprägt diese ist und ob weitere extraokuläre Veränderungen im Laufe der Erkrankung aufgetreten sind, kann der Patientenakte nicht entnommen werden. Patient 1630.03 wies eine Sprachentwicklungsverzögerung auf. Hier wäre von Interesse, ob diese auf einer Gehörverringerng bzw. einem Gehörverlust beruht. Aufgrund fehlender Kontrollen im Verlauf der Erkrankung und fehlender Stellungnahme zu weiteren extraokulären Veränderungen kann an dieser Stelle der Hinweis auf ein mögliches ziliopathieassoziiertes Syndrom nicht weiter geklärt werden. Nierenveränderungen sind bei den hier untersuchten Patienten nicht beschrieben. Die in der Literatur dargelegten Funktionsstörungen durch Sequenzvariationen, die im Bereich einer SMC-homologen Domäne und einer *CC2D2A* bindenden Region liegen, können bei den hier untersuchten Patienten nur teilweise festgestellt werden [12; 14; 18; 39; 58].

Exon 31, 35, 36 und 37 befinden sich auf der Rab8a bindenden Region. Rab8a spielt eine wichtige Rolle bei der Biogenese der ziliären Membran und reguliert Proteinkomplexe der beim Bardet-Biedl Syndrom veränderten Proteine [11; 12; 14; 31; 39]. Zehn der 24 Patienten wiesen homozygote oder compound heterozygote Sequenzvariationen in den Exonen 31, 35, 36 und 37 auf. Bei einem Patienten (2359.01) waren extraokuläre Symptome vorhanden. Der Patient zeigte motorische Entwicklungsverzögerungen. Motorische Entwicklungsverzögerungen können mit Ziliopathien in Verbindung gebracht werden. In dem Symptomkomplex des Bardet-Biedl-Syndroms ist die motorische Entwicklungsverzögerung zu finden [12; 40; 45]. Hier ist bei einem Patienten eine Übereinstimmung mit der in der Literatur beschriebenen Funktion der Rab8a bindenden Region anzunehmen. Weitere Aussagen können aufgrund nicht erhobener Informationen zu den Patienten aktuell nicht getroffen werden. Bei den weiteren acht der zehn Patienten ist kein extraokuläres Symptom beschrieben worden. Die hier betroffenen Patienten bestätigen die beschriebene

4. Diskussion

Funktionsstörung bei einer Sequenzvariation in der Rab8a bindenden Region teilweise [11; 12; 39; 58]. In diesem Zusammenhang kann davon ausgegangen werden, dass eine Sequenzvariation in der Rab8a bindenden Region nicht ausschließlich einen Symptomkomplex hervorruft.

Die Sequenzvariationen im Exon 21 und 23 und der Splice-Site im Intron 22 beeinflussen den Bereich der *NPHP5* bindenden Region. *NPHP5* ist verbunden mit ziliopathieassoziierten Erkrankungen, wie das Joubert-Syndrom. *NPHP5* bindet einen Komplex mit *RPGR^{ORF15}* [11; 12]. Von den in dieser Arbeit untersuchten Patienten ist bei Patient 2276.01 Autismus festgestellt worden. Autismus wird eher dem Bardet-Biedl-Syndrom zugeschrieben, jedoch stellt es kein Diagnosekriterium dar [12; 40; 45]. Die weiteren Patienten wiesen keine extraokulären Symptome auf. Hier besteht keine eindeutige Übereinstimmung mit der bisher identifizierten Funktion der *NPHP5* bindenden Region. Jedoch fehlen Kontrolluntersuchungen in den Patientenakten, ob im Verlauf der Erkrankung weitere extraokuläre Symptome möglicherweise aufgetreten sind. Das Ziel dieser Arbeit bestand nicht in der Identifizierung von extraokulären Symptomen im Verlauf des Lebens der eingeschlossenen Patienten. Jedoch kann an dieser Stelle nicht geklärt werden, ob weitere Funktionen der *NPHP5* bindenden Region bestehen und wie stark diese ausfallen.

4.3. Vergleich des Phänotyps der *CEP290*-Patienten

In dieser Arbeit wurden DNA-Proben von 176 Patienten untersucht. Bei 38 Patienten (21,6%) konnten Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen identifiziert werden. Die 38 Patienten mit identifizierten Sequenzvariationen besaßen verschiedene Diagnosen. Diese unterteilten sich in 25 Patienten (65,7%) mit LCA, zehn Patienten (26,3%) mit EOSRD, zwei Patienten (5,3%) mit CRD und ein Patient (2,63%) mit RP (autosomal-rezessiv). Die Verteilung der Diagnosen in der hier dargelegten Screeninguntersuchung geht mit den in der Literatur beschriebenen prozentualen Verteilung überein. LCA ist die häufigste isolierte Augenerkrankung mit schwerer Sehbeeinträchtigung. *CEP290* ist eines der Gene, das die häufigste Ursache (15%) für LCA darstellt [11; 37; 46; 54; 55]. Dies spiegelt sich in der Verteilung der Diagnosen in den hier identifizierten Patienten wieder.

Im autosomal-rezessiven Erbschema benötigen einfach heterozygote Sequenzvariationen auf einem Allel eine weitere Sequenzvariation auf dem zweiten Allel, um eine phänotypische Ausprägung hervorzurufen. Das zweite Allel kann die gleiche Sequenzvariation (homozygot) oder eine andere Sequenzvariation (compound heterozygot) tragen. Sind beide Allele verändert, führt dies zu einer phänotypischen Ausprägung [7; 28; 48; 52; 53; 61; 63]. Aufgrund dessen beziehen sich die weiteren Ausführungen auf die Patienten mit homozygoter und compound heterozygoter Sequenzvariation, wie im Ergebnisteil erfolgt (Tabelle 19). Das waren in dieser Arbeit 24 Patienten. Bei 22 der 24 Patienten mit homozygoter und compound heterozygoter Sequenzvariation waren Patientenakten vorhanden.

Alle Patienten im untersuchten Kollektiv hatten eine frühkindliche Netzhautdegeneration

gemeinsam, die sich in einer frühkindlichen schweren Sehbeeinträchtigung ausdrückte.

Die Altersspanne bei Durchführung der Untersuchungen reichte von zwei Lebensmonaten bis 81 Lebensjahre. 13 der 22 Patienten wurden innerhalb des ersten Lebensjahres an der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde des Universitätsklinikum Gießen vorstellig. Hauptsächlich waren die 22 Patienten einmal bis zweimal vorstellig (je acht Patienten). Die sechs weiteren der 22 Patienten wurden drei- bis sechsmal untersucht.

Das Alter der Patienten bei der Untersuchung und das Stadium der Erkrankung definierten den Umfang der durchführbaren Untersuchungen. Zusätzlich handelt es sich um eine retrospektive Auswertung, wodurch sich die Phänotypisierung auf eine Querschnittsdarstellung beschränkt.

Lichtwahrnehmung, Visus

Die weiteren Angaben beziehen sich auf die 22 der 24 Patienten mit homozygoter und compound heterozygoter Sequenzvariation. 11 Patienten reagierten bei der Untersuchung innerhalb des ersten Lebensjahres nicht auf Lichtreize, aber nur bei einem ist dokumentiert, dass eine fehlende Lichtwahrnehmung in der weiteren Entwicklung anhielt. Hier kann von einer frühzeitigen und schweren Sehbeeinträchtigung ausgegangen werden, die schnell und stark vorangeschritten sein muss oder die Photorezeptoren so stark betraf, dass sie ihre Funktion nicht aufnehmen konnten. Bei allen weiterhin untersuchten Patienten, bis auf einen, entwickelte sich in den folgenden Jahren zumindest eine Lichtscheinwahrnehmung bis hin zur Wahrnehmung von Handbewegungen. Eine Reaktion auf einen Reiz setzt voraus, dass der Reiz als solcher erkannt wird. Es ist anzunehmen, dass die fehlende Reaktion auf Lichtreize im ersten Lebensjahr eher durch ein nicht Erkennen des Lichtes als Reiz zustande kommt und der Lichtreiz erst mit zunehmender geistiger Entwicklung als Information erkannt wird und eine Reaktion erzeugt. Dies zeigt sich auch bei den wenigen Patienten, die eine Sehschärfe von 0,1 und besser entwickelten. Für diese Sehschärfe muss der Patient aktiv mitarbeiten und kann daher in den ersten Lebensjahren bei eingeschränkter Sehschärfe diese nicht voll für das Testverfahren nutzen [19; 28; 30; 52; 53; 59; 60; 62]. Bemerkenswert ist allerdings, dass zwei der Patienten, die diese Sehschärfe erreichten und lange halten konnten, homozygot von den beiden häufigsten Mutationen in dieser Patientenkohorte (c.2991+1655A>G und c.4723A>T) betroffen waren. Beide Mutationen gingen aber mit einer schweren Seheinschränkung in den anderen Mutationsträgern einher. Während c.2991+1655A>G wie oben erwähnt einen gewissen variablen Anteil des unveränderten Genproduktes bildet und so die Funktion zumindest teilweise herstellen kann, ist für die Nonsense-Mutation c.4723A>T mit einem völligen Verlust des Genproduktes zu rechnen. In wieweit hier funktionell Alternativen zum Tragen kommen können, ist derzeit nicht bekannt [7; 9; 11; 12; 23; 28; 63; 71; 75; 79; 80; 82].

Die variable Ausprägung der Sehschärfe wurde bereits in der Literatur beschrieben [11; 12; 17; 23; 37; 70].

Zwei (1630.02 und 1911.02 (9,09%)) der 22 Patienten wiesen das oculo-digitale Phänomen auf. Von dem oculo-digitalen Phänomen wird angenommen, dass die Patienten damit Seheindrücke

erzeugen, wenn ihre Sehschärfe besonders stark reduziert ist, wie es bei den genannten Patienten der Fall war. Dies stimmt mit der Literatur überein. Auch dort wurde das oculo-digitale Phänomen bei Patienten mit frühkindlicher Netzhautdegeneration nur vereinzelt beschrieben [23].

Elektrophysiologische Untersuchungen

Zur näheren Beschreibung der funktionellen Ursachen der reduzierten Sehschärfe wurden elektrophysiologische Untersuchungen zur objektiven Messung der Netzhautfunktion durchgeführt. Dabei korrelieren beim Ganzfeld-Elektroretinogramm (ERG) die elektrischen Antworten auf einen Lichtreiz mit der Anzahl der aktiven Photorezeptoren. Die visuell evozierten Potentiale (VEP) geben eine Information über die Reizbildung in den Photorezeptoren und deren Ableitung über den Sehnerv ab. Eine Antwort von ERG und VEP unter der Nachweisgrenze ist allerdings nicht mit einem vollständigen Verlust der Photorezeptorfunktion gleichzusetzen [19; 33; 59; 60].

Ganzfeld-Elektroretinogramm (ERG)

Die Ableitungen des ERG waren größtenteils unter der Nachweisgrenze. Nur drei Patienten 1423.01 (vier Jahre), Patient 2065.01 (zehn Monate) und Patient 2359.01 (neun Monate) wiesen skotopische Restantworten auf. Ein Patient 2677.01 zeigte im Alter von neun Monaten skotopische und photopische Restantworten. Die photopischen Ableitungen waren ansonsten unter der Nachweisgrenze. Dieser Funktionsverlust ist charakteristisch für die frühkindlichen Netzhauterkrankungen. Sind die Antworten bereits im ersten Lebensjahr unter der Nachweisgrenze, spricht man von einer Leber'schen Kongenitalen Amaurose (LCA) [11; 46; 54; 55].

Auch wenn das ERG ein zentrales Kriterium für die Funktion der Netzhaut darstellt und in der Regel unter der Nachweisgrenze liegt, ist es nicht automatisch Bestandteil der publizierten Studien. Dies hängt oft mit der Verfügbarkeit dieser aufwendigen Untersuchungstechnik zusammen [11; 12; 17; 23; 70].

Die Daten dieser Studie und der Literatur zeigen, dass bei der frühkindlichen Netzhautdegeneration bereits frühzeitig die Stäbchen- und Zapfenfunktion betroffen ist. [11; 13; 20; 21].

Hier werden die Aspekte des frühzeitigen Beginns und des schnellen Verlauf der Erkrankung erkennbar. Es wird deutlich, dass die elektrophysiologische Untersuchung ein wichtiges diagnostisches Instrument bei der Diagnose der frühkindlichen Netzhautdegeneration ist [11; 13; 20; 21; 46; 54; 55].

Visuell-evozierte Potentiale (VEP)

Die VEP-Ableitungen stellten sich vergleichbar den ERG-Ableitungen dar und lagen mit einer Ausnahme, bei der Restpotentiale abgeleitet werden konnten, unter der Nachweisgrenze.

Damit deckt sich die objektive Messung der Photorezeptorfunktion in den elektrophysiologischen Untersuchungen mit den Daten der Sehschärfe.

Nystagmus

Für 21 (87,5%) der 24 Patienten wurde ein Nystagmus beschrieben. Charakteristisch zeigte sich ein Pendelnystagmus teilweise mit rotatorischer Komponente.

15 der 21 Patienten mit Nystagmus waren innerhalb des ersten Lebensjahres vorstellig. Diese Patienten wiesen bereits in dieser Lebensphase eine starke Sehbeeinträchtigung auf. Die Lichtwahrnehmung konnte nur als Lichtscheinprojektion, Blendung oder Handbewegung wahrgenommen werden oder es bestand keine Reaktion auf helles Licht.

In der Literatur wird der Nystagmus als Merkmal der frühkindlichen Netzhautdegeneration, mit der Folge einer schweren Sehbeeinträchtigung beschrieben. Die Ergebnisse dieser Arbeit gehen damit überein. Die starke Ausprägung des sensorischen Nystagmus ist vor allem bei Funktionsverlust des Zapfensehens beschrieben [11; 46; 55; 68; 73]. Die Daten der hier vorliegenden Studie zeigen, dass eine deutliche Mehrheit der Patienten mit frühkindlicher Netzhautdegeneration aufgrund der Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen einen Nystagmus aufweist.

Das Fehlen des Nystagmus wurde vor allem dann beschrieben, wenn die Lichtwahrnehmung praktisch nicht mehr oder noch nicht vorhanden war. Damit ist der Nystagmus bei Patienten mit *CEP290*-Sequenzvariationen als Folge der eingeschränkten Sehschärfe zu sehen [11; 46; 55; 68; 73].

Fundus

Fundusuntersuchungen wurden bei 21 der 24 Patienten mit homozygoter und compound heterozygoter Sequenzvariation in den Patientenakten dokumentiert. Dabei wurde der Augenhintergrund zunächst als unauffällig beschrieben, mit fortschreitendem Alter zeigten sich dann deutliche Veränderungen. Dokumentiert waren hierbei Pigmentveränderungen in der Peripherie und der Makula, verengte Gefäße sowie eine abnehmende Abgrenzung der Makula. Atrophische Veränderungen in der Makula waren dabei nicht sehr ausgeprägt.

Die Pigmentveränderungen wurden hauptsächlich bereits innerhalb des ersten Lebensjahres beschrieben. Dies deckt sich mit der Literatur. Wann und in welcher Ausprägung Pigmentveränderungen auftraten, variierte zwischen den verschiedenen Studien. Die Beschreibung der Pigmentveränderungen als Knochenkörperchen geht dabei auf dunkle Pigmentansammlungen zurück und war mit fortgeschrittenen Stadien assoziiert [11; 12, 17, 19; 23, 26; 33; 46; 54; 55, 70].

Veränderungen im Bereich der Makula betrafen vor allem einen Verlust des Makulawallreflexes und / oder Foveolarreflexes. Diese Veränderungen der Makula gehen in der Regel mit einem Verlust der Sehschärfe einher, wie sie für die Patienten dieser Studie beschrieben wurde [11; 12, 17, 19; 23, 26; 33; 46; 54; 55, 70].

Weitere Veränderungen des Augenhintergrundes wurden bei den hier vorliegenden Patienten vereinzelt beschrieben. Dies waren verengte Gefäße, Netzhaut-, Aderhaut- und Optikusatrophie

als Folge der fortschreitenden Netzhautdegeneration. Diese Veränderungen wurden in der Literatur in vergleichbarem Umfang berichtet [11; 19; 26; 33; 46; 54; 55].

Damit liefert der Augenhintergrund zum Zeitpunkt der ersten funktionellen Auffälligkeiten wenig Hinweise auf die Art und Ursache der Netzhautdegeneration, obwohl diese recht bald erkennbar wird.

Fundusautofluoreszenz (FAF)

Die FAF beschreibt die Aktivität des retinalen Pigmentepithels (RPE). Sie korreliert mit der Belastung des RPE, die durch abgestorbene Photorezeptorzellen erzeugt wird, wenn durch eine vermehrte Degeneration die Phagozytose der Photorezeptorzellen ansteigt [19; 33; 59; 60]. Bei den Patienten in dieser Studie fällt die FAF frühzeitig in der Entwicklung der Erkrankung durch einen Ring erhöhter Fluoreszenz um die Makula auf. Dieser Ring tritt in der Regel im Zusammenhang mit Stäbchendegeneration auf. Den Umfang des Stäbchendefektes von der FAF abzuleiten ist allerdings, u.a. aufgrund der Aufnahmemodalitäten, nicht möglich. Die reduzierte FAF in der Makula deutet auf einen teilweisen Erhalt der Zapfenphotorezeptoren und der Struktur der Makula hin. Entsprechend ist ein Auftreten von erhöhter FAF in der Makula (Abb. 8C) als ein Zeichen für eine fortgeschrittene Degeneration zu werten [19; 33; 59; 60].

Spectral Domain optische Kohärenztomographie (SD-OCT)

In dieser Studie konnte eine optische Kohärenztomographie nur bei sechs Patienten durchgeführt werden. Bei zwei dieser Patienten wurde ein älteres Verfahren angewendet, das nur eine grobe Einordnung der retinalen Schichten erlaubt. Ein dritter Patient wurde mit einem handgehaltenen Aufnahmegesetz untersucht, das aufgrund der Kooperation des Patienten keine verwertbaren Aufnahmen lieferte. Drei Patienten wurden mit einem SD-OCT untersucht und zeigten pathologische Veränderungen in der Netzhautschichtung. Auffällig war dabei der Verlust der Schichtung im Bereich der Photorezeptorschichten in der Netzhautperipherie, der sehr gut mit der FAF und den Funduskopiedaten korreliert. Die Netzhautschichtung war im Bereich der Makula besser erhalten, zeigten allerdings deutliche strukturelle Veränderungen. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit dem Erhalt der Sehschärfe bei den in Abbildung 9 gezeigten Patienten.

Neben der allgemeinen Reduzierung der Netzhautdicke fällt vor allem der Verlust der photorezeptorschicht-assoziierten Schichten auf, wie es auch in einer einzigen Arbeit der Literatur beschrieben ist [70]. Eine Korrelation der ursächlichen Mutationen mit dem Umfang der Netzhautdegeneration in der Netzhautschichtung kann hier nicht gezogen werden.

Extraokuläre Symptome

Wie in der Einleitung dargestellt, können Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen Ziliopathien hervorrufen.

Die phänotypische Manifestation eines ziliopathieassoziierten Syndroms zeigt sich in den

4. Diskussion

verschiedenen betroffenen Organen. Dabei ist eine große phänotypische Variabilität zu verzeichnen [3; 21; 26; 27; 35; 40; 56]. Hauptsächlich betroffene Organe sind das Auge (Netzhaut), die Niere, das zentrale Nervensystem, die Leber, die Bauchspeicheldrüse und das Ohr. Weitere mögliche Veränderungen entstehen durch eine gestörte Zilienfunktion in der Embryologie bei der Entwicklung der Achsendeterminierung, der Links-rechts-Symmetrie, der Gliedmaßen und orofazialer Strukturen. Zilien sind für die sexuelle Reproduktion (Motilität der Spermien) unerlässlich, wie auch bei der zentralen Steuerung der Nahrungsaufnahme (Adipositas) und Entwicklung von Gehirnstrukturen [3; 14; 21; 27; 40; 56].

Von den in dieser Untersuchung einbezogenen Patienten, mit identifizierten Sequenzvariationen, wiesen acht (33,3%) der 24 Patienten extraokuläre Symptome auf. In den Untersuchungen dokumentiert waren Autismus, Ataxie, Diabetes mellitus Typ I, Asthma bronchiale, van Willebrand Syndrom I, motorische Entwicklungsverzögerung, Muskelhypotonie, Sprachentwicklungsverzögerung und schwere allgemeine Entwicklungsstörung mit Störung des sozialen Interaktionsverhaltens sowie globale Entwicklungsretardierung. Ein extraokulärer einheitlicher Phänotyp kann bei den Patienten dieser Arbeit nicht festgestellt werden.

Jedoch konnte eine Häufung von Entwicklungsstörungen verzeichnet werden. Eine Entwicklungsstörung im sozialen Bereich, der Sprache, der Motorik oder globale Entwicklungsretardierung wiesen vier (50%) der acht Patienten mit extraokulären Symptomen in dieser Arbeit auf. Die Ausprägung der Entwicklungsstörung variiert von Patient zu Patient, wie auch das Alter der Erstdiagnose der Entwicklungsstörung. In dieser Arbeit wurde die Erstdiagnose innerhalb der ersten drei Lebensjahre gestellt. Die weiteren extraokulären Symptome sind vereinzelt aufgetreten. In der Literatur wird eine Vielzahl der phänotypischen Manifestation der Symptome der ziliopathieassoziierten Syndrome beschrieben, wie im Abschnitt 1.4.2. Ziliopathien dargelegt. Ebenfalls wird dargelegt, dass es eine Varianz im zeitlichen Verlauf, wie auch in der Ausprägung gibt [21; 40; 56]. Hiermit stimmen die Ergebnisse dieser Arbeit mit der Literatur überein.

Bei den Patienten mit ursächlichen *CEP290*-Sequenzvariationen in dieser Studie konnten zwar verschiedene ziliopathietypische Symptome gezeigt werden, allerdings war die Erkrankung der Mehrheit der Patienten auf die Netzhaut beschränkt und die vorliegenden ziliopathieassoziierten Merkmale kamen nicht, wie bei Syndromen typisch, als Merkmalskomplex vor.

4.4. Molekulargenetische Bewertung

In dieser Untersuchung konnten in 16 Exonen und drei Intronen Sequenzvariationen detektiert werden, wie in Tabellen 15 und 16 dargestellt. Insgesamt wurden bei den 38 Patienten 24 verschiedene Sequenzvariationen nachgewiesen.

Die durchgeführte Screeninguntersuchung führte zur Identifizierung von zwei neuen Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen. Die in dem hier untersuchten Patientenkollektiv festgestellten Sequenzvariationen stellen nur einen geringen Teil der in den Mutations-Datenbanken gelisteten Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen dar. Aktuell sind in den verwendeten Mutations-Datenbanken annähernd 200 identifizierte Sequenzvariationen beschrieben [75; 77; 79; 80; 82].

In der Literatur sind alle Sequenzvariationsformen wie Missense- und Nonsense-Sequenzvariationen, Spleiß- und Frameshift-Sequenzvariationen beschrieben. Diese treten im gesamten *CEP290*-Gen auf. Die Frameshift-Sequenzvariationen lagen als Deletionen, Insertionen und Duplikationen vor [4; 12; 23; 24]. Hiermit stimmen die Ergebnisse unserer Screeninguntersuchung mit der Literatur überein. Die Aussage der Literatur, dass die häufigsten Sequenzvariationen Frameshift-Sequenzvariationen durch Deletionen und Insertionen sind, deckt sich nicht mit den Ergebnissen dieser Arbeit [4; 12; 23; 24].

Die drei in der Literatur am häufigsten nachgewiesenen Sequenzvariationen sind Intron 26 (c.2991+1655A>G), Exon 36 (c.4723A>T) und Exon 41 (c.5587-1G>C) [11; 12; 23]. Das deckt sich für c.2991+1655A>G und c.4723A>T mit den Ergebnissen der hier dargelegten Screeninguntersuchung. Die angegebene Sequenzvariation im Exon 41 konnte in der hier erfolgten Arbeit nicht detektiert werden.

Die große Anzahl der schon identifizierten Sequenzvariationen ist ein Zeichen für die ausgeprägte genetische Heterogenität, die sich sowohl in dem hier untersuchten Patientenkollektiv als auch in der verwendeten Literatur und den Mutations-Datenbanken zeigt. Hier stimmen die Ergebnisse dieser Arbeit mit den Angaben der Literatur überein [4; 11; 12; 23; 24]. Bei 38 Patienten dieser Arbeit wurden 24 verschiedene Sequenzvariationen identifiziert. Dies bestätigt die in der Literatur beschriebene genetische Heterogenität. Dennoch wird durch die genetischen Ergebnisse der hier dargelegten Arbeit deutlich, dass die Sequenzvariation im Intron 26 (c.2991+1655A>G) der absolute Hotspot bei Patienten mit frühkindlicher Netzhautdegeneration ist. Von den 24 Patienten mit homozygoter und compound heterozygoter Sequenzvariation und hierbei bestehender phänotypischer Ausprägung tragen 18 (sieben homozygot und 11 compound heterozygot (75%)) diese Sequenzvariation. Die zweite Sequenzvariation im *CEP290*-Gen bei den compound heterozygoten Patienten ist über das ganze Gen verteilt. Die zweithäufigste Sequenzvariation in der Literatur liegt im Exon 36 (c.4723A>T). Diese Sequenzvariation kommt ebenfalls in diesem Patientenkollektiv vermehrt vor. Bei der ausgeprägten Häufigkeit der zwei Sequenzvariationen, im Intron 26 (c.2991+1655A>G) und Exon 36 (c.4723A>T), ist in der Zukunft in Betracht zu ziehen, DNA-Proben von Patienten mit frühkindlicher schwerer Sehbeeinträchtigung von vornherein auf

diese Sequenzvariationen zu testen und damit die Zahl der Patienten für eine umfangreiche Analyse des gesamten *CEP290*-Gens zu reduzieren. Andererseits entbindet ein Ausschluss dieser Sequenzvariationen den Untersucher nicht von der Prüfung auf andere Sequenzvariationen, da die bisher veröffentlichten Untersuchungen ein breites Spektrum von Sequenzvariationen des *CEP290*, neben diesen beiden Hotspots, gezeigt haben. Die weiteren identifizierten Sequenzvariationen verteilten sich in den Exonen über das gesamte *CEP290*-Gen [4; 11; 12; 23; 24]. Dies erzeugt einen hohen Arbeits- und Zeitaufwand. Eine Automatisierung des Arbeitsaufwandes ist daher als Fortschritt durch die Labortechnik zu sehen, mit Möglichkeiten der schnelleren DNA-Probenverarbeitung sowie Erhöhung der Anzahl der in einem Lauf zu verarbeitenden DNA-Proben.

Einzig bei Patient 1945.01 mit der Sequenzvariation c.2991+1655A>G konnte eine Konsanguinität der türkischstämmigen Eltern nachgewiesen werden. Die andern sechs Patienten mit homozygoter c.2991+1655A>G Sequenzvariation stammten alle aus nicht konsanguinen Familien. Aus der Häufigkeit der c.2991+1655A>G Sequenzvariation bei den Patienten dieser Studie leitet sich eine erhöhte Häufigkeit der Sequenzvariation in der Bevölkerung ab, die wiederum zu einem erhöhten Risiko führt, dass zufällig zwei Träger für eine *CEP290*-Sequenzvariation aufeinander treffen [7; 15; 28; 33; 48; 52; 53; 61; 63].

In dieser Arbeit konnten Polymorphismen in vier Intronen (Intron 3, 4, 21 und 35) und sechs Exonen (Exon 21, 22, 28, 31, 32 und 36) festgestellt werden. Es zeigten sich 15 verschiedene Polymorphismen. Insgesamt 80 mal konnte ein Polymorphismus identifiziert werden. Am häufigsten waren die Polymorphismen in den Exonen 21 (24 Patienten) und 22 (42 Patienten). Die in dieser Arbeit identifizierten Polymorphismen lagen außerhalb kodierender Sequenzen und waren als gutartig beschrieben worden [7; 29; 42; 63].

4.5. Bewertung der Genotyp-Phänotyp-Korrelation

Durch die hier durchgeführte Screeninguntersuchung kann die Hypothese einer direkten Genotyp-Phänotyp-Korrelation nicht bestätigt werden.

Trotz Vorliegen der gleichen homozygoten Sequenzvariation kann bei den Patienten dieser Studie im Detail kein einheitlicher Phänotyp festgestellt werden. Speziell für die c.2991+1655A>G Sequenzvariation kann dies an der Nutzung der kryptischen Splice-Site liegen, die neben dem abweichenden Spleißprodukt auch das normale Spleißprodukt in unterschiedlichem Umfang erzeugen kann [11; 12; 23; 63; 75; 79; 80; 82].

11 Patienten wiesen eine compound heterozygote Sequenzvariation zusammen mit der c.2991+1655A>G Sequenzvariation auf. Diese Kombinationen lassen üblicherweise einen größeren Spielraum bei der Ausprägung der Symptome, so dass es nicht verwundert, dass die Patienten über das frühe Auftreten der Sehbeeinträchtigung hinaus nicht einheitlich waren [7; 28; 48; 53; 59; 60; 61; 63].

In der Zusammenschau kann bei den Ergebnissen der hier durchgeführten Arbeit festgehalten werden, dass die Grundsymptome (schwere Sehbeeinträchtigung und Nystagmus) bei den Patienten gleich bis ähnlich waren. Betrachtet man nur die Patienten mit erfolgten Untersuchungen im Säuglings- und Kindesalter, wird deutlich, dass Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen frühzeitig zu einer stark ausgeprägten Sehbeeinträchtigung führen, die im Verlauf der Erkrankung (bei erfolgten Kontrolluntersuchungen) lange relativ stabil bleibt.

4.6. Schlussgedanke

Die Ergebnisse der hier durchgeführten Screeninguntersuchung des *CEP290*-Gen stehen im grundsätzlichen Einklang mit der hier verwendeten Literatur. Die Hypothese einer direkten Genotyp-Phänotyp-Korrelation kann nicht bestätigt werden [10; 11; 12; 13; 14; 18; 24].

Betrachtet man die Patienten, die seit dem Säuglings- und Kindesalter klinisch untersucht wurden, wird deutlich, dass Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen die Ursache einer schweren Sehbeeinträchtigung bei frühkindlicher Netzhautdystrophie darstellt. Bei den Patienten, mit erfolgter Kontrolluntersuchung, zeigte sich, dass die schwere Sehbeeinträchtigung im Verlauf der Erkrankung relativ stabil blieb.

Bei 6,25% des hier untersuchten Patientenkollektivs konnte eine homozygote oder compound heterozygote Sequenzvariation im Intron 26 (c.2991+1655A>G) identifiziert werden. Die hier durchgeführte Arbeit geht mit der hier verwendeten Literatur überein, dass diese Sequenzvariation im Intron 26 die häufigste humane Sequenzvariation darstellt [11; 12; 23; 63; 75; 79; 80; 82]. Ein direkter Nachweis der häufigen Sequenzvariation ist als primäre Herangehensweise sinnvoll. Letztendlich ist aufgrund der Größe des Gens eine Übersichtssequenzierung mit Hochdurchsatzverfahren, gegebenenfalls auch im Rahmen eines Gen-Panels, ökonomisch vorzuziehen.

Ein Teil (33,3%) der Patienten wiesen extraokuläre Symptome (Diabetes mellitus Typ I, Sprach-, motorische Entwicklungsverzögerung bis hin zur globalen Entwicklungsretardierung) auf. Hierbei besteht der Hinweis auf das Vorhandensein eines ziliopathieassoziierten Syndroms, ohne dass mehrere Symptome wie bei den entsprechenden Syndromen gleichzeitig vorkamen. Die extraokulären Symptome waren in dieser Arbeit bei Patienten mit homozygoter, wie auch bei Patienten mit compound heterozygoter Sequenzvariation zu finden. Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen mit der verwendeten Literatur überein, dass Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen isolierten Augenerkrankungen wie auch ziliopathieassoziierte Syndrome hervorrufen können [3; 14; 21; 26; 27; 35; 40; 56]. Bei den hier untersuchten Patienten überwiegt im Auftreten die isolierte Netzhautdegeneration.

Für eine erfolgreiche Anwendung einer somatischen Gentherapie und, um eine anwendbare Therapie zu ermöglichen, ist die weitere Erforschung des *CEP290*-Gen notwendig. Dies bedarf weiterer Studien, zur Detektierung aller vorhandenen Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen.

4. Diskussion

Klinische Studien sind nötig, um Genotyp-Phänotyp-Korrelation zu verbessern. Dazu kann eine Optimierung der Tiermodelle mit dem Ziel einer eventuellen möglichen Therapie erfolgen. Die Patienten aus dieser Arbeit zeigen eine schwere frühkindliche Sehbeeinträchtigung bei Netzhautdystrophie. Hier ist von einer frühzeitigen Zerstörung der Photorezeptoren bereits im Säuglingsalter auszugehen. Es ist anzunehmen, dass die Schädigung bereits nach der Geburt beginnt und im Säuglingsalter schnell fortschreitet. Hier ist eine somatische Gentherapie nach der Geburt nicht ausreichend. Die Erforschung möglicher Gentherapien sollte sich auf die intrauterine Entwicklungsphase beziehen und dort erfolgen, um größtmögliche Therapieerfolge zu erzielen.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Genotyp-Phänotyp-Korrelation für Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen bei Patienten mit frühkindlicher Netzhautdegeneration und Beschreibung des phänotypischen Spektrums für Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen.

Die hier durchgeführte Arbeit erfolgte an einem ausgewählten Patientenkollektiv, bestehend aus 176 Patienten, die an frühkindlicher Netzhautdegeneration erkrankt waren.

Die Screeninguntersuchung erfolgte, bei Exonen und Intron 26 unterhalb einer Basenpaar-Anzahl von 500, mittels Single Strand Conformation Polymorphismus (SSCP) Analyse. Der SSCP-Analyse ging eine Exon-spezifische PCR voraus. Die Überprüfung der Amplifikate erfolgte mit Hilfe der Agarosegel-Elektrophorese. Anschließend wurden die PCR-Amplifikate durch die SSCP-Analyse auf mögliche Sequenzvariationen gescreent. Bei auffälligen Veränderungen der Exon-spezifischen Bandenmuster in der SSCP erfolgte eine Sanger-Sequenzierung des auffälligen PCR-Produktes. Die Exone, Basenpaar-Anzahl über 500, wurden anschließend über ein High-Resolution Melting (HRM) Screening untersucht. Auffällige PCR-Produkte wurden mittels Sanger-Sequenzierung auf Sequenzvariationen untersucht.

38 der 176 Patienten wiesen eine Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen auf. 24 der 38 Patienten trugen eine homozygote oder compound heterozygote Sequenzvariation. 22 der 24 identifizierten Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen sind in den online Sequenzvariations-Datenbanken vor beschrieben. Die häufigsten Sequenzvariationen, die im *CEP290*-Gen identifiziert wurden, sind laut der publizierten Studien im Intron 26 (c.2991+1655A>G), Exon 36 (c.4723A>T) und Im Exon 41 (c.5587-1G>C) zu finden. Der aberrante Spleißvorgang im Intron 26 wird als die häufigste humane Sequenzvariation im *CEP290*-Gen beschrieben [11; 12; 17; 23]. Dies spiegelte sich in dem hier untersuchten Patientenkollektiv mit 20 Patienten für c.2991+1655A>G und acht Patienten für c.4723A>T wieder. Die angegebene Sequenzvariation in Exon 41 konnte in dieser Arbeit nicht identifiziert werden.

Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen sind ursächlich für isolierte Erkrankungen (beispielsweise LCA, RP, EOSRD) und für ziliopathieassoziierte Syndrome (beispielsweise SLS, JBTS, MKS) [3; 11; 21; 22; 26; 27; 35; 40; 46; 55; 56; 68; 73; 82]. In dem untersuchten Patientenkollektiv wurden isolierte Erkrankungen als Diagnose detektiert. Bei circa einem Drittel der Patienten mit homozygoter und compound heterozygoter Sequenzvariation im *CEP290*-Gen wurden extraokuläre Symptome (Diabetes mellitus Typ I, Sprach-, motorische Entwicklungsverzögerung, globale Entwicklungsretardierung) beschrieben. Hier besteht der Hinweis auf das Vorhandensein eines ziliopathieassoziierten Syndroms.

Zur phänotypischen Auswertung standen bei 22 der 24 Patienten mit nachgewiesener homozygoter oder compound heterozygoter Sequenzvariation Patientenakten zur Verfügung. Alle Patienten hatten eine frühkindliche schwere Sehbeeinträchtigung gemeinsam. Die Patienten mit klinischer Untersuchung im Säuglings- und Kindesalter wiesen bereits in diesem jungen Alter eine schwere Sehbeeinträchtigung auf. Die Ausprägung reichte von kompletter Erblindung bis stark

5. Zusammenfassung

reduzierter Reaktion auf helles Licht. Bei Patienten mit stark reduzierter Lichtwahrnehmung und Kontrolluntersuchungen wurde deutlich, dass die schwere Sehbeeinträchtigung im Laufe der Erkrankung über Jahre relativ stabil blieb. Die Ergebnisse der Augenhintergrundspiegelung zeigten eine phänotypische Variabilität (unauffällig und pathologisch, mit unterschiedlicher Ausprägung). Bei den Patienten der hier erfolgten Arbeit waren vorherrschende pathologische Veränderungen im Bereich des Pigments und der Makula zu verzeichnen. Eine tiefer gehende Klassifizierung der elektrophysiologischen Untersuchungen ist hier nicht möglich, aufgrund fehlender Daten.

Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen weisen eine genetische und phänotypische Variabilität auf. Mit dieser Aussage der verwendeten Literatur gehen die Ergebnisse der hier durchgeführten Arbeit grundlegend mit [4; 5; 8; 10; 11; 12; 13; 14; 23; 31; 39; 43; 47]. An dieser Stelle kann die Hypothese einer Genotyp-Phänotyp-Korrelation nicht bestätigt werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen zu einer schweren Sehbeeinträchtigung bei frühkindlicher Netzhautdystrophie führen. Die weiteren klinischen Untersuchungen zeigen verschiedene Ausprägungen. Um eine mögliche Therapierbarkeit zu erlangen, sind weitere Forschungen über das *CEP290*-Gen notwendig.

5. Summary

The objective of this paper was to provide a genotype-phenotype-correlation for sequence variations in the *CEP290*-gene regarding patients affected with early-onset severe retinal degenerations and the description of the phenotypic range of sequence variations in the *CEP290*-gene.

The study presented here involved a selected collective of patients, composed of 176 patients affected with early-onset severe retinal degeneration. The screening of exons and intron 26 covering less than 500 base pairs of PCR-Product was performed by Single Strand Confirmation Polymorphism analysis.

This SSCP-analysis was preceded by an exon-specific PCR and validation of the amplicates by Agarosegel-Electrophorese.

In case of noticeable alterations of the exon-specific banding pattern in the SSCP a Sanger Sequencing of the conspicuous PCR-Product. The exons covering more than 500 base pairs of PCR-Product were examined via High-Resolving Melting Screening (HRM). PCR-products which showed an aberrant melting curve were examined for variations of sequences with the help of Sanger Sequencing.

38 of the 176 patients showed a variation of the sequences in the *CEP290*-gene. 24 of these 38 patients had a homozygous or a compound heterozygous variations of the reference sequence. All of the identified variations of the sequence in the *CEP290*-gene were already reported in online databases. All together 24 sequence variations were identified. The most common sequence variations were identified in intron 26 (c.2991+1655A>G), exon 36 (c.4723A>T), and in exon 41 (c.5587-1G>C) of the *CEP290*-gene. The aberrant splicing in the intron 26 was described as the most common human sequence variation of the *CEP290*-gene [11; 12; 17; 23]. This is reflected by the examined patients with 20 patients carrying c.2991+1655A>G and eight patients c.4723A>T. The published sequence variation in exon 41 could not be identified in this study.

Sequence variations in the *CEP290*-gene are the cause of isolated retinal degenerations (for example LCA, RP, EOSRD) and for ciliopathy allied syndromes (for example SLS, JBTS, MKS) [3; 11; 21; 22; 26; 27; 35; 40; 46; 55; 56; 68; 73; 82]. Most of the patients of this study showed an isolated retinal degeneration. One-third of patients carrying homozygous and compound heterozygous sequence variations in the *CEP290*-gene presented with extra ocular symptom (diabetes mellitus Typ I, development delay in speech and motor activity, global retarding of development).

Patient charts were available for 22 of the 24 patients with diagnosed homozygous or heterozygous sequence variation for phenotypic evaluation. All of the patients had an infant interference of sight in common. Regarding the patients clinical examined during their infancy or childhood, a great deal of annoyance could be observed. Visual acuity was reported with a range from total blindness to simple reaction to light. Examinations of patients suffering from reduced perception of light had a regular check-up showing stable visual reductions over the years. The results of the ocular fundus' reflection showed a phenotypic variation (unobtrusive and pathological with different manifestation). The patients who were examined in this paper showed predominant pathological

5. Zusammenfassung

changes in the retinal periphery and the macula. Because of missing data a classification of the electrophysiological examinations could not be performed.

Sequence variations in the *CEP290*-gene showed a genetic and phenotypic variability. The results of this paper follow the published literature [4; 5; 8; 10; 11; 12; 13; 14; 23; 31; 39; 43; 47]. At this point the hypotheses of a genotype-phenotype-correlation could not be proven.

In summary sequence variations in the *CEP290*-gene lead to a severe visual impairment and the patients suffer from early-onset severe childhood inherited retinal dystrophies. Extraocular symptoms were less frequent than expected. More research on the *CEP290*-mutations is necessary to develop treatments.

6. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen:

Abb. 1: Schnitt durch die humane Netzhaut

(Mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. M. Preising)

Abb. 2: Aufbau des Photorezeptors mit verbindendem Zilium

(Mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. M. Preising)

Abb. 3: Domänen und bindende Regionen im *CEP290*-Gen

Abb. 4: Entwicklung des Visus mit dem Alter bei Patienten mit homozygoten und compound heterozygoten *CEP290*-Sequenzvariationen

Abb. 5: Refraktion bei Patienten mit ursächlichen Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen

Abb. 6: Augenhintergrundveränderungen bei Patienten mit homozygoten *CEP290*-Sequenzvariationen

(Mit freundlicher Genehmigung von Prof. B. Lorenz)

Abb. 7: Augenhintergrundveränderungen bei Patienten mit compound heterozygoten *CEP290*-Sequenzvariationen

(Mit freundlicher Genehmigung von Prof. B. Lorenz)

Abb. 8: Fundusautofluoreszenzdokumentation bei Patienten mit ursächlichen *CEP290*-Sequenzvariationen

(Mit freundlicher Genehmigung von Prof. B. Lorenz)

Abb. 9: Spectral-Domain optische Kohärenztomographie (SD-OCT) bei Patienten mit ursächlichen Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen

(Mit freundlicher Genehmigung von Prof. B. Lorenz)

Tabellen:

Tabelle 1: Chemikalien

Tabelle 2: Biochemikalien

Tabelle 3: Papier

Tabelle 4: Stammlösungen

Tabelle 5: Kits

Tabelle 6: Primer der ersten Screeningserie

Tabelle 7: Primer der zweiten Screeningserie

Tabelle 8: Plastikwaren

Tabelle 9: Instrumente und Geräte

Tabelle 10: verwendete SSCP-Gele

Tabelle 11: SSCP-Gele: Laufbedingungen, Laufzeit in Abhängigkeit Exon/Intron

Tabelle 12 : Übersicht über die Häufigkeit in der ursächlichen Sequenzvariationen korrelierten Patienten im Vergleich zur Patientenkohorte

Tabelle 13 : Zusammenfassung der in dieser Arbeit identifizierten pathogenen Sequenzvariationen und deren Lokalisation in den Domänen des *CEP290*-Proteins

Tabelle 14: Häufigkeiten der identifizierten Mutationen

Tabelle 15: Identifizierte pathogene Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen bei Patienten im homozygoten und compound heterozygoten Zustand

Tabelle 16: Identifizierte pathogene Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen bei Patienten im einfach heterozygoten Zustand

Tabelle 17: Isokodierende Polymorphismen im *CEP290*-Gen

6. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Tabelle 18: Übersicht über die Diagnosen der Patienten mit nachgewiesenen ursächlichen Sequenzvariationen

Tabelle 19: Daten der augenärztlichen Untersuchung der Patienten mit homozygoten und compound heterozygoten Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen

Tabelle 20: Daten der augenärztlichen Untersuchung der Patienten mit einfach heterozygoten Sequenzvariationen im *CEP290*-Gen

7. Abkürzungsverzeichnis

abs.	absolut
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ar	autosomal rezessiv
<i>ARL13B</i>	ADP-ribosylation factor-like 13 B
<i>ATF4</i>	Activation Transcription Factor 4
ATP	Adenosintriphosphat
BBS	Bardet-Biedl-Syndrom
bds	beidseits
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
ca.	circa
<i>CC2D2A</i>	coiled coil and C2 domain containing protein 2A
<i>CEP290</i>	centrosomal protein 290 kDa
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
<i>CP110</i>	centrosomal Protein 110
CRD	Zapfen-Stäbchen-Dystrophie
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddH ₂ O	destilliertes Wasser
ddNTP	2',3'-Didesoxynucleotidtriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EOSRD	Early-onset severe retinal dystrophy
ERG	Ganzfeld-Elektroretinogramm
g	Gramm
GAP	GTPase-activating-protein
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HNO ₃	Salpetersäure
HRM	High Resolution Melting
IFT	intraflagellarer Transport
<i>INPP5P</i>	Inositol Polyphosphate-5-phosphatase
JBTS	Joubert-Syndrom

7. Abkürzungsverzeichnis

k.A.	keine Angabe
kb	Kilobasen
kD	Kilo Dalton
KIF	Kinesinmotorproteine
konz.	konzentriert
l	Liter
LA	linkes Auge
LCA	Leber`sche kongenitale Amaurose
M	Molar
mA	Milli-Ampere
max.	maximal
MD	Makuladegeneration
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute/Minuten
Mio.	Millionen
MKS	Meckel-Gruber-Syndrom
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
mM	Millimolar
mV	Millivolt
ng	Nanogramm
NH-E	Netzhauterkrankung
nm	Nanometer
NPHP	Nephronophthisis
OFD	oro-fazio-digital
OCT	optische Kohärenztomographie
p.A.	Pro analysis
PAA	Polyacrylamid
PCM-1	pericentriolar material 1
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
RA	rechtes Auge
Rab8	small GTP-binding Protein Rab8
RCD	Stäbchen-Zapfen-Dystrophie
RP	Retinitis pigmentosa
RPGRIP1	retinitis pigmentosa GTPase regulator interacting protein 1
RPGRIP1L	retinitis pigmentosa GTPase regulator-interacting protein 1-like

7. Abkürzungsverzeichnis

si	simplex
SLS	Senior-Løken-Syndrom
SMC	Structural Maintenance of Chromosoms
SSCP	Single - Strand Conformation Polymorphism
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
<i>TMEM67</i>	Transmembran-Protein 67
<i>TMEM216</i>	Transmembran-Protein 216
TRIS	Trishydroxymethylaminoethan
UV-Licht	Ultravioletes Licht
VEP	visuell-evozierte Potentiale
Vol.	Volumen
xl	x-chromosomal
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol

8. Literaturverzeichnis / Quellenangaben

1. Adams NA, Awadein A, Toma HS. The Retinal Ciliopathies. *Ophthalmic Genetics* 2007; Vol. 28, 113 - 125
2. Baala L, Audollent S, Martinovic J, Ozilou C, Babron MC, Sivanandamoorthy S, Saunier S, Salomon R, Gonzales M, Rattenberry E, Esculpavit C, Toutain A, Moraine C, Parent P, Marcorelles P, Dauge MC, Roume J, Le Merrer M, Meiner V, Meir K, Menez F, Beaufrère AM, Francannet C, Tantau J, Sinico M, Dumez Y, MacDonald F, Munnich A, Lyonnet S, Gubler MC, Génin E, Johnson CA, Vekemans M, Encha-Razavi F, Attié-Bitach T. Pleiotropic effects of CEP290 (NPHP6) mutations extend to Meckel syndrome. *Am J Hum Genet.* 2007; Vol. 81 (1), 170 - 179
3. Badano JL, Mitsuma N, Beales PL, Katsanis N. The Ciliopathies: An Emerging Class of Human Genetic Disorders. *Ophthalmic Genetics* 2006; Vol. 7, 125 - 148
4. Baye LM, Patrinostrò X, Swaminathan S, Beck JS, Zhang Y, Stone EM, Sheffield VC, Slusarski DC. The N – terminal region of centrosomal protein 290 (CEP290) restores vision in a zebrafish model of human blindness. *Human Molecular Genetics* 2011; Vol. 20 (8), 1467 - 1477
5. Bettleja E, Cole DG. Ciliary Trafficking: CEP290 Guards a Gated Community. *Current Biology* 2010; Vol. 20 (21), 928 - 931
6. Brancati F, Barrano G, Silhavy JL, Marsh SE, Travaglini L, Bielas SL, Amorini M, Zablocka D, Kayserili H, Al-Gazali L, Bertini E, Boltshauser E, D'Hooghe M, Fazzi E, Fenerci EY, Hennekam RC, Kiss A, Lees MM, Marco E, Phadke SR, Rigoli L, Romano S, Salpietro CD, Sherr EH, Signorini S, Stromme P, Stuart B, Sztriha L, Viskochil DH, Yuksel A, Dallapiccola B. CEP290 mutations are frequently identified in the oculo-renal form of Joubert syndrome-related disorders. *Am J Hum Genet.* 2007; Vol. 81 (1), 104 - 113
7. Buselmaier W, Tariverdian G. *Humangenetik.* 4., neu bearbeitete Auflage, Springer Medizin Verlag 2007, ISBN: 3-540-00873-X
8. Chang B, Khanna H, Hawes N, Jimeno D, He S, Lillo C, Parapuram SK, Cheng H, Scott A, Hurd RE, Sayer JA, Otto EA, Attanasio M, O'Toole JF, Jin G, Shou C, Hildebrandt F, Williams DS, Heckenlively JR, Swaroop A. In-frame deletion in a novel centrosomal/ciliary protein CEP290/NPHP6 perturbs its interaction with RPGR and results in early-onset retinal degeneration in the rd16 mouse. *Human Molecular Genetics* 2006; Vol. 15 (11), 1847 - 1857
9. Cheng J, Maquat LE. Nonsense codons can reduce the abundance of nuclear mRNA without affecting the abundance of pre-mRNA or the half-life of cytoplasmic mRNA. *Molecular and Cellular Biology* 1993; Vol. 13 (3), 1892 - 1902
10. Cideciyan AV, Aleman TS, Jacobson SG, Khanna H, Sumaroka A, Aguirre GK, Schwartz SB, Windsor EAM, He S, Chang B, Stone EM, Swaroop A. Centrosomal-Ciliary Gene CEP290/NPHP6 Mutations Result in Blindness With Unexpected Sparing of Photoreceptors and Visual Brain: Implications for Therapy of Leber Congenital Amaurosis. *Human Mutation* 2007; Vol. 28 (11), 1074 - 1083
11. Coppieters F, Casteels I, Meire F, De Jaegere S, Hooghe S, Van Regemorter N, Van Esch H,

8. Literaturverzeichnis / Quellenangaben

- Matuleviciene A, Nunes L, Meersschaut V, Walraedt S, Standaert L, Coucke P, Hoeben H, Kroes HY, Vande Walle J, De Ravel T, Leroy BP, De Baere E. Genetic Screening of LCA in Belgium. Predominance of CEP290 and Identification of Potential Modifier Alleles in AHI1 of CEP290 – related Phenotypes. Human Genome Variation Society 2010; 1709 - 1766
12. Coppieters F, Lefever S, Leroy BP, de Baere E: CEP290, a Gene with Many Faces. Mutation Overview and Presentation of CEP290 base. Human Genome Variation Society 2010; 1097 - 1108
13. Craige B, Tsao CC, Diener DR, Hou Y, Lehtreck KF, Rosenbaum JL, Witman GB. CEP290 tethers flagellar transition zone microtubules to the membrane and regulates flagellar protein content. J. Cell Biol. 2010; Vol. 190 (5), 927 - 945
14. Doherty D. Joubert syndrome: insights into brain development, cilium biology and complex disease. Semin Pediatr Neurol. 2009; Vol. 16 (3), 143 - 154
15. Emminger H, Kia T. Explan, Das Kompendium der klinischen Medizin: Urban & Fischer Verlag München-Jena 2008, ISBN: 978-3-437-42462-5
16. Erali M, Wittwer CT. High Resolution Melting Analysis for Gene Scanning. US National Library of Medicine National Institutes of Health, PMC2836412; Published online 2010 January 18
17. Ghaffari SR, Rafati M, Ghaffari G, Morra M, Tekin M. Familial intellectual disability in an Iranian family with a novel truncating mutation in CEP290. Clinical Genetics 2013; 1 - 4
18. Gorden NT, Arts HH, Parisi MA, Coene KLM, Letteboer SJF, van Beersum SEC, Mans DA, Hikida A, Eckert M, Knutzen D, Alswaid AF, Özyurek H, Dibooglu S, Otto EA, Liu Y, Davis EE, Hutter CM, Bammler TK, Farin FM, Dorschner M, Topcu M, Zackai EH, Rosenthal P, Owens KN, Katsanis N, Vincent JB, Hildebrandt F, Rubel EW, Raible DW, Knoers NVAM, Chance PF, Roepman R, Moens CB, Glass IA, Doherty D. CC2D2A Is Mutated in Joubert Syndrome and Interacts with the Ciliopathy – Associated Basal Body Protein CEP290. The American Journal of Human Genetics 2008; Vol. 83, 559 - 571
19. Grehn F. Augenheilkunde: Springer Medizin Verlag Heidelberg 2008, ISBN: 978-3-540-75264-6
20. Gundry CN, Dobrowolski SF, Martin YR, Robbins TC, Nay LM, Boyd N, Coyne T, Wall MD, Wittwer CT, Teng DHF. Base – pair neutral homozygotes can be discriminated by calibrated high – resolution melting of small amplicons. Nucleic Acids Research 2008; Vol. 36 (10), 3401 - 3408
21. Harris PC, Czarnecki PG. Ziliopathien: Springer Medizin Verlag 2009, medgen 2009; Vol. 21, 14 - 20
22. He S, Parapuram SK, Hurd TW, Behnam B, Margolis B, Swaroop A, Khanna H. Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator (RPGR) protein isoforms in mammalian retina: Insights into X – linked Retinitis Pigmentosa and associated ciliopathies. ScienceDirect Vision Research 2008; Vol. 48, 366 - 376
23. den Hollander AI, Koenekoop RK, Yzer S, Lopez I, Arends ML, Voesenek KEJ, Zonneveld MN, Strom TM, Meitinger T, Brunner HG, Hoyng CB, van den Born LI, Rohrschneider K, Cremers FPM. Mutations in the CEP290 (NPHP6) Gene are a Frequent Cause of Leber Congenital Amaurosis.

8. Literaturverzeichnis / Quellenangaben

- The American Journal of Human Genetics 2006; Vol. 79, 556 - 561
24. den Hollander AI, Roepman R, Koenekoop RK, Cremers FPM. Leber congenital amaurosis: Genes, proteins and disease mechanisms. *Retinal and Eye* 2008; Vol. 27, 391 - 419
25. Horn F, Lindenmeier G, Moc I, Grillhösl C, Berghold S, Schneider N, Münster B. *Biochemie des Menschen*: Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York 2003, ISBN: 3-13-130882-6
26. Hosch J, Lorenz B, Stieger K. RPGR: Role in the photoreceptor cilium, human retinal disease and gene therapy. *Ophthalmic Genetics* 2011; Vol. 32 (1), 1 - 11
27. Hurd TW, Hildebrandt F. Mechanisms of Nephronophthisis and Related Ciliopathies. *Nephron Experimental Nephrology* 2011; Vol. 118, 9 - 14
28. Jacobi B, Partovi S. *Molekulare Zellbiologie*: Urban & Fischer Verlag München 2011, ISBN: 978-3-437-42686-5
29. Jansohn M, Aigner A. *Gentechnische Methoden – Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*: Spektrum Akademischer Verlag Elsevier 2006, ISBN: 978-3-8274-1537-0
30. Kahle W, Frotscher M. *Taschenatlas der Anatomie*: Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York 2001, ISBN: 3-423-03019-4
31. Kim J, Krishnaswami SR, Gleeson JG. CEP290 interacts with the centriolar satellite component PCM-1 and is required for Rab8 localization to the primary cilium. *Human Molecular Genetics* 2008; Vol. 17 (23), 3796 - 3805
32. Kühnel W. *Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie*: Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York 2002, ISBN: 3-13-348611-X
33. Lang GK, Gareis O, Lang GE, Recker D, Spraul CW, Wagner P. *Augenheilkunde*: Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York 2008, ISBN: 978-3-13-102834-1
34. Liew M, Pryor R, Palais R, Meadows C, Erali M, Lyon E, Wittwer C. Genotyping of Single – Nucleotide Polymorphism by High – Resolution Melting of Small Amplicons. *Clinical Chemistry* 2004; Vol. 50 (7), 1156 - 1164
35. Lopes CAM, Prosser SL, Romio L, Hirst RA, O'Callaghan C, Woolf AS, Fry AM. Centriolar satellites are assembly points for proteins implicated in human ciliopathies, including oral – facial – digital syndrome 1. *Journal of Cell Science* 2011; Vol. 124, 600 - 612
36. Lorenz B, Poliakov E, Schambeck M, Friedburg C, Preising MN, Redmond TM. A Comprehensive Clinical and Biochemical Functional Study of a Novel RPE65 Hypomorphic Mutation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2008; Vol. 49 (12), 5235 - 5242
37. Mc Anany JJ, Genead MA, Walia S, Drack AV, Stone EM, Koenekoop RK, Traboulsi EI, Smith A, Weleber RG, Jacobson SG, Fishman GA. Visual Acuity Changes in Patients with Leber Congenital Amaurosis and Mutations in CEP290. *Jama Ophthalmol* 2013; Vol. 131 (2), 178 - 182
38. Megaw RD, Soares DC, Wright AF. RPGR: Its role in photoreceptor physiology, human disease, and future therapies. *Experimental Eye* 2015; Vol. 138, 32 - 41

8. Literaturverzeichnis / Quellenangaben

39. Moradi P, Davis WL, Mackay DS, Cheetham ME, Moore AT. Focus on Molecules: Centrosomal protein 290 (CEP290). *Experimental Eye* 2011; Vol. 92, 316 - 317
40. Mockel A, Perdomo Y, Stutzmann F, Letsch J, Marion V, Dollfus H. Retinal dystrophy in Bardet – Biedl syndrome and related syndromic ciliopathies. *Retinal and Eye* 2011; Vol. 30, 258 - 274
41. Mortimer CE, Müller U. *Chemie, Das Basiswissen der Chemie*: Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York 2001, ISBN: 3-13-484307-2
42. Mülhardt C. *Der Experimentator Molekularbiologie / Genomics*: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 2009, ISBN: 978-3-8274-2036-7
43. Omran H. NPHP proteins: gatekeepers of the ciliary compartment. *JCB Germany* 2010; Vol. 190 (5)
44. Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, Parisi M, Glass I. Joubert Syndrome. *GeneReviews* 1993 - 2011; NBK1325
45. Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, Waters AM, Beales PL. Bardet – Biedl Syndrome. *GeneReviews* 1993 - 2001; NBK1363
46. Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, Weleber RG, Francis PJ, Trzupek KM. Leber Congenital Amaurosis. *GeneReviews* 1993 - 2011; NBK1298
47. Parisi MA, Doherty D, Chance PF, Glass IA. Joubert syndrome (and related disorders). *European Journal of Human Genetics* 2007; Vol. 15, 511 - 521
48. Passarge E. *Taschenatlas Humangenetik*: Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York 2008, ISBN: 978-3-13-759503-8
49. Patnaik SR, Raghupathy RK, Zhang X, Mansfield D, Shu X. The role of RPGR and Its Interacting Proteins in Ciliopathies. *Journal of Ophthalmology* 2015; Vol. 2015; Article ID 414781
50. Paunescu K, Wabbels B, Preising MN, Lorenz B. Longitudinal and cross – sectional study of patients with early – onset severe retinal dystrophy associated with RPE65 mutations. *Graefe`s Arch Clin Exp Ophthalmol* 2005; Vol. 243, 417 - 426
51. Perrault I, Delphin N, Hanein S, Gerber S, Dufier J-L, Roche O, Defoort-Dhellemmes S, Dollfus H, Fazzi E, Munnich A, Kaplan, Rozet J-M. Spectrum of NPHP6/CEP290 Mutations in Leber Congenital Amaurosis and Delineation of the Associated Phenotype. *Human Mutation in Brief #956* (2007) online; DOI: 10.1002/humu.9485
52. Pfreundschuh M, Schölmerich J. *Pathophysiologie Pathobiochemie*: Urban & Fischer Verlag München 2004, ISBN: 3-437-42001-1
53. Plattner H, Hentschel J. *Zellbiologie*: Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York 2006, ISBN: 3-13-106513-3
54. Preising MN, Hausotter-Will N, Solbach MC, Friedburg C, Rüschemdorf F, Lorenz B. Mutations in RD 3 Are Associated with an Extremely Rare and Severe Form of Early Onset Retinal Dystrophy. *Vision and Ophthalmology* 2012
55. Preising MN, Paunescu K, Friedberg C, Lorenz B. Genetische und klinische Heterogenität bei LCA – Patienten, Das Ende der Einheitlichkeit. *Ophthalmologie* 2007; Vol. 104: 490 - 498

8. Literaturverzeichnis / Quellenangaben

56. Ramamurthy V, Cayouette M. Development and disease of the photoreceptor cilium. *Clin Genet* 2009; Vol. 76, 137 - 145
57. Reed GH, Wittwer CT. Sensitivity and Specificity of Single – Nucleotide Polymorphism Scanning by High – Resolution Melting Analysis. *Clinical Chemistry* 2004; Vol. 50 (10), 1748 -1754
58. Sayer JA, Otto EA, O`Toole JF, Nurnberg G, Kennedy MA, Becker C, Hennies HC, Helou J, Attanasio M, Fausett BV, Utsch B, Khanna H, Liu Y, Drummond I, Kawakami I, Kusakabe T, Tsuda M, Ma L, Lee H, Larson RG, Allen SJ, Wilkinson CJ, Nigg EA, Shou C, Lillo C, Williams DS, Hoppe B, Kemper MJ, Neuhaus T, Parisi MA, Glass IA, Petry M, Kispert A, Gloy J, Ganner A, Walz G, Zhu X, Goldman D, Nurnberg P, Swaroop A, Leroux MR, Hildebrandt F. The centrosomal protein nephrocystin-6 is mutated in Joubert syndrome and activates transcription factor ATF4. *Nature Genetics* 2006; Vol. 38 (6), 674 - 681
59. Schmidt RF, Unsicker K. Lehrbuch Vorklinik, Integrierte Darstellung in vier Teilen:Teil A Anatomie, Biochemie und Physiologie der Zelle: Deutscher Ärzte-Verlag Köln 2003, ISBN: 3-7691-0441-2
60. Schmidt RF, Unsicker K. Lehrbuch Vorklinik, Integrierte Darstellung in vier Teilen: Teil B Anatomie, Biochemie und Physiologie des Nervensystems und des Bewegungsapparates: Deutscher Ärzte-Verlag Köln 2003, ISBN: 3-7691-0442-0
61. Seyfert W, Balling R. Lehrbuch der Genetik: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 2003, ISBN: 3-8274-1022-3
62. Silbernagel S, Despopoulos A. Taschenatlas der Physiologie: Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York 2003, ISBN: 3-13-567706-0
63. Strachan T, Read AP. Molekulare Humangenetik: Spektrum Akademischer Verlag Elsevier GmbH München 2005, ISBN: 3-8274-1493-8
64. Sturm V, Leiba H, Menke MN, Valente EM, Poretti A, Landau K, Boltshauser E. Ophthalmological findings in Joubert syndrome. *Eye* 2010; Vol. 24, 222 - 225
65. Tory K, Lacoste T, Burglen L, Morinière V, Boddaert N, Macher MA, Llanas B, Nivet H, Bensman A, Niaudet P, Antignac C, Salomon R, Saunier S. High NPHP1 and NPHP6 mutation rate in patients with Joubert syndrome and nephronophthisis: potential epistatic effect of NPHP6 and AHI1 mutations in patients NPHP1 mutations. *J Am Soc Nephrol.* 2007; Vol. 18 (5), 1566 - 1576
66. Valente EM, Silhavy JL, Brancati F, Barrano G, Krishnaswami SR, Castori M, Lancaster MA, Boltshauser E, Boccone L, Al-Gazali L, Fazzi E, Signorini S, Louie CM, Bellacchio E, Bertini E, Dallapiccola B, Gleeson JG. Mutations in *CEP290*, which encodes a centrosomal protein, cause pleiotropic forms of Joubert syndrome. *Nature Genetics* 2006; Vol. 38, 623 - 625
67. Vandersteen JG, Bayrak-Toydemir P, Palais RA, Wittwer CT. Identifying Common Genetic Variants by High – Resolution Melting. *Clinical Chemistry* 2007; Vol. 53 (7), 1191 - 1198
68. Weleber RG, Michaelides M, Trzuppek KM, Stover NB, Stone EM. The Phenotype of Severe early Childhood Onset Retinal Dystrophy (SECORD) from Mutatio of RPE 65 and Differentiation from Leber Congenital Amaurosis. *Vision and Ophthalmology* 2010

8. Literaturverzeichnis / Quellenangaben

69. Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor R. High – Resolution Genotyping by Amplicon Melting Analysis Using LCGreen. *Clinical Chemistry* 2003; Vol. 49 (6), 853 - 860
70. Yzer S, den Hollander AI, Lopez I, Pott JWR, de Faber JTHN, Cremers FPM, Koenekoop RK, van den Born LI. Ocular and extra-ocular features of patients with Leber congenital amaurosis and mutations in CEP290. *Molecular Vision* 2012; Vol. 18, 412 - 425
71. Zhang SX, Sanders E, Fliesler SJ, Wang JJ. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein responses in retinal degeneration. *Experimental Eye Research* 2014; Vol. 125, 30 - 40
72. Zhou L, Wang L, Palais R, Pryor R, Wittwer CT. High – Resolution DNA Melting Analysis for Simultaneous Mutation Scanning and Genotyping in Solution. *Clinical Chemistry* 2005; Vol. 51 (10), 1770 - 1777
73. www.aerzteblatt.de/archiv/61348/Ophthalmologie-Nicht-nur-drei-Patienten
74. www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Parker/method.html
75. www.biobase-international.com
76. www.chemie.de/lexikon/Ethidiumbromid.html
77. www.exac.broadinstitute.org
78. www.laborjournal.de/rubric/methoden/methoden/v44.lasso
79. www.medgen.ugent.be/cep290base
80. www.mutalyzer.nl/check
81. www.pro-retina.de
82. www.retina-international.org

9. Ehrenwörtliche Erklärung

Erklärung zur Dissertation

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

Kleinfahner, den _____

Ort, Datum Unterschrift

10. Danksagung

Ein ganz herzliches Dankeschön möchte ich an Frau Prof. Dr. med. Birgit Lorenz richten, die diese Dissertation durch die zur Verfügungstellung der benötigten Labortechnik und der verwendeten Materialien ermöglichte.

Im Weiteren geht ein besonderer Dank an Herrn PD Dr. rer. medic. Markus Preising für die langjährige Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit, im Bereich der Labortätigkeiten und Verschriftlichung, sowie für die Auswertungen der Ergebnisse, die vielen hilfreichen Ratschläge, Anmerkungen und konstruktive Kritik, die zur Fertigstellung dieser Dissertation beigetragen haben.

Dem ganzen Team des Labors für Molekulare Ophthalmologie möchte ich meinen Dank für die Unterstützung aussprechen.

Hier besonders Herrn Prof. Dr. Dr. Knut Stieger und Frau Annabella Janise für die freundliche und sehr geduldige Einarbeitung in die methodischen Verfahren sowie für das stetige Beantworten meiner vielen Fragen. Weiterhin für die Gespräche die mir in kritischen Situationen meiner Doktorarbeit zu neuer Motivation verhalfen.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Dr. Matthäus Pilch zur Entwicklung der verwendeten Auswertesoftware „Device independent Melting Analysis (DiMA)“ der High Resolution Melting Analyse.

Zu guter Letzt und ein ganz besonderes Dankeschön möchte ich meinem Lebenspartner, Marcus Birchner, meiner Familie, vor allem meinen lieben Eltern, und der Familie meines Lebenspartners aussprechen, die mir all die Jahre in jeglicher Situation geholfen, unterstützt und mir Mut zugesprochen haben, und, vor allem in der Schlussphase, meine Launen geduldig ertrugen. Vielen Dank meine Lieben.