

**Genotyp- Phänotyp- Korrelation bei**  
**X- chromosomaler juveniler Retinoschisis**

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

vorgelegt von Schmeißer Julia  
aus  
Regensburg

Gießen 2011

**Aus der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde**  
**Direktorin: *Prof. Dr. med. Birgit Lorenz***  
**Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH**  
**Standort Gießen**

Gutachter: Prof. Dr. med. Birgit Lorenz

Gutachter: Prof. Dr. med. Ulrich Müller

Tag der Disputation: 14.07.2011

**Für meine liebe Familie**

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1. Der Erkrankungskomplex der Retinoschisis</b> .....	<b>7</b>
1.1.1. Grundlagen der Vererbung der Retinoschisis .....	7
1.1.2. Die familiäre foveale Retinoschisis.....	9
1.1.3. Die senile Retinoschisis .....	11
<b>1.2. Die X-gebundene juvenile Retinoschisis (XLR5)</b> .....	<b>11</b>
1.2.1. Phänotyp .....	12
1.2.2. Pathologie und Morphologie .....	13
1.2.3. Das RS1-Gen.....	15
1.2.4. Therapie .....	18
<b>1.3. Aufgabenstellung</b> .....	<b>18</b>
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1. Patienten</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2. Materialnachweis</b> .....	<b>19</b>
2.2.1. Geräte und Zubehör in der Molekulargenetik .....	19
2.2.2. Geräte in der Phänotypisierung .....	20
2.2.3. Chemikalien .....	21
2.2.4. Enzyme .....	24
2.2.5. Kits.....	25
2.2.6. Puffer und Lösungen .....	25
<b>2.3. Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>29</b>
2.3.1. Gewinnung der DNA-Proben .....	29
2.3.2. DNA-Isolation aus Vollblut .....	30
2.3.3. DNA-Isolation aus Mundschleimhautabstrichen .....	32
2.3.4. Phenol-Chloroformextraktion von DNA.....	32
2.3.5. Ethanolfällung.....	33
<b>2.4. Nukleinsäurekonzentrationsmessung mit dem Photometer</b> .....	<b>34</b>
<b>2.5. Die Polymerasekettenreaktion (PCR)</b> .....	<b>34</b>
<b>2.6. Die Agarosegelelektrophorese</b> .....	<b>37</b>
<b>2.7. Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)</b> .....	<b>39</b>
<b>2.8. Die Single Stranded Conformational Polymorphism Analyse (SSCPA)</b> ..	<b>41</b>

2.9. Silberfärbung von Polyacrylamidgelen nach Budowle <sup>6</sup> .....	42
2.10. Die Aufreinigung eines PCR-Produkts für die Sequenzierung .....	43
2.11. Der Restriktionsverdau.....	44
2.12. Untersuchungen zur Verteilung flankierender Short-Sequenz-Repeat-Marker .....	45
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>47</b>
3.1. Individuelle Daten der Patienten mit XLRS, der betroffenen Verwandten und Konduktorinnen.....	47
3.2. Ergebnisse im RS1-Gen .....	53
3.2.1. Deletionen .....	55
3.2.2. Punktmutationen .....	55
3.2.2.1. Nonsense-Mutation .....	55
3.2.2.2. Missense-Mutation .....	56
3.2.2.3. Untersuchungen zur verwandtschaftlichen Beziehung von Patienten mit einer identischen Mutation.....	65
3.2.3. Polymorphismen .....	66
3.3. Patienten ohne Mutationsnachweis .....	66
3.4. Konduktorinnenuntersuchung .....	67
3.5. Ergebnis der SSCP- Untersuchung .....	67
3.6. Phänotypische Ergebnisse .....	69
3.7. Genotyp-Phänotyp-Korrelation.....	72
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>74</b>
4.1. Bewertung der SSCP Untersuchung .....	74
4.2. Konduktorinnendiagnostik .....	74
4.3. Aussagekraft der Phänotypisierung der Patienten .....	75
4.4. Molekulargenetischer Aspekt .....	77
4.5. Bewertung der Genotyp- Phänotyp- Korrelation.....	78
4.6. Verwandtschaftsfrage bei Patienten mit p.P193L Mutation und gleicher geographischer Herkunft .....	78
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>80</b>
<b>6. Summary .....</b>	<b>82</b>
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>84</b>
<b>8. Internetreferenzen .....</b>	<b>88</b>

<b>9. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>89</b>
<b>10. Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>90</b>
<b>11. Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>91</b>
<b>12. Danksagung .....</b>	<b>92</b>
<b>13. Lebenslauf.....</b>	<b>93</b>

## **1. Einleitung**

### **1.1. Der Erkrankungskomplex der Retinoschisis**

Eine der vielen unterschiedlichen erblichen Netzhauterkrankungen, die mit einer Seheinschränkung einhergehen, ist die Retinoschisis. Retinoschisis bezeichnet eine primäre Spaltung (griechisch: schisis) der Neuroretina des Auges in zwei oder mehr Schichten. Bei dieser Augenkrankheit werden drei Formen unterschieden: (1) die familiäre foveale Form, (2) die erworbene degenerativ senile Retinoschisis und (3) die X-chromosomal-rezessiv erbliche juvenile Form. Die folgende Arbeit konzentriert sich auf die letztere Form<sup>22,34</sup>.

#### **1.1.1. Grundlagen der Vererbung der Retinoschisis**

Die humanen Chromosomen tragen die menschliche genetische Information kodiert in der DNA (Desoxyribonukleinsäure). Die DNA liegt als Doppelhelix in hoch kondensierter Form in den Chromosomen vor. Die Sequenzabfolge der vier DNA-Bestandteile Adenosin, Cytosin, Guanin und Thymin kodiert die genetische Information. Die menschliche Körperzelle enthält einen diploiden Chromosomensatz mit 46 Chromosomen (haploider Satz  $n=23$ ). 22 Chromosomen des haploiden Satzes können zu Paaren angeordnet werden und werden Autosomen genannt. Ihre Information liegt doppelt vor. Die beiden Geschlechtschromosomen, die Gonosomen, bilden das 23. Paar, wobei es zwei Formen der Gonosomen gibt. Das X-Chromosom trägt eine große Menge zum Teil überlebenswichtiger Informationen, während der Informationsgehalt des Y-Chromosoms stark reduziert ist und nur in kleinen Bereichen an den Telomeren der beiden Chromosomen gemeinsame genetische Information gespeichert hat (pseudoautosomale Region). Mann und Frau unterscheiden sich in der Kombination des Gonosomenpaares (XX bei der Frau, XY beim Mann)<sup>68</sup>.

Beim X-chromosomal-rezessiven Erbgang ist das merkmalsstragende Gen auf dem X-Chromosom, dem Gonosom, lokalisiert, wo es geschlechtsgebunden vererbt wird. Das menschliche X-Chromosom trägt zahlreiche Gene, deren Mutationen mit Erkrankungen mit dominantem oder rezessivem Erbgang einhergehen. Als Allele werden Nukleotidpositionen bezeichnet, die an korrespondierenden Orten homologer Chromosomen liegen. Je nach Betrachtungsweise können diese Positionen Chromosomenabschnitte, Gene, oder einzelne Nukleinbasen sein. Allele können kodierende und nicht-kodierende Positionen beschreiben.

Wie oben erwähnt, haben Männer neben dem Y-Chromosom nur ein X-Chromosom, die Frauen dagegen zwei X-Chromosomen. Die Männer sind bezüglich der Mutationen von Genen außerhalb der pseudoautosomalen Region auf dem X-Chromosom immer hemizygot, während die Frauen entweder heterozygot oder homozygot sein können. Ein heterozygoter Status ist bei rezessiven Erbgängen in der Regel nicht ausreichend für die Entstehung einer Erkrankung. Die Erkrankung kommt daher bei einer Frau im X-chromosomal Erbgang formal im Phänotyp nur zum Vorschein, wenn auf beiden Allelen eine pathologische Sequenzveränderung vorliegt. Frauen, die nur ein verändertes Allel tragen, bezeichnet man als Konduktorinnen. Bei manchen rezessiven X-chromosomal Erkrankungen kann der pathologische Phänotyp unterschiedlich zur Expression kommen. Dabei nähert er sich dem pathologischen Phänotyp der betroffenen Männer aber nur an. Dies ist bedingt durch das Phänomen der X-chromosomal Geninaktivierung. Eine Geninaktivierung wird für einige Gene des X-Chromosoms durchgeführt, um ein Ungleichgewicht der Gendosis zwischen dem männlichen (hemizygot für das X-Chromosom) und dem weiblichen X-Chromosom (dizygot für das X-Chromosom) zu vermeiden. Dabei entsteht bei Konduktorinnen ein Mosaik von Zellen mit inaktivierten und aktivierten mutierten Allel, so dass das betroffene Gewebe erkrankte und nicht erkrankte Zellen enthält<sup>43</sup>.

Frauen erkranken bei rezessiver X-chromosomaler Vererbung in der Regel nur dann gleich stark wie Männer mit der gleichen Mutation, wenn sie das Merkmal auf beiden X-Chromosomen tragen. Konduktorinnen geben ein mutiertes Allel mit 50%-iger Wahrscheinlichkeit an ihre Söhne weiter, die dann erkranken. Da Männer hemizygot für die meisten X-chromosomal Gene sind, führt ein verändertes Allel, das auf dem X-Chromosom lokalisiert ist, trotz rezessiver Vererbung immer zu einer Ausprägung

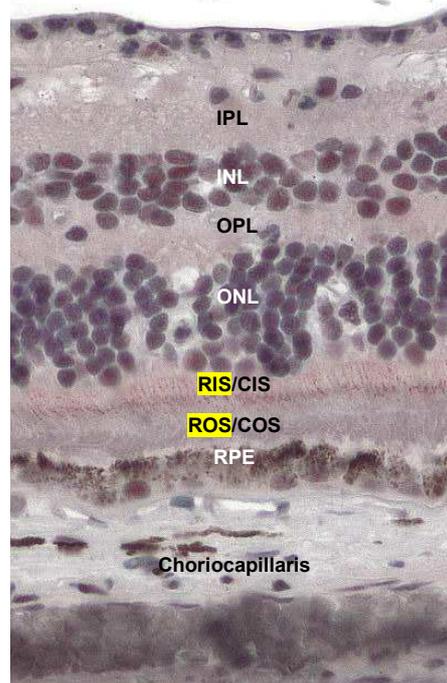
des veränderten Merkmals in Korrelation zur Schwere der Mutation. Sobald eine pathogene Sequenzveränderung vorliegt erkranken diese Männer. Ganz typisch für einen X-chromosomalen Erbgang ist, dass fast nur Männer betroffen und deren Mütter und Töchter Konduktorinnen sind.

Rezessiv vererbte Krankheiten, deren Genorte auf den Autosomen liegen, kommen nur dann phänotypisch zum Tragen, wenn sich auf jeweils beiden homologen Autosomen eine Veränderung in einem bestimmten Gen befindet. Dabei wird in der Regel eine Veränderung vom Vater und eine von der Mutter vererbt. Die Eltern müssen dabei nicht betroffen sein. Sie sind meistens phänotypisch gesund und tragen genotypisch heterozygot das veränderte Gen. Es können folglich sowohl Männer als auch Frauen von der Krankheit betroffen sein<sup>68</sup>.

### **1.1.2. Die familiäre foveale Retinoschisis**

Die familiäre foveale Retinoschisis gehört zu der Gruppe der autosomal-rezessiv vererbten Krankheiten, wobei die chromosomale Genlokalisierung noch nicht bekannt ist.

Bei der autosomal-rezessiven Retinoschisis ist die innere Netzhaut betroffen. Dazu gehören die innere Körnerschicht des Auges, die innere plexiforme Schicht mit den Müller-Zellen (retinale Glia-Zellen), die Ganglienzellen-Schicht mit den Zellkörpern, die Nervenfaserschicht mit den Axonen der Ganglienzellen und die vitreoretinale Zwischenschicht. Abbildung 1 zeigt den Aufbau der Retina.



**Abbildung 1: Histologischer Schnitt durch die gesunde perimakuläre humane Netzhaut;** RPE: retinales Pigmentepithel, ROS: Stäbchenaußensegmente , COS: Zapfenußensegmente, RIS: Stäbcheninnensegmente , CIS: Zapfeninnensegmente, INL: innere Körnerschicht, IPL: innere plexiforme Schicht, ONL: äußere Körnerschicht, OPL: äußere plexiforme Schicht, GC: Ganglien Zellschicht (mit freundlicher Genehmigung von Dr. Markus Preisling)

Die wichtigsten Leitsymptome der familiären Retinoschisis sind reduzierte Sehschärfe, abnormales Farbsehen (Tritanstörung) und Metamorphopsie (räumlich oder farblich veränderte Wahrnehmung von Gegenständen). Metamorphopsie tritt oft als Folge bei einer Veränderung der zentralen Netzhaut auf. Analog zur juvenilen Retinoschisis findet man bei der familiären Retinoschisis radiale Falten in der Fovea. Die Retina spaltet sich in eine innere und in eine äußere Schicht auf. Mehrere kleine, runde Mikrozysten werden zusätzlich beobachtet. Die Peripherie und das retinales Pigment-Epithel (RPE), das sehr wichtig für die Funktion der Rezeptoren ist, erscheinen im Fundusbild normal. Die Linse, das Ganzfeld-Elektroretinogramm (ERG) und das Elektrookulogramm (EOG) zeigen keinerlei Abweichungen. Die Krankheit manifestiert sich genau wie die X-gebundene juvenile Retinoschisis in der ersten Lebensdekade und schreitet normalerweise relativ

langsam voran. Die Prognose ist meist gut, eine kausale Therapie steht bisher nicht zur Verfügung<sup>30</sup>.

### **1.1.3. Die senile Retinoschisis**

Ungefähr 4% der 60 bis 80-Jährigen leiden unter der senilen Form der Retinoschisis<sup>7</sup>. Sie ist eine Form, die sporadisch im Alter auftritt und kann sowohl Männer als auch Frauen betreffen. Es treten keine spezifischen Veränderungen in der Makula auf und die allgemeine Prognose für die Sehschärfe ist relativ gut. Die senile Retinoschisis kann in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die eine ist eine gutartige, periphere Form und die andere ist eine schneller voranschreitende retikuläre oder bullöse Form<sup>18</sup>. Letztere ist der juvenilen Retinoschisis histologisch sehr ähnlich, zeigt aber keine genetische Ursache<sup>22</sup>.

## **1.2. Die X-gebundene juvenile Retinoschisis (XLRS)**

Schon 1898 wurden klinische Merkmale der X-gebundenen Retinoschisis in der Literatur beschrieben<sup>25</sup>. Im Jahre 1953 beschrieb Jager<sup>29</sup> diese Krankheit zum ersten Mal mit dem Wort „Retinoschisis“. Sorsby<sup>63</sup>, der von Levy und Jager unterstützt wurde, fand heraus, dass die juvenile Retinoschisis X-chromosomal rezessiv vererbt wird. Die X-chromosomale rezessive Retinoschisis hat eine Prävalenz von 1: 5000 bis 1: 25000 in der weltweiten Bevölkerung<sup>1</sup>. Jager war der Erste, der histopathologisch die Spaltung der Retina in zwei Schichten demonstrierte<sup>29</sup>.

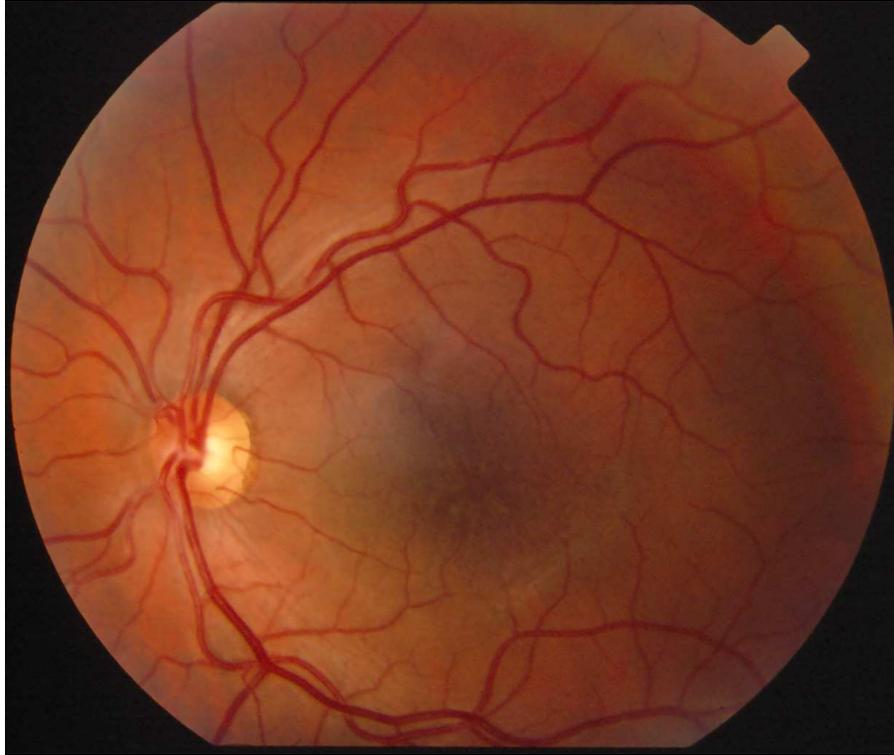
### 1.2.1. Phänotyp

Bei XLRS degeneriert die vitreoretinale Schicht<sup>12</sup> bilateral und in der Regel sind nur Männer betroffen. Der Visus ist im Mittel um ca. 0,24 oder mehr vermindert, wobei akute Visusminderungen sehr selten sind. In der Regel besteht das schlechte Sehvermögen seit Geburt<sup>34</sup>. Einige Patienten schielen in der Kindheit, leiden unter Nystagmus und ausgeprägter Retinoschisis. Im Teenageralter, bis ca. 20 Jahre, bleibt der Visus oft konstant. Als frühes Zeichen bei XLRS können feine, weiße Punkte in der Makula diagnostiziert werden<sup>69</sup>. Im höheren Alter kann die Visusminderung durch degenerative Makulaveränderung weiter fortschreiten<sup>4</sup>. Überdies können Blutungen, choroidale Sklerose oder eine Netzhautablösung auftreten. Weitere Veränderungen sind dendritiforme Gefäße in der Netzhautperipherie und ein Glaskörperschleier, welcher durch Abtrennung der Schichten von den Schisishöhlen entstehen kann<sup>67</sup>. In seltenen Fällen kann es zur retinalen Atrophie, mit darauffolgender Erblindung kommen, d.h. die Netzhaut degeneriert nach und nach, was aber meistens erst im höheren Lebensalter auftritt<sup>24</sup>. Manchmal wird die Krankheit auch von Katarakt oder Pseudopapillitis begleitet.

Die Patienten können eine Hyperopie mit Astigmatismus und zentrale oder periphere Skotome (Gesichtsfeldausfälle korrelierend zur peripheren Retinoschisis) aufweisen. Eine periphere Retinoschisis wird bei ca. 50% der Patienten beobachtet<sup>4,13,19,52</sup>. Das Farbsehen und auch die Dunkeladaptation des Auges sind eingeschränkt. Eine Hyperopie ist ebenfalls häufig ein frühes Erkennungszeichen dieser Krankheit<sup>34</sup>. Die Krankheit kann jedoch in ihrer Ausprägung sehr stark variieren, wobei auch weitere genetische Faktoren eine Rolle spielen<sup>31</sup>.

Bei Patienten, die keine zystischen Veränderungen der Fovea aufweisen, aber hypopigmentierte Flecken oder atrophische Läsionen zeigen, lässt sich der Grad der Sehschwäche gut abschätzen. Dies ist bei Patienten mit zystischen Veränderungen schwieriger<sup>4</sup>.

Ein Beispiel einer typischen Ausprägungsform der XLRS zeigt Abbildung 2. In den meisten Fällen ist die auffälligste Veränderung im makulären Bereich als feine speichenartige Läsion zu erkennen.



**Abbildung 2: Fundusphotographie des rechten Auges:** auffällig sind die radiären weißlichen unscharfen Linien rings um die Fovea (Patient 501.01, mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. B. Lorenz).

### 1.2.2. Pathologie und Morphologie

Histologisch wurde als charakteristisches Zeichen einer Netzhautspaltung die Aufspaltung zwischen der ILM (inner limiting membrane), der Nervenfaserschicht und der Ganglienzellschicht beschrieben (vgl. Abb. 1). Im Inneren dieser Schisis findet man ILM, Fragmente der Müller-Zellen, Blutgefäße und eine dünne Ganglienzellschicht<sup>50</sup>. Die Trennung der beiden Schichten entsteht durch Defekte der Müller-Zellen, welche bei der Erkrankung verändert sind und der Neuronen<sup>50</sup>. Erst im fortgeschrittenen Alter der Patienten erkrankt die Ganglienzellschicht, was mit einer elektrophysiologischen Untersuchung, dem Ganzfeldelektroretinogramm (ERG) gezeigt werden kann<sup>37,66</sup>.

Die Schisis erzeugt Strukturen, die mit PAS-positivem, eosinophilem, filamentösem Material gefüllt sind, welches von Müller-Zellen stammt<sup>10,36</sup>. Zusätzlich können erhöhte Konzentrationen der Proteine Cystatin C, ein Cysteinproteasen-Inhibitor und Tenascin C nachgewiesen werden<sup>14</sup>. Das extrazelluläre Matrixprotein Tenascin C ist bei der Wundheilung beteiligt und trägt wohl als antiadhäsives Molekül zur Pathogenese der XLRS bei<sup>32</sup>. Im frühen Stadium besteht die Makula typischerweise aus kleinen radial in der Perifovea angeordneten Mikrozysten bzw. Falten. Es können auch sich vereinigende Zysten, Pigmentierungen oder Atrophie auftreten<sup>52</sup>. Bei 50% der Patienten betrifft die Retinoschisis nur die Fovea (zentrale Retinoschisis)<sup>52</sup>. Mit Hilfe der Ophthalmoskopie kann man kleine Falten der inneren Retina erkennen. Bei der Fundusautofluoreszenzuntersuchung können bei der XLRS krankheitsspezifisch zentrale radiäre Strukturen gezeigt werden.

Bei über 30-Jährigen kann meist keine zentrale Retinoschisis mehr nachgewiesen werden, es finden sich vielmehr nur unspezifische Pigmentepitheldefekte. Bei 50% der Betroffenen mit peripheren Veränderungen sind es diese, die zur Einschränkung des peripheren Sehens führen. Die periphere Schisis tritt fast immer in den unteren temporalen Quadranten auf, kann sich aber auch auf mehrere Quadranten ausbreiten, wobei die Fovea selten miteinbezogen wird<sup>52</sup>. Die zystischen Strukturen sind sehr groß, die innere Lamina der Retina löst sich ab (Schisis) und sklerotische Abhebungen können entstehen, in die es einbluten kann. Bei ausgedehntem Foramen der inneren Schichten der Retina kann man freistehende Netzhautgefäße im Glaskörperraum in der Ophthalmoskopie erkennen. In 75% aller Fälle kommen die Abhebungen in der inneren Lamina vor.

Die erkrankten Patienten zeigen das sog. Mizuo-Phänomen<sup>11</sup>. Kurz nach einer Lichtexposition des Auges wechselt die Farbe der vorher dunkeladaptierten Retina von rot zu gold, was als eine Kaliumionenunausgeglichenheit an der inneren Retina interpretiert wird. Nach einem Lichteinfall antworten die Photorezeptoren mit einer Hyperpolarisation, indem die Konzentration der extrazellulären Kaliumionen ansteigt, die über die Müller-Zellen in den extrazellulären Raum gelangen. Bei defekten Müller-Zellen kann es zu einer Erhöhung der Kaliumkonzentration im extrazellulären Raum kommen<sup>11</sup>.

Beim Ganzfeld-ERG wird die Netzhaut mit Hilfe einer Ganzfeldkugel in standardisierter Form belichtet und die in der Netzhaut gebildeten elektrischen

Potenziale mittels mehrerer Elektroden aufgezeichnet. Nach der Ableitung erhält man charakteristische Messkurven der Spannungsänderungen der Netzhautzellen. Bei XLRS zeigen sich sehr typische Veränderungen im ERG in Form einer normalen bis leicht reduzierten a-Wellenamplitude (stammt vorwiegend von den Photorezeptoren) und einer deutlich reduzierten oder komplett ausbleibenden b-Wellenamplitude (vorwiegend von den Bipolarzellen)<sup>12,34</sup>. Die Defekte der Müller-Zellen sind dafür ausschlaggebend. Diese Zellen sind hauptverantwortlich für den Erhalt der retinalen Struktur<sup>22</sup>. Das Verhältnis der Amplituden von b- zu a- Welle ist üblicherweise kleiner als 1,0. Auch in ihrem Zeitverlauf (Latenz) kann die b-Welle verändert sein. Ist der b: a Quotient kleiner als 1 spricht man von einem negativen ERG. Neben der Ophthalmoskopie und der Fundusautofluoreszenzuntersuchung ist zur weiteren Diagnose immer noch eine elektrophysiologische Untersuchung mittels ERG nötig, da auch andere retinale Dysfunktionen parafoveale Veränderungen zeigen können<sup>51,72</sup>. Ein negatives ERG in der kombinierten skotopischen Stäbchen-Zapfenantwort, gilt als ein Hauptkriterium für die Diagnose der XLRS<sup>34</sup>.

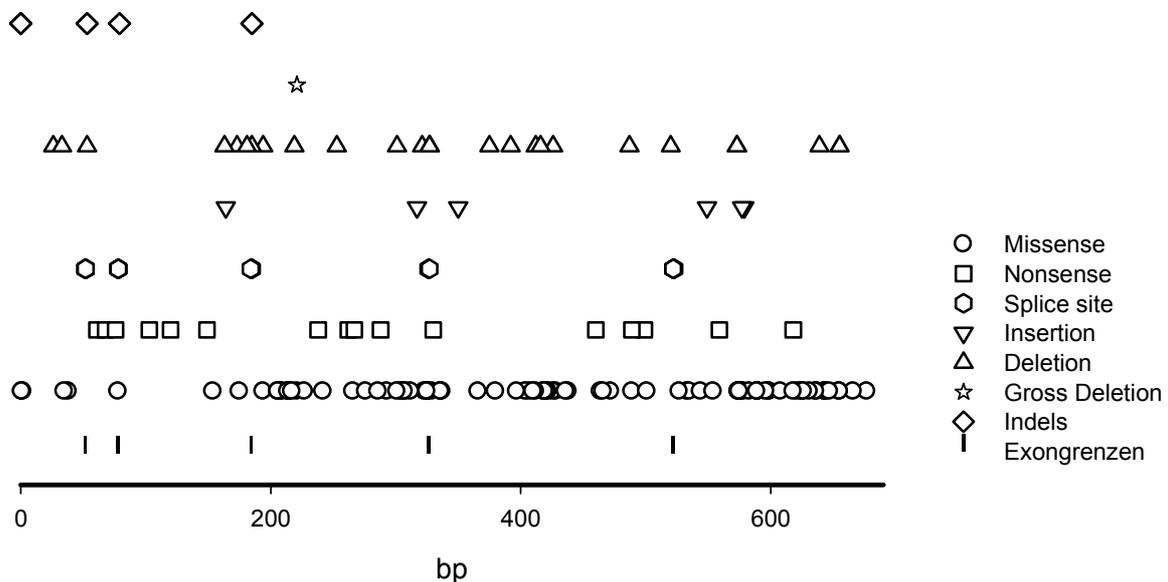
Das EOG zeigt in der Regel keine Auffälligkeiten. Das Fluoreszenzangiogramm ist am Anfang der Krankheit normal, im späteren Verlauf zeigt es zentrale Hyperfluoreszenzen mit Makulaatrophie<sup>30</sup>. Konduktorinnen können leichte ERG-Veränderungen zeigen, aber ansonsten unauffällig bleiben<sup>33</sup>. Charakteristische Fundusbilder mit einer selektiven oder stark verkleinerten b-Welle im ERG sind die deutlichsten diagnostischen Hinweise für eine XLRS<sup>4</sup>. Die Prognose für einen Visusverlust ist individuell variabel. Wie oben erwähnt wird er aber stark von sekundären Komplikationen beeinflusst, wie z.B. dem Auftreten von vitreoretinalen Blutungen, regionalen Netzhautablösungen oder dem Entstehen eines neurovaskulären Glaukoms<sup>23</sup>.

### **1.2.3. Das RS1-Gen**

Das für die X-gebundene juvenile Retinoschisis verantwortliche bzw. ursächliche Gen ist das *RS1* Gen<sup>57</sup>. Der *RS*-Genlocus wurde auf dem distalen kurzen Arm des X-Chromosoms Xp22.2 innerhalb einer etwa 900 Kilobasen (kb) großen Region lokalisiert. Es kodiert ein netzhautspezifisches Protein, Retinoschisin, das in der

Retina<sup>57</sup> und in der Glandula pinealis von den Pinealozyten als homo-oktamerischer Proteinkomplex exprimiert wird<sup>65</sup>. In der Retina wird *RS1* von den Photorezeptoren, den Bipolarzellen und den Ganglienzellen synthetisiert<sup>65</sup>. *RS1* ist ein peripheres Membranprotein. Obwohl es auf beiden Seiten der Membranoberfläche verteilt ist, assoziiert es hauptsächlich über das innere Segment der Plasmamembran mit einer hohen Affinität zu anionischen Phospholipiden und zweiwertigen Kationen<sup>71</sup>. Das *RS1*-Gen kodiert für ein Protein von 224 Aminosäuren<sup>61</sup>, wobei die ersten 23 N-terminalen Aminosäuren eine stark hydrophobe Region darstellen und vermutlich für die Sekretion des Proteins verantwortlich sind<sup>57</sup>. *RS1* enthält eine hoch konservierte Discoidindomäne (Kodon 68-217), die in vielen verschiedenen Spezies und Proteinen zu finden ist<sup>1,57</sup>. In Datenbankanalysen konnten insgesamt 29 Proteine identifiziert werden, die ein oder zwei Discoidindomänen im murenen Protein aufweisen<sup>1,57</sup>. Die jeweiligen Proteine erfüllen zum Teil ganz unterschiedliche Funktionen. Die Discoidindomäne spielt aber immer eine sehr wichtige Rolle bei der Etablierung von Zell-Interaktionen<sup>5</sup>. Das *RS1*-Gen besitzt sehr ähnliche funktionelle Eigenschaften in der Netzhaut. *RS1* wird von Photorezeptoren der äußeren Retina und der Bipolarzellen der inneren Retina als ein Oligomerprotein-Komplex exprimiert, der über Disulfidbrücken verbunden ist<sup>48</sup>. Der sezernierte Komplex kann mit der Oberfläche dieser Photorezeptorzellen über Zelladhäsion assoziieren und somit die Integrität bzw. Organisation der zentralen und peripheren Retina unterstützen und stabilisieren<sup>47</sup>. Es wurde auch gezeigt, dass Retinoschisin mit der Oberfläche der Photorezeptor- und Bipolarzellen durch seine Interaktion mit einem Multi-Protein-Komplex verankert ist, der die Na/K-ATPase und das Protein SARM1 enthält. Dieser Komplex ist Teil eines Signalweges, der für die Struktur und die Funktion der Photorezeptor- und Bipolarsynapse und der normalen Interaktion zwischen den Zellen und der extrazellulären Matrix verantwortlich ist. Wenn eine Mutation im *RS1* liegt, wird dieser Signalweg unterbrochen und führt zur Destabilisierung der retinalen Zellorganisation<sup>48,49</sup>. Ebenso spielt Retinoschisin eine Rolle als Bindungspartner zwischen Untereinheiten eines Kalzium Kanals vom L-Typ (L-type voltage-gated calcium channel, L-VGCC) und der Photorezeptor-Bipolarsynapse<sup>58</sup>. Die Regulation der Expression von *RS1* unterliegt einem zirkadianen Rhythmus: bei Nacht ist sie höher als während des Tages<sup>38</sup>. Eine Blockade von L-VGCC dämpft diesen Rhythmus, jedoch ist der molekulare Mechanismus von *RS1* nicht abhängig von L-

VGCC<sup>38</sup>. Bei XLRS wird das Adhäsionsprotein, welches für den Zellzusammenhalt in der retinalen Entwicklung wichtig ist, nicht bzw. nur fehlerhaft exprimiert. Dieses wird typischerweise im Qualitätskontrollsystem des endoplasmatischen Retikulums zurückgehalten und abgebaut<sup>49</sup>. Die meisten Missense-Mutationen des *RS1*-Gens wurden in den Exons gefunden, die für die Discoidindomäne kodieren<sup>60</sup>. Man kann daraus schließen, dass Retinoschisis durch einen Funktionsverlust verursacht wird<sup>20</sup>. Bis jetzt wurden 180 verschiedene krankheits-assoziierte Mutationen im *RS1*-Gen identifiziert und somit konnte der kausale Zusammenhang zwischen diesem Gen und der Erkrankung bestätigt werden<sup>60</sup>. Insgesamt besteht das *RS1*-Gen aus sechs Exonen. Die gefundenen Mutationen umfassen Missense- (60%), Splice Site- (10%) und Nonsense-Mutationen (9%), sowie kleine intragenische Deletionen/Insertionen (17%) und größere Deletionen (4%) (siehe Abb.: 3)<sup>57</sup>, die meistens im Exon 4, 5 oder 6 lokalisiert waren<sup>1,26,33</sup>.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der 6 Exone des *RS1*-Gens** und der Verteilung der bisher beschriebenen 180 unterschiedlichen Mutationen, die mit der X-gebundenen juvenilen Retinoschisis assoziiert sind. Mutationen sind repräsentiert durch die jeweiligen Zeichen (siehe Legende rechts). Ein aufrechter Balken zeigt die Grenzen zwischen den Exons an.

### 1.2.4. Therapie

Derzeit gibt es keine kausale Therapie für die XLRS. Abhängig von der Visusminderung können vergrößerte Sehhilfen die Lebensqualität steigern. Prophylaktische Laserkoagulationen der peripheren Retinoschisis sind aufgrund des Ablationsrisikos kontraindiziert. Glaskörperblutungen resorbieren sich in der Regel spontan. Die vitreoretinale Chirurgie ist bei ausgeprägter Netzhautablösung oder langer persistierender Glaskörperblutung indiziert. Bei manchen Patienten konnte die Behandlung mit Dorzolamid eine Verringerung der Makulazysten bewirken<sup>73</sup>. Weber et al. konnten 2002 Knock-out Mäuse herstellen, die als Modelle für die bisher unheilbare Krankheit verwendbar sind. An diesen Mäusen konnte zum ersten Mal die Entstehung der Krankheit studiert und mögliche Therapieformen geprüft werden<sup>74</sup>. Es wurde gezeigt, dass der Erkrankungsprozess der XLRS verlangsamt und effektiv eine progrediente Zerstörung der Netzhaut verhindert werden konnte, wenn die Mäuse 12 Tage nach der Geburt mit dem klonierten *RS1*-Gen unter der Kontrolle eines murinen Opsinpromotors durch subretinale Injektion über einen Adeno-assoziierten Virus-Vektor vom Serotyp 5 (AAV5) behandelt wurden<sup>37,66</sup>. Eine einmalige Anwendung dieser Gensatztherapie hat einen anhaltenden Effekt für das Überleben der Photorezeptoren und die Integrität der Netzhautstrukturen über die gesamte Lebensdauer der behandelten Tiere<sup>46</sup>. Mehrere Wissenschaftler konnten mittlerweile an Mäusen zeigen, dass eine Gentherapie eine effektive Behandlung für viele XLRS-Patienten sein könnte<sup>15,16,46,75</sup>.

### 1.3. Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit wurden Mutationsanalysen an DNA aus Blutproben von Patienten durchgeführt, für die nach der klinischen Untersuchung der Verdacht auf eine X-gebundene juvenile Retinoschisis gestellt wurde. Ziel war es, die *RS1*-Genotypen festzustellen und mit den retrospektiv ausgewerteten phänotypischen Merkmalen der Patienten zu korrelieren.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Patienten

Zwischen 1992 und 2007 wurden insgesamt 43 Personen in der Abteilung für Kinderophthalmologie, Strabismologie und Ophthalmogenetik des Universitätsklinikums Regensburg mit der Verdachtsdiagnose einer X-gebundenen juvenilen Retinoschisis diagnostiziert. Alle Patienten wurden gemäß der Erklärung von Helsinki aufgeklärt. Ein positives Ethikvotum lag für die Studie vor. Die ophthalmologischen Daten sind im Abschnitt Ergebnisse erfasst und zusammengestellt. (Tabelle 15 und 16)

### 2.2. Materialnachweis

#### 2.2.1. Geräte und Zubehör in der Molekulargenetik

Gerät	Typ	Hersteller
Blockthermostat	QBT2	Grant, Cambridge
Gelelektrophorese-Kammern (horizontal) für Agarose	Horizon 11.14, 20.25, 58	Biometra/ Whatmann, Göttingen
Gelelektrophorese-Kammern (vertikal) für Polyacrylamid	Multigel long 1mm Maxigel 1mm	Biometra/ Whatmann, Göttingen
Geltrockner	Minidry D61	Biometra/ Whatmann, Göttingen
Fotodokumentation		MWG Biotech, Ebersberg
Kühlzentrifuge Rotoren	4K15 11150/ 13350 swing out	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz
Kühlthermostat	C10, K15	Haake, Karlsruhe

Mikropipetten	Reference/Research	Eppendorf, Hamburg
Photometer	Gene Quant II	Pharmacia-Amersham, Freiburg
Schüttelgerät	Vortex-2-gene	Scientific Industries
Spannungsgerät 1	Power supply PS305T	Biometra/ Whatmann, Göttingen
Spannungsgerät 2	Power supply PS3002	Biometra/ Whatmann, Göttingen
Tischschüttler	Stovall belly dancer	Labline/CLF Laborgeräte, Emersacker
Tischzentrifuge Rotor	Biofuge Fresco 3765	Heraeus Instruments, Hanau
Thermocycler	Cyclone 96 Gradient Cyclone 96 Cyclone 25	Peqlab, Erlangen
	PTC100	MJ Research, Inc./Biozym, Hess. Oldendorf
UV-Illuminator	TFX-20-M	MWG Biotech, Ebersberg
Vortex	Vortex Minishaker MS1	IKA/Laborcenter, Staufen
Waage	Basic-Plus BP1200	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	1003	GFL, Burgwedel

**Tabelle 1: Geräte in der Molekularbiologie**

### 2.2.2. Geräte in der Phänotypisierung

Untersuchungsmethode	Gerät	Hersteller
Fundusphotographie	TOPCON TRC 50X	Topcon Optical, Tokyo, Japan
Kinetische Perimetrie	Goldmann Perimeter	Haag-Streit, Bern, Switzerland
Fundusautofluoreszenz	Heidelberg Retina Angiograph (HRAI)	Heidelberg Engeneering, Heidelberg, Germany
2-Farbenperimetrie	Humphrey-Field- Analyzer	Model 640 modyified by F. Fitzke, Institute of

		Ophtalmology, London
Optische Kohärenztomographie (OCT3)	Stratus OCT System	Carl Zeiss Meditec Inc., Dublin, CA
Ganzfeld-Elektroretinographie (ERG)	Nicolet Spirit	Madison, WI, USA
Multifokales ERG:	VERIS™ Multifocal System	Electro-Diagnostic Imaging Inc. Redwood City, CA, USA

**Tabelle 2: Geräte in der Phänotypisierung**

### 2.2.3. Chemikalien

Reagenzien	Summenformel	Bestell.Nr.	Hersteller
Acrylamid, Rotiphorese Gel 40 (19: 1)		7908.1	Roth, Karlsruhe
Agarose Seakem LE		84004	Biozym, Hess. Oldendorf
Agarose Small DNA low melt		870093	Biozym, Hess.
Ammoniumchlorid p.A. ACS, ISO	NH <sub>4</sub> Cl	101145	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS) p.A. ACS	H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> S <sub>2</sub>	101201	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau Indikator	C <sub>19</sub> H <sub>10</sub> Br <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S	103022	Merck, Darmstadt
Dimethylformamid p.A. ACS, ISO	(CH) <sub>2</sub> CNO	103053	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO) z.S.	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> OS	802912	Merck, Darmstadt

Essigsäure Rotipuran 100 % p.A.	$\text{CH}_3\text{COOH}$	3738	Roth, Karlsruhe
Ethanol absolut mit 1 % <u>Methyl-Ethyl-Keton</u> (MEK) z.S. (99,8 % Ethanol)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	1170	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid p.A. (1 %-Lösung in $\text{H}_2\text{O}$ )	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{BrN}_3$	111608	Merck, Darmstadt
<u>Ethylendinitril</u> otetraessigsäure-Dinatrium-Dihydrat (EDTA) für Mikrobiologie Titriplex	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	112029	Merck, Darmstadt
Gene Ruler DNA Ladder Mix (100-10000 bp)		SM0331	MBI Fermentas, ST, Leon-Roth
Glycerin	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$	7530.1	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	$\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$	9866.2	Apotheke Uniklinikum, Roth Karlsruhe
Kaliumacetat p.A. für Mikrobiologie	$\text{KCH}_3\text{COO}$	104830	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid $\geq 99,5$ % p.A.	$\text{KCl}$	6781	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogencarbonat p.A.	$\text{KCHO}_3$	104854	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid wasserfrei z.S.	$\text{MgCl}_2$	814733	Merck, Darmstadt
N, N, N', N'- <u>Tetramethylethylendiamin</u> (Temed) p.A.	$\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$	110732	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat wasserfrei p.A. ACS, ISO	$\text{Na}_2\text{CO}_3$	106393	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid p.A. ACS,	$\text{NaCl}$	106404	Merck, Darmstadt

ISO			
<u>Natriumdodecylsulfat</u> (SDS) ultra pure 99 % für die Elektrophorese	$C_{12}H_{25}NaO_4S$	2326	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat p.A. ISO	$NaCHO_3$	106329	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid Plättchen rein	$NaOH$	106462	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd z.S.	$(CH_2O)_n$	818715	Merck, Darmstadt
Roti-Phenol zur DNA- Analyse	$C_6H_6O$	0038	Roth, Karlsruhe
Sucrose p.a.	$C_{12}H_{22}O_{11}$	35579	Serva, Heidelberg
Silbernitrat p.A. ACS, ISO	$AgNO_3$	101512	Merck, Darmstadt
Trichlormethan/Chloroform Rotipurán ≥ 99 % p.A.	$CHCl_3$	3313	Roth, Karlsruhe
Tris (hydroxy-methyl)- aminomethan, p.A.	$H_2NC(CH_2OH)_3$	1.08382	Merck, Darmstadt
Salpetersäure 65 % p.A, ISO	$HNO_3$	100456	Merck, Darmstadt
Xylencyanol für die Elektrophorese	$C_{25}H_{27}N_2NaO_6S_2$	110590	Merck, Darmstadt
Gel Blotting Papier GB002		426693	Schleicher und Schuell, Dassel
Geltrocknungsfolie- Cellophan		041-004	Biometra/ Whatman Göttingen

**Tabelle 3: Chemikalien**

## 2.2.4. Enzyme

Enzym	Temperatur und Inkubationsdauer	Units/ $\mu$ l	Verwendung	Bestell. Nr.	Hersteller
Go Taq DNA Polymerase	72 °C	5	PCR	18657913	Promega, Mannheim
Alu I	37° C, 1h	10	DNA-Restriktion	45200-29/045	Gibco BRL, Life Technologies
Bfa I	37° C, 1h	5	DNA-Restriktion	R0568	New England Biolabs, Frankfurt
Cfr 13 I	37°C, 1h	10	DNA-Restriktion	RG0842	MBI Fermentas, St. Leon Roth
Hpy 8 I	37° C, 4h	10	DNA-Restriktion	BSA62-313P	MBI Fermentas, St. Leon Roth
Msp I	37° C, 4h	20	DNA-Restriktion	R0106	New England Biolabs, Frankfurt
Nla III	37° C, 1h	10	DNA-Restriktion	R0125	New England Biolabs, Frankfurt
Taq I	65° C, 4h	10	DNA-Restriktion	ER0672	MBI Fermentas, St. Leon Roth

Tabelle 4: Enzyme

### 2.2.5. Kits

Kit	Bestellnummer	Hersteller
Just Spin Gel Extraction	S5337.0004	Genaxxon BioScience, Ulm
NucleoSpin Extract II: PCR clean up Gel extraction	740609.50	Macherey-Nagel, Düren

Tabelle 5: Kits

### 2.2.6. Puffer und Lösungen

Bei den beschriebenen Methoden wurden Stammlösungen verwendet, die auf ihre unterschiedlichen Gebrauchskonzentrationen mit Ionenaustauscherwasser (dH<sub>2</sub>O) eingestellt wurden.

Lösungen	Verdünnung
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	10 % (w/v)
Essigsäure (Stopplösung)	5 % (50 ml / l)
Ethanol (Fixierer)	10 % (100 ml Ethanol abs. vergällt / l)
Ethidiumbromid	1 % (w/v)
MgCl <sub>2</sub>	25 mM (5,08 g / l)
Kochsalz, NaCl	6 M (350,64 g / l)
Natronlauge, NaOH	50 mM (40 g / l)
Natriumcarbonat, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,28 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (29,6 g / l)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	10% (w/v)
Salpetersäure, HNO <sub>3</sub> (Oxidizer)	1 % (15,4 ml 65 % / l)
Silbernitrat, AgNO <sub>3</sub>	0,012 M AgNO <sub>3</sub> (2,02 g / l)
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, 1,2- Bis (dimethylamino)-ethan (TEMED)	10 % (v/v)

Tris- (hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	1 M (pH 7,6) (121,1 g / l)
--	----------------------------

**Tabelle 6: Puffer und Lösungen**

Sofern nicht anders vermerkt, wurden die Bestandteile der Puffer eingewogen und zu 80% Endvolumen in dH<sub>2</sub>O gelöst. Der pH-Wert wurde entweder mit Natronlauge oder Salzsäure eingestellt und auf das Endvolumen mit dH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Danach wurden die Lösungen bei 121°C und 1,2 bar Überdruck für 20 Minuten autoklaviert.

**10 x TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA Puffer)**

- 1 M Tris (121 g/l)
- 10 mM EDTA x 2 H<sub>2</sub>O x 2 Na (3,72 g/l)
- 0,83 M Borsäure (51,36 g/l)
- ad 1l ddH<sub>2</sub>O lösen
- pH 8,0 (autoklaviert)

**SSCP-Puffer**

- 10 ml Formamid (deionisiert)
- 1 ml 1% Bromphenolblau
- 1 ml 1% Xylencyanol
- 20 µl 0,5 M Na\*EDTA
- pH 8,0

**Gel-Ladepuffer**

- 40 % Sucrose
- 0,05 % Bromphenolblau
- 0,05 % Xylencyanol
- in 1x TBE ad 100 ml ddH<sub>2</sub>O

### **1x TE-Puffer**

- 0,01 M Tris
- 0,005 M EDTA
- pH 8,0
- ad 1 l

### **Lysis Puffer**

- 155 mM Ammoniumchlorid (41,45 g)
- 10 mM KHCO<sub>3</sub> (5 g)
- 0,1 mM EDTA\*2Na (0,185 g)
- ad 5 l dH<sub>2</sub>O
- pH 7,4

### **SE-Puffer**

- 75 mM NaCl (4,39 g)
- 25 mM EDTA\*Na (9,3 g)
- ad 1 l dH<sub>2</sub>O
- pH 8,0 mit NaOH konzentriert

### **Pronase Puffer**

- 2 ml 1 M Tris (pH 7,8)
  - 4 ml 0,5 M EDTA
  - ad 100 ml dH<sub>2</sub>O
    - 10 ml der obigen Mischung
    - 1 ml 10 % SDS
  - 9 ml dH<sub>2</sub>O
  - ad 200 mg Pronase E
- portionieren und einfrieren

## Polyacrylamid- bzw. Bis-Acrylamidlösungen

Ansatz für ein 8 %-Gel:

Stoffe	Kleine Kammer	Große Kammer	Endkonzentration
40 % Rotiphorese Gel 29: 1	3 ml	7 ml	8% PAA
10x TBE	1,5 ml	3,5 ml	1x TBE
dH <sub>2</sub> O	10,5 ml	24,5 ml	
10 % APS	150 µl	350 µl	0,1 % APS
TEMED	15 µl	35 µl	0,001% TEMED
<b>Laufstrecke</b>	<b>11 cm</b>	<b>18 cm</b>	

Tabelle 7: Zusammensetzung eines 8% PAA-Gels

Ansatz für ein 10 %-Gel mit 6 %-Gelüberschichtung:

Stoffe	Kleine Kammer	Große Kammer	Endkonzentration
40% Rotiphorese Gel 29: 1	3,75 ml	7,5 ml	10% PAA
10x TBE	1,5 ml	3 ml	1x TBE
dH <sub>2</sub> O	9,75 ml	19,5 ml	
10 % APS	150 µl	300 µl	0,1 % APS
TEMED	15 µl	30 µl	0,001% TEMED
40 % Rotiphorese Gel 29: 1	0,375 ml	0,75 ml	6% PAA
10x TBE	0,25 ml	0,5	1x TBE
dH <sub>2</sub> O	1,875 ml	3,75 ml	
10 % APS	25 µl	50 µl	0,1 % APS

TEMED	2,5 µl	5 µl	0,001% TEMED
Laufstrecke	11cm	18cm	

**Tabelle 8: Zusammensetzung von 6% und 10% PAA-Gelen**

Zur Verbesserung der Laufbedingungen wurden die Gele teilweise mit 0,5x TBE oder 5 % Glycerin versetzt.

## Lösungen für die Molekularbiologie

### 100 bp DNA-Ladder

- 500 ng DNA-Ladder
- 4 µl Ladepuffer
- ad 10 µl 1x TE

### dNTP (1,25 mM)

- 12,5 µl 100 mM Desoxy-Adenosintri-phosphat (dATP)
- 12,5 µl 100 mM Desoxy-Guanosintri-phosphat (dGTP)
- 12,5 µl 100 mM Desoxy-Cytosintri-phosphat (dCTP)
- 12,5 µl 100 mM Desoxy-Thymidintri-phosphat (dTTP)
- ad 1 ml mit 1x TE auffüllen und bei -20°C einfrieren

## 2.3. Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1. Gewinnung der DNA-Proben

Bei den Patienten und den beteiligten Familienmitgliedern wurde peripheres venöses Blut abgenommen (bei Kindern < 4 Jahre 4 ml, bei Kindern ≥ 4 Jahre und Erwachsenen 10 ml), welches mit EDTA zur Gerinnungshemmung versetzt wurde.

Falls eine Blutentnahme bei einem Patienten nicht möglich war, wurde ein Mundschleimhautabstrich aus der Wangeninnenseite genommen. Dabei wurde für ein paar Sekunden mit einem sterilen Wattestäbchen an der Wange des Probanden gerieben, um es dann in einem Reaktionsgefäß bis zur DNA-Isolation aufzubewahren.

### **2.3.2. DNA-Isolation aus Vollblut**

Die Isolation aus Vollblut erfolgte nach der Methode von Miller, Dykes und Polesky<sup>45</sup>. Zu dieser Methode benötigte man folgende Puffer:

- Lysis Puffer
- SE-Puffer
- Pronase Puffer
- 6 M NaCl (350,64 g / l)
- 0,15 M KCl (11,184 g / l)
- Pronase E

Diese Methode hat den Vorteil, dass große genomische Fragmente isoliert werden können, da die DNA hierbei einer geringen mechanischen Schädigung unterliegt. Es wurden 10 ml Blut der Probanden mit 30 ml Lysis-Puffer in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen gemischt (NH<sub>4</sub>Cl-Lyse). Die Mischung wurde 30 min auf Eis gestellt und alle fünf Minuten aufgeschwemmt, um die Lyse zu verbessern. Ziel war es, die kernlosen Erythrozyten von den kernhaltigen weißen Blutkörperchen zu trennen. Die Erythrozyten wurden somit lysiert und die kernhaltigen Zellen (Lymphoblastoide, Fibroblasten etc.) wurden pelletiert. Danach wurde das

Zentrifugenröhrchen 10 min lang bei 4°C und 281 g in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Den Überstand dekantierte man und ließ das Zentrifugenröhrchen gut austropfen. Daraufhin wurden 10 ml Lysispuffer dazugegeben, um das sichtbare Pellet am Röhrchenboden zur Suspension zu bringen. Anschließend wurde die Suspension nochmals bei gleichen Bedingungen wie oben, zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut dekantiert und das verbliebene Pellet mit den kernhaltigen Zellen und Erythrozytenzellmembranen mit 10 ml 0,15 M KCl resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Der Vorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt und der Überstand erneut dekantiert. Zum Pellet wurden 5 ml SE-Puffer, 25 µl Pronase E-Lösung und 250 µl 20%-iges SDS gegeben und das Gemisch kurz auf dem Vortex vermengt, um es dann entweder bei 37°C über Nacht im Wasserbad oder bei 55°C für mehrere Stunden zu inkubieren. Bei der Inkubation kam es zur Proteolyse der kernhaltigen Zellen (Aufbrechen der Membranen) und die DNA wurde freigesetzt. Anschließend wurde 1,4 ml gesättigte sterile NaCl-Lösung bei Raumtemperatur hinzugefügt und ca. 15 Sek. auf dem Vortex gemischt. Nach einer 20-minütigen Zentrifugation bei 5525 g und 20°C Raumtemperatur befand sich die DNA im Überstand, der in ein neues, sauberes 50 ml Zentrifugegefäß überführt wurde. Falls der Überstand nicht klar war, musste die Zentrifugation wiederholt werden. Zur DNA-Fällung wurde das 2-2,5 fache Volumen des Überstandes als eiskaltes absolutes Ethanol bei Raumtemperatur hinzugefügt. Im Anschluss wurde das gut erkennbare DNA Knäuel 20 Minuten bei 4°C abzentrifugiert (5525 g). Der Rest wurde dekantiert und die DNA blieb im Pellet zurück, das anschließend mit 70%-igem Ethanol gewaschen und nochmals wie vorher abzentrifugiert wurde. Der Überstand wurde dekantiert und bei Raumtemperatur ca. 2-3 Stunden getrocknet. Die getrocknete DNA wurde in 500 µl sterilem TE-Puffer bei Raumtemperatur für mehrere Stunden gelöst. Später wurde die DNA-Konzentration und Reinheit photometrisch bestimmt, wobei man mit folgenden Werten rechnen konnte:

DNA Konzentration: 300 - 800 µg / ml

Ausbeute: 150 - 400 µg

Reinheit ( $OD_{260/280 \text{ nm}}$ ): 1,7 - 1,9

### **2.3.3. DNA-Isolation aus Mundschleimhautabstrichen**

Puffer: - 50 mM NaOH (0,2 g / 100 ml)

- autoklavieren

- 1 M Tris, pH 7,6 (121,1 g / l)

Der Wattebauschkopf des Mundschleimhautabstrichs des Patienten (siehe 2.3.1.) wurde in ein Reaktionsgefäß mit 600 µl 50 mM NaOH gegeben und bei 90°C 5 min lang inkubiert. Der Wattebauschkopf wurde entfernt und 50 µl 1 M Tris-Lösung zugefügt. Anschließend wurde der Ansatz bei maximaler Geschwindigkeit für zehn Minuten in der Biofuge abzentrifugiert, um hinterher den Überstand abnehmen zu können. Nun konnte der Ansatz im Kühlschrank gelagert werden, bis die DNA zur PCR (siehe 2.5.) eingesetzt wurde. Aufgrund der geringeren DNA-Konzentration der Lösung als bei der Isolation aus Blutzellen, wurde diese Lösung mit 1/5 des PCR-Volumens eingesetzt.

### **2.3.4. Phenol-Chloroformextraktion von DNA**

Um hydrophobe Verunreinigungen (z.B. Proteinanteile) in DNA-Proben zu verringern, war manchmal eine Phenolextraktion der DNA von Nöten, da durch die Verunreinigungen die PCR gestört werden konnte. Von der verunreinigten DNA-Lösung wurde das Volumen mit einer Mikropipette bestimmt und das Ganze in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dasselbe Volumen TE-gesättigtes Phenol wurde nun hinzupipettiert und einmal durchgeschüttelt, bis die Flüssigkeit trüb wurde. Das Gefäß wurde anschließend für 10 min auf maximaler Stufe bei 20°C zentrifugiert. Danach nahm man die obere (wässrige) Phase sehr vorsichtig, ohne die untere (organische) Phase zu berühren, mit einer Pipette ab und pipettierte sie in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß. Zur wässrigen Lösung wurde das identische Volumen an Chloroform hinzugegeben, geschüttelt und wiederholt zentrifugiert. Die obere Phase wurde wieder in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und nochmals ein

gleiches Volumen Chloroform dazugegeben. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde die obere Phase wieder abpipettiert und in ein neues Falcon überführt und darauffolgend einer DNA-Fällung unterzogen (siehe 2.3.5.).

### 2.3.5. Ethanolfällung

Reagenzien:

- 3 M NaAc
- abs. Ethanol (-20°C)
- 70 % Ethanol
- 1 x TE-Puffer

Um die erforderliche Quantität an DNA zu erreichen wurde DNA, die eine zu geringe Konzentration aufwies, mit einer Ethanolfällung aufkonzentriert. Als erster Schritt wurde zur wässrigen DNA-Lösung  $\frac{1}{10}$  ihres Volumens 3 M NaAc-Lösung dazugegeben. Zusätzlich wurde die Lösung mit dem 2-2,5 fachen Volumen mit eiskalten Ethanol absolut (-20 °C) versetzt. Nachdem dies gut gemischt wurde, fiel die DNA als weißes Knäuel aus. Nach einer 20-minütigen Zentrifugation bei maximaler Drehzahl in der Biofuge bei 4°C befand sich die DNA im Pellet und der Überstand konnte vorsichtig abgeschüttet werden. Um die restlichen Salze herauszulösen und die DNA zu waschen, wurden 100 µl 70 %-iges Ethanol hinzugefügt und der Ansatz bei maximaler Umdrehung für 10 Minuten bei Raumtemperatur in der Biofuge abzentrifugiert. Die gewaschene DNA befand sich im Pellet, welches bei Raumtemperatur getrocknet wurde, nachdem das Ethanol dekantiert wurde. Die DNA wurde in 1 x TE-Puffer gelöst, wobei das angepasste Volumen geringer sein sollte als das ursprüngliche Volumen. Danach wurden die Konzentration und der Reinheitsgrad photometrisch bestimmt (siehe 2.4.).

## 2.4. Nukleinsäurekonzentrationsmessung mit dem Photometer

Die Konzentration der DNA wurde mit Hilfe des Photometers bestimmt. Das Prinzip bei der Messung beruht auf der Ausnutzung der Lichtabsorption gelöster DNA in einem Puffer bei einer Wellenlänge von 260 nm. Dies ist das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren. Die Messung der optischen Dichte soll deshalb immer bei ca. 260 nm ( $OD_{260nm}$ ) erfolgen. Mit einer Messung bei 230 und 280 nm wird der Reinheitsgrad der Nukleinsäurelösung bestimmt (Verhältnis DNA-Menge zu Protein-Verunreinigung). Bei Messwerten (Verhältnis  $OD_{260nm} / OD_{280nm}$ ) zwischen 1,7-2,0 kann auf eine ausreichende Reinheit der Probe geschlossen werden. Bestenfalls sollte der Absorptionswert zwischen +0,09 - 0,99 liegen und die Konzentration sollte größer als 10 µg/ ml betragen, um gute Ergebnisse für die spätere Arbeit mit den Lösungen zu erzielen.

Die Messung erfolgte mit einer sauberen Küvette, die vor Benutzung und nach jeder Probe gründlich mit destilliertem Wasser gespült wurde. Vorher wurden 5 µl DNA-Probenlösung und 5 µl 1 x TE-Puffer in einem sterilen Reaktionsgefäß verdünnt und davon 7 µl in die Messküvette pipettiert.

Die Absorption wurde gegen TE-Puffer gemessen und die Konzentration und Reinheit vom Gerät automatisch berechnet. (Konzentration [µg/ml] = molarer Extinktionskoeffizient (DNA: 50 µg/ml) \* Verdünnungsfaktor \*  $OD_{260nm}$ )

## 2.5. Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Einen Durchbruch für die Gentechnik stellte das 1984 von Kary Mullis entwickelte Verfahren der Polymerasekettenreaktion (engl.: Polymerase Chain Reaction, PCR) dar<sup>42</sup>. Die PCR ermöglicht es in-vitro spezifische, selektierte Sequenzabschnitte einer DNA definierter Sequenz und Länge zu amplifizieren. Mit Hilfe der PCR können kleinste Mengen genetischen Materials nachgewiesen und vervielfältigt werden<sup>41</sup>. Die Vorgänge bei der Vervielfältigung einer Nukleinsäure mittels PCR ähneln dem Reaktionsablauf der natürlichen Replikation: Eine DNA-Polymerase synthetisiert

ausgehend von Startermolekülen an einer einzelsträngigen Nukleinsäure-Matrize einen neuen DNA-Strang. Die doppelsträngige DNA wird durch Erhöhen der Temperatur auf ca. 94 °C denaturiert. Nach raschem Abkühlen auf etwa 55-61 °C binden zwei synthetische Oligonucleotide (Primer), die der Sequenz an den 5'-Enden der beiden Einzelstränge komplementär sind. Daraufhin wird die Temperatur wieder auf 72 °C erhöht, um die Synthese des PCR-Produktes durchzuführen<sup>42</sup>. Durch eine hitzestabile DNA-Polymerase, z.B. aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* (Taq-Polymerase)<sup>8</sup>, wird ausgehend vom 3'-Ende des Primers der neue DNA-Doppelstrang synthetisiert, so dass nun zwei Doppelstränge vorliegen. Durch geeignete Wahl eines gegenläufigen Primerpaares kann die gewünschte DNA-Sequenz zwischen den Primern millionenfach vervielfältigt werden<sup>53</sup>. Derartige Reaktionszyklen ermöglichen eine exponentielle Vermehrung definierter DNA-Fragmente.

Für eine Standard-PCR wurden folgende Bedingungen gewählt:

#### **Pipettierschema für einen Mastermix [pro Ansatz]**

<b>Reagenz</b>	<b>Menge [µl]</b>
PCR-Reaktions-Puffer (5x)	5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2
dNTP (1,25 mM)	4
Forward Primer (10 pmol / µl)	1
Reverse Primer (10 pmol / µl)	1
DNA Template (20 ng / µl)	5
Taq-Polymerase Go Taq (5 U / µl)	0,1
(DMSO (Stringentium))	(1)
ddH <sub>2</sub> O	ad 25

**Tabelle 9: Mastermix PCR**

In einem Reaktionsgefäß wurden 5 µl (20 ng/ µl) DNA-Probe und 20 µl von dem zuvor hergestellten Mastermix (Tabelle 9) angesetzt. Bei sehr schwer zu

vervielfältigenden DNA-Sequenzen gab man 1 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) zum Mastermix dazu, um eine Entspannung der DNA zu erreichen. Somit wurde die Hybridisierung erleichtert. Die DNA-Polymerase wurde durch 5-minütiges Erhitzen auf 94 °C aktiviert (Hot Start) und der zu amplifizierende DNA-Doppelstrang vollständig denaturiert. Daraufhin folgten 35 Zyklen mit jeweils 60 Sekunden Denaturierung bei 94 °C, Hybridisierung der Primer bei 55-61 °C für 60 Sekunden (Annealing oder Primeranlagerung) und Elongation bei 72 °C für 1 Minute. Die Annealing-Temperatur wurde für jedes Primerpaar optimiert. Durch Verlängerung des Elongationsschrittes auf 10 min wurde die Reaktion zum Abschluss gebracht. Anschließend wurden 5 µl PCR-Produkt auf einem Agarosegel aufgetrennt und analysiert. Das angewandte Programmprofil ist in Tabelle 10 dargestellt.

### Standard-PCR-Programmierung

Programmteil	Temperatur	Dauer	Reaktion
Initiale Denaturierung	94 °C	5 min	Denaturierung
Annealing	55 - 61 °C	1 min	Primeranlagerung
Extension	72 °C	1 min	Extension
	94 °C	1 min	Denaturierung
Amplifikation: 35 Zyklen			
Finaler Zyklus	60 - 61 °C	1 min	Annealing
	72°C	10 min	Extension

Tabelle 10: Programm für PCR

Die verwendeten Primer für die verschiedenen Genabschnitte des *RS1*-Gens wurden bei der Firma Metabion bestellt und mit ddH<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 10 pmol/µl eingestellt.

Exon	Sequenz (sense / antisense)	Fragmentgröße	T <sub>m</sub>
RS1	CTCAGCCAAAGACCTAAGAACTAAATG / GTATGCAATGAATGTCAATGGTTGA	216 bp	61 °C
RS2	TCTATTTCACTTTTCCATGTAACGAGTG / ACAGCCTTCTTACTGTTACATACCTCG	136 bp	61 °C
RS3	TAAGGACTGATTGTGATCACTCCGT / GCGAAATATAGCCCTGTCCATCTC	276 bp	61 °C
RS4	GGGTTTGTTTTGTTATTTTCAGTCACC / TTAGTAGAGACGGGGTTTCACTGTG	320 bp	61 °C
RS5	GAGAGCCAGCACCTGCGG / GGGTGCGAGCTGAAGTTGG	311 bp	60 °C
RS6	TAGTTAAAAGTTGGGGCTAGCTCCA / GGTTAATTCAGCTGAGTGGGAAAA	414 bp	60 °C

Tabelle 11: Primersequenzen

## 2.6. Die Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode um DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe in einem elektrischen Feld aufzutrennen und die DNA mit Hilfe von fluoreszierenden Farbstoffen nachzuweisen<sup>42</sup>. Die Agarose dient als Matrix, in der die DNA-Fragmente aufgrund des negativ geladenen Phosphatendes im Desoxyribosephosphat der DNA zur Anode wandern.

Agarose besteht aus langkettigen Fäden aus Agarosepolymeren, die zu einem Gel vernetzt werden. Je höher die Agarose konzentriert ist, desto kleiner sind die Poren, die sich in dem Gel befinden. Kleinere Moleküle wandern schneller durch das Gel als größere und es wird somit eine Auftrennung der Stränge nach ihrer Größe, Ladung und ihrer räumlichen Ausdehnung ermöglicht. Die Wanderungsgeschwindigkeit wird folglich durch verschiedene Faktoren, wie die Molekülgröße, die Konformation der DNA, das Trennmedium und die angelegte Spannung beeinflusst. Die einzelnen Fragmente werden durch Ethidiumbromid sichtbar gemacht, da dieses an doppelsträngige DNA bindet, indem es sich parallel zwischen zwei benachbarte Basenpaare einlagert bzw. interkaliert<sup>39,62</sup>. Durch die Interkalation von Ethidiumbromid in Nukleinsäuren nimmt die Intensität der Fluoreszenz-Emission um den Faktor 50-100 zu. Durch UV-Licht wird Ethidiumbromid angeregt und emittiert Licht der Wellenlänge von 590 nm. Auf diese Weise leuchten im Agarosegel die Stellen, an denen sich Nukleinsäuren befinden, hell auf, wenn sie mit UV-Licht bestrahlt werden, während Stellen ohne Nukleinsäuren dunkel erscheinen. Die Fluoreszenzintensität ist dabei proportional zur vorliegenden DNA-Konzentration, sowie zur Länge der Nukleinsäure. Die verwendete Ethidiumbromid-Konzentration im Agarosegel liegt üblicherweise bei 0,1-0,5 µg / ml<sup>2</sup>. Zum Nachweis der PCR-Produkte wurde eine Gelkonzentration von 2% Agarose gewählt.

- Agarose:
  - o für den Routinegebrauch: SeaKem LE Agarose
  - o für Restriktionsendonucleaseverdau: small DNA low melt agarose als 50/50 Agarose (50% Agarose für den Routinegebrauch + 50% small DNA low melt Agarose) für gute Stabilität und feine AuftrennungAnwendung: Restriktionsverdau-Gele, Gele für die DNA Extraktion
- 1x TBE-Puffer
- Gel-Ladepuffer
- Ethidiumbromid
- DNA-Marker (20bp Ladder, 100bp Ladder)

Je nach Gelkammergröße wurde die Agarose in einen Erlenmeyerkolben abgewogen und mit einem entsprechenden Volumen 1x TBE-Puffer gut gemischt. Mit der Waage

wurde das Gewicht des Ansatzes bestimmt, mit einer Alufolie abgedeckt und in der Mikrowelle erhitzt, um die Agarose zu lösen. Die Flüssigkeit erschien dann klar und homogen. Das verdampfte Wasser wurde anschließend mit dH<sub>2</sub>O bis zum originalen Gewicht wieder aufgefüllt. Nachdem Ethidiumbromid zur Flüssigkeit dazugegeben wurde, wurde das Agarosegel auf ca. 41 °C abgekühlt. In die Kammer wurden in der Zwischenzeit die Gelträger und die Kämme, die später die Slots bildeten, eingesetzt. Mit einer kleinen Wasserwaage wurde die Kammer in der Horizontalen austariert und das handwarme Agarosegel konnte gegossen werden. Nach der Aushärtung des Gels wurden die Keile entfernt und die Kammer mit 1x TBE-Puffer gefüllt, so dass das Gel vollständig mit Flüssigkeit überdeckt war. Dann wurden die Kämme vorsichtig entfernt und anschließend 5 µl PCR-Produkt in die Slots geladen. Jeweils im ersten und/ oder letzten Slot der Zeile wurde die gleiche Menge an Molekulargewichtsmarker (DNA-Ladder) aufgetragen. Die Dauer und Stromstärke der Gelelektrophorese war abhängig von der Größe der jeweiligen Kammer:

große Kammer: Sunrise TM 120	Biometra Whatman, Göttingen	120 V, 90 min
mittlere Kammer: Horizon 11.24	Biometra Whatman, Göttingen	90 V, 90 min / 100 V, 75 min
kleine Kammer: Horizon 58	Biometra Whatman, Göttingen	80 V, 75 min (ein Kamm)
		80 V, 45 min (zwei Kämme)

**Tabelle 12: Elektrophoresebedingungen für Agarosegele**

## **2.7. Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)**

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese stellt eine hochauflösende, empfindliche und schnelle Methode für die Nukleinsäureanalytik dar, bei der Moleküle sehr fein aufgetrennt werden können. Ein Acrylamidgel weist feinere Poren auf als ein

Agarosegel und somit können DNA-Fragmente schwieriger durchs Gel wandern und werden deutlicher aufgetrennt. Dies ist besonders hilfreich bei der Untersuchung kleinerer oder nahe beieinander liegender Fragmente.

### **Herstellung eines Polyacrylamid (PAA)-Gels**

Zwischen zwei Glasplatten mit 1mm Abstand wurde das Gel gegossen und anschließend ca. 1h gewartet, bis das Gel auspolymerisiert war. Die jeweiligen Ansätze der verschiedenen PAA-Gele sind unter 2.2.6. in Tabelle 7 und 8 dargestellt. Die Stoffe Acrylamid und N, N-Methylenbisacrylamid wurden einer radikalischen Polymerisation unterzogen, um ein Polyacrylamid zu erhalten. N,N-Methylenbisacrylamid ist für die Quervernetzung des Gels verantwortlich. Ammoniumpersulfat (APS) dient als Radikalstarter und Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Polymerisationskatalysator. Bei einem 10%/6%-igem Gel bestand das Gel aus einem Trenngel (10%), über das eine niedrigere Schicht (ca. 1 cm) Sammelgel (6%) pipettiert wurde, sobald das untere Gel für ca. 15 bis 30 min polymerisierte. Die Elektrophorese-Apparatur (SSCP-Kammer) wurde mit 0,5 oder 1 x TBE-Puffer ca. 2 cm hoch eingefüllt. Anschließend konnten die PAA-Gele langsam und luftblasenfrei in die SSCP-Kammer eingespannt und auch die obere Pufferkammer mit dem jeweiligen TBE-Puffer gefüllt werden. Bevor die Gele mit den vorbereiteten Proben beladen wurden, mussten die Slots gründlich mit 1 x TBE-Puffer gespült werden.

Beim Anlegen einer Spannung wandern die zu trennenden Moleküle aufgrund ihrer Ladung durch das Gel und werden abhängig von ihrer Größe, Molmasse, Ladung und der Beschaffenheit des Trennmediums elektrophoretisch aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde entweder nach 12 oder 16 Stunden beendet. Die Banden wurden anschließend durch eine Silberfärbung sichtbar gemacht (siehe 2.9.).

## 2.8. Die Single Stranded Conformational Polymorphism Analyse (SSCPA)

Die SSCP ist ein schnelles und sensitives, molekulares Nachweisverfahren für Mutationen<sup>64</sup>. Unter normalen Umständen liegt die DNA als Doppelhelix vor, die bestimmte konstante physikochemische Eigenschaften aufweist, wie zum Beispiel auch die Wanderung im elektrischen Feld. Werden die beiden Stränge jedoch voneinander getrennt, so können die Einzelstränge verschiedene Sekundärstrukturen (Konformationen) auf Grund intramolekularer Basenpaarungen annehmen. Unter den Versuchsbedingungen sind die möglichen Konformationen unterschiedlich stabil. Je stabiler die Konformation desto mehr PCR-Fragmente nehmen sie an und desto stärker ist ihre Bande im Gel. Wenn beide Stränge identisch sind, zeigen sich im PAGE-Nachweis gleiche Banden. Eine einzige Punktmutation jedoch kann die räumliche Struktur des DNA-Stranges massiv verändern und somit auch die Stabilität der möglichen Konformationen. Instabile Konformationen verändern das Bandenmuster in der Elektrophorese. Falls also der SSCP-Amplimer vom Bandenmuster des Wildtyps nach der Färbung stark abwich, wurde davon ausgegangen, dass eine Mutation in der DNA vorlag. Zunächst mussten die PCR-Produkte vorbereitet werden.

7 µl SSCP-Puffer und 2,5 µl PCR-Produkt wurden in einem Reaktionsgefäß gemischt und anschließend bei 94°C für 10 Minuten im Thermoblock denaturiert. Danach wurden die Proben für 5 min bei 4 °C zentrifugiert und auf Eis gekühlt, damit die DNA einzelsträngig blieb. Die Proben wurden dann direkt auf die Elektrophorese aufgetragen. Die Elektrophorese wurde nun auf einem 8% oder 10%/ 6% PAA-Gel bei 150 - 200 V, 10°C für 12-16 h gestartet. Die Bedingungen waren abhängig von der Größe des PCR-Produkts, der Gelstärke und der Gelgröße.

Exon	Fragmentgröße [bp]	Trenngel / Sammelgel	Spannung	Temperatur	Zeit
XLRS1	220	10% / 6%	150 V	10°C	12 h
XLRS2	320	8%	200 V	10°C	12 h
XLRS3	190	10% / 6%	150 V	10°C	12 h
XLRS4	320	10% / 6%	160 V	10°C	16 h
XLRS5	250	10% / 6%	200 V	10°C	16 h
XLRS6	414	8%	160 V	10°C	16 h

Tabelle 13: Elektrophoreseparameter

## 2.9. Silberfärbung von Polyacrylamidgelen nach Budowle<sup>6</sup>

Fixierer:	10% (w/v)	Ethanol	
Oxidierer:	1% (w/v)	HNO <sub>3</sub> (Salpetersäure)	(35 ml 65% / l)
Silberlösung:	0,012 M	AgNO <sub>3</sub> (Silbernitrat)	(2.02 g / l)
Entwickler:	0,28 M	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	(217 g / l)
	0,5%	Paraformaldehyd	

Dieses Verfahren wird zum Nachweis von aufgetrennten Proteinen und Nukleinsäuren auf Polyacrylamidgelen verwendet und stellt eine sehr sensitive Methode dar, bei der auch einzelsträngige DNA, wie sie in der SSCP vorliegt, nachgewiesen wird.

Bei der Silberfärbung nach Budowle et al. wurden alle Schritte unter Schütteln bei Raumtemperatur durchgeführt. Es wurde darauf geachtet, dass die Gele in den Reaktionslösungen immer frei schwimmen konnten.

Nachdem die Gele vorsichtig von den Glasplatten abgenommen wurden, wurden sie für 10 Minuten in 10% Ethanol fixiert. Zum Oxidieren nahm man die Gele aus dem Ethanol und legte sie für 3 Minuten in 1%ige Salpetersäure. Nach kurzem Waschen in dH<sub>2</sub>O wurden die Gele 20 Minuten in einer Silbernitratlösung gebadet.

Anschließend wurden sie kürzer als 1 Minute in dH<sub>2</sub>O gewaschen. Zum Abreagieren des überschüssigen Silbers kamen die Gele kurz in ein erstes Entwicklerbad (NaCO<sub>3</sub> und Paraformaldehyd). Zur Färbung wurden sie so lange im frischen Entwickler inkubiert, bis eine ausreichende Kontrastierung vorhanden war. Das Färben wurde dann mit einer 5%-Essigsäure 15 Minuten lang gestoppt. Im Anschluss wurden die Gele nochmals in dH<sub>2</sub>O für mindestens 1h gewaschen und konnten dann auf einem Cellulose-Papier im Vakuumgerät getrocknet und gepresst werden.

## **2.10. Die Aufreinigung eines PCR-Produkts für die Sequenzierung**

Mit Hilfe der Sequenzierung kann man die Abfolge der Nukleotidsequenz ermitteln und damit direkt die Erbinformation lesen. Dadurch können kleinste Veränderungen, wie z. B. ein ausgetauschtes Nukleotid erkannt werden.

Alle PCR-Produkte, die bei der SSCP-Analyse ein auffälliges Muster zeigten, wurden einer Sequenzierung unterzogen. Zuerst musste ein doppelter PCR-Ansatz (50 µl) der zu untersuchenden DNA unter oben beschriebenen Bedingungen hergestellt und auf ein Agarosegel aufgetragen werden. Anschließend stach man unter dem UV-Illuminator die DNA-Bande mit einem Skalpell exakt aus dem Gel aus und überführte dies in ein Reaktionsgefäß. Für die Isolierung der DNA wurde entweder das *Just Spin Gel Extraction Kit* von *Genaxxon BioScience* oder das *NucleoSpin Extract II Kit* von *Machery-Nagel* angewandt und nach Herstellerangaben schrittweise vorgegangen. Nach der Isolierung wurde das Volumen des Eluats gemessen und einer Ethanol-fällung (siehe 2.3.5.) unterzogen und anschließend die Konzentration mit dem Photometer gemessen (siehe 2.4.).

Die DNA-Sequenzierungsreaktionen wurden bei *Seqlab* (Göttingen) nach der Didesoxymethode nach Sanger (Kettenabbruch-Methode) durchgeführt<sup>54,55</sup>. Das Chromatogramm, welches man nach der Sequenzierung zugeschickt bekam, gab direkt die Sequenz der Basen des sequenzierten DNA-Stranges wieder.

## 2.11. Der Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die doppelsträngige DNA-Moleküle an definierten Stellen hydrolysieren können. Sie kommen ursprünglich in Bakterien vor und haben die Aufgabe den Mikroorganismus vor fremder DNA zu schützen, indem sie diese zerschneiden. In der Molekularbiologie sind sie mittlerweile ein unersetzliches Werkzeug geworden. Es gibt zwei verschiedene *DNAsen* und zwar Endonukleasen und Exonukleasen. Erstere schneiden nach bestimmten Nukleotidabfolgen mitten im DNA-Strang und letztere am Ende eines DNA-Strangs. Bei Restriktionsenzymen handelt es sich um Endonuklasen, die innerhalb der DNA eine bestimmte Basensequenz erkennen und dort die DNA hydrolysieren. Endonukleasen des Typs II schneiden die DNA sehr spezifisch, so dass Fragmente mit genau definierten Schnittstellen entstehen. Nach dem Einsatz von Endonukleasen erhält man ein Gemisch aus unterschiedlich langen DNA-Fragmenten. Bei den hier verwendeten Enzymen konnte vorher bestimmt werden, welche DNA-Fragmente auftreten würden. Diese DNA-Fragmente konnten anschließend mit der Agarosegelelektrophorese verifiziert werden.

Zu 1 µl Enzym [10 U] wurde 1 µl Inkubationspuffer gegeben, bei dem die Endonuklease ihre optimale Aktivität zeigte. Eine Unit [U] ist als die Menge des Enzyms definiert, bei der unter optimalen Bedingungen 1 µg standardisierte DNA innerhalb einer Stunde hydrolysiert wird. Zusätzlich wurden 5 µl DNA und 3 µl ddH<sub>2</sub>O in ein Reaktionsgefäß pipettiert und für mindestens 1 h in ein dem Enzym entsprechend temperiertes Wasserbad zur Inkubation gestellt.

### Ansatz für einen Restriktionsverdau:

- 1 µl Restriktionsenzym (10 U/ µl)
- 5 µl DNA
- 1 µl Puffer
- 3 µl ddH<sub>2</sub>O

Zwischenzeitlich wurde ein 2% Agarosegel mit *Seakem* und *Low-melt Agarose* (siehe 2.6.) in eine Horizon 58 Kammer gegossen. Nach der Inkubation wurden 10 µl

verdaute DNA mit 4 µl Ladepuffer vermischt und mit einem Marker (100 bp und 20 bp DNA-Ladder) und mindestens zwei Kontroll-DNA`s auf das Gel aufgetragen.

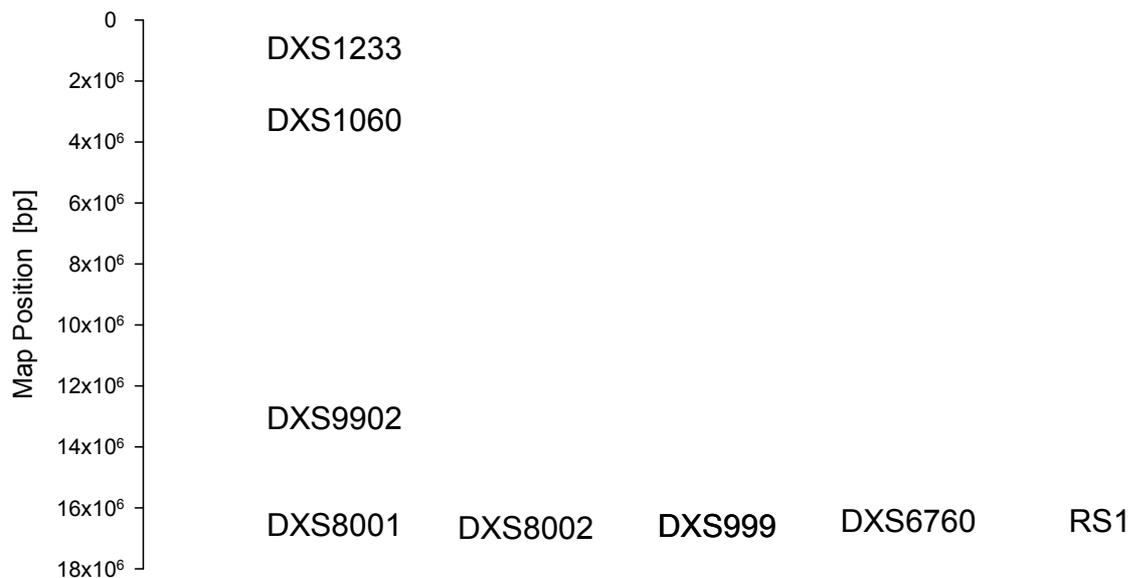
## **2.12. Untersuchungen zur Verteilung flankierender Short-Sequenz-Repeat-Marker**

Zur Überprüfung von Verwandtschaftsverhältnissen wurden die Indexfälle der Familien 315, 501, 1332 und 1510 einer Haplotypisierung mit fünf flankierenden Short-Sequenz-Repeat- (SSR)-Markern unterzogen. Die ausgewählten Marker lagen auf dem X-Chromosom (siehe Abb.: 4).

Die Daten der eingesetzten Marker sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Die SSR-Marker wurden mittels eines PCR-Standardansatzes (siehe 2.5.) zu 15 µl amplifiziert. Der eingesetzte Temperaturzyklus begann mit einer Denaturierung für 5 min bei 94 °C, an die sich 34 Zyklen mit Annealing bei markerspezifischen Temperaturen (siehe Tab.: 14), einer Elongation bei 72 °C und einer erneuten Denaturierung bei 94 °C für jeweils 1 min anschlossen. Das Programm wurde mit einem Annealing für 1 min und einer Elongation für 10 min abgeschlossen.

Die PCR-Produkte wurden auf einem nicht denaturierenden 6 % Polyacrylamid-Gel (siehe 2.7.) für 1 h bei 120 V in der Multigel Long (Biometra, Göttingen) aufgetrennt und anschließend mit einer Silberfärbung (siehe 2.9.) detektiert.



**Abbildung 4: Positionierung der eingesetzten Markerloci.** Die Markerpositionen sind nach aktuellen HuRef Karte (Built 37.1) angegeben.

Marker	Map Position [bp]	Online-DB	Allele	Heterozygotie	Annealing Temperatur
DXS1233	932272	<sup>1</sup> UniSTS: 26026	o.A.	o.A.	55 °C
DXS1060	3288952	<sup>2</sup> SNP: rs3220318	9	0,83	55 °C
DXS9002	13082459	UniSTS: 73076	o.A.	o.A.	58 °C
DXS6760	16425791	UniSTS: 149826	o.A.	o.A.	53 °C
DXS8001	16553612	SNP: rs479675	o.A.	o.A.	58 °C
DXS999	16588126	SNP: rs3220624	6	0,74	55 °C
DXS8002	16669950	UniSTS: 99458	o.A.	o.A.	58 °C

**Tabelle 14: Daten der eingesetzten Mikrosatelliten.** Die Lage des *RS1*-Gens wird durch den verstärkten Zeilentrennstrich angezeigt. o.A.: ohne Angabe

<sup>1</sup><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=unists>, <sup>2</sup><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp?>

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Individuelle Daten der Patienten mit XLRS, der betroffenen Verwandten und Konduktorinnen**

Seit 1998 wurden DNA-Proben von 43 Personen mit dem Verdacht bzw. der Diagnose einer X-gebundenen Retinoschisis und deren Familienangehörige asserviert. In Tabelle 15 und 16 sind die phänotypischen Daten zusammengestellt. Von den Untersuchten waren 28 männlich, 22 davon waren Mutationsträger, 15 waren weiblich, 9 davon Konduktorinnen, die über einen Mutationsnachweis bestimmt wurden. Bei den anderen sechs Frauen lag der Verdacht auf einen Konduktorinnenstatus nahe, da sie Mütter oder Schwestern betroffener Männer waren, sie blieben aber ohne Mutationsnachweis. Bei drei von ihnen (389.02, 1653.02, 1682.02) konnte auch bei deren zugehörigen männlichen Patienten, die mit der Fragestellung nach einer XLRS vorstellig wurden, keine Mutation nachgewiesen werden. Zwei (798.01, 798.02) trugen einen Polymorphismus und eine, die die Schwester eines betroffenen Mannes war (372.02), konnte bei nachgewiesener Mutation des Bruders als Mutationsträgerin ausgeschlossen werden. Für die Familienplanung dieser Probandin bedeutet dies, dass ihre Kinder kein Risiko für die Erkrankung haben. Die 43 Personen setzten sich aus 16 Familien mit mindestens zwei betroffenen Familienmitgliedern und sechs Einzelpatienten zusammen. Die Einzelpatienten waren ausschließlich männlich. Insgesamt stammten 27 der XLRS-Patienten aus Bayern. Acht Patienten kamen aus der Nähe von Straubing und 13 waren in der Chamer Gegend wohnhaft. Die Patienten, die eine Mutation zeigten, sind in Tabelle 15 zusammengefasst, diejenigen, bei denen keine Mutation festgestellt wurde, in Tabelle 16.

Tabelle zu individuellen Daten der Mutationsträger

Patient	Alter <sup>a</sup>	Geschlecht	Mutationen	Fundus	Visus	ERG	Refraktion	Sonstige Befunde
126.01	24	M	p.R141C (c.421C>T)					
315.01	22	M	p.P193L (c.578C>T)	RS, Keine Schisis, PE-Epithel-Defekt	RA: c.c. 0,7 LA: c.c. 0,3	b-Welle: neg.		Seit 5.Lj. Visus-minderung, Myopie. Astigmatismus
315.02	44	C	p.P193L (c.578C>T)					Mutter von 315.01
349.01	5	M	p.R209H (c.626G>A)	RA Papille hochoval, temporal blass, Makula mit PE-Atrophie; LA blass, hochoval, kein MWr, RS, Glaskörpertrübungen, weißliche Stränge entlang der Gefäßbögen	RA: c.c.0,1 LA: c.c. 0,1	b-Welle: neg., RA/LA Stäbchenantwort im Normbereich, Zapfenantwort auf Flickerreiz: RA/LA Amplituden reduziert	RA: +6,0/-2,0/180° LA: +6,5/-1,5/60°	Hochfrequenter Nystagmus im Alter von 6 Monaten, Kopfwangshaltung, Linksdrehung von 25°, Hyperopie, Astigmatismus
349.02	34	C	p.R209H (c.626G>A)	RA/LA Papille vital, randscharf, Makula regelrecht	RA: s.c. 1,25 LA: s.c. 1,0			Mutter von 349.01
349.03	61	M	p.R209H (c.626G>A)					Onkel von 349.02
372.01	17	M	p.R213Q (c.638G>A)	vR, Z um Fovea, Netzhautperiph. mit einzelnen PE-Umschichtungen, Netzhautperiph. liegt an	RA: c.c. 0,4 LA: c.c. 0,25	Stäbchenantw. Latenz und Ampl. normal Max.antw: neg. ERG, verlängerte Latenzen bds., red. Amplituden	RA: +5,5/-2,25/80° LA: +7,5/-2,0/80°	RA: keine zentralen Gesichtsfelddefekte, LA: an den Blinden Fleck angrenzendes, relatives Skotom

372.02	21	V.a .C		Papille randscharf, LA: temporal pigment. Papillenrandsaum	RA: s.c.1,25 LA: s.c. 1,0			Schwester von 372.01
372.05	12	M	p.R141C (c.421C>T)					
390.01	16	M	p.R182C (c.544C>T)	Papille vital, vR, Pigmentepithel um Makula	RA: c.c. 0,3 LA: c.c. 0,3	Neg.		Horizontaler Pendelrücknystagmus nach links, tränende Augen
390.02	34	C	p.R182C (c.544C>T)					Mutter von 390.01
437.01	17	M	p.E72K (c.214G>A)	Papille blass, pigmentiert	RA/LA c.c.0,3	Stäbchen: Amplituden reduziert Zapfen: Norm		Hyperopie, Astigmatismus, konz. Einschränkung des GF, OCT: Z
437.02	45	C	p.E72K (c.214G>A)					Mutter von 437.01
467.01	27	M	p.E72K (c.214G>A)	RA Papille leicht blass, Gefäße verengt, Hyperpigmentierung, A, LA ohne A	RA: c.c. 0,1 LA: c.c. 0,1	Leicht neg.ERG, deutlich erniedrigte skotopische u. photopische Potentiale	RA: +4,0/- 1,25/123° LA: -3,5/- 2,25/120°	LA: Z.n. Ablatio Op im 10. Lj., RA: Z.n. Laserkoagulation, Einschränkung im nasal oberen GF
467.02	20	M	p.E72K (c.214G>A)	Schisis auch i.d. Peripherie, präretinale Blutung, kein Foramen sichtbar, MZ, vR, Glaskörperverdickung, Exsudation, Depigmentierung	RA: s.c. 0,1 LA: s.c. 0,04 C.C. beidseits Visus 0,1	b-Welle erniedrigt, oszillatorische Potentiale verringert, skotopische Potenziale normal, Zapfenantwort u. zentrale Antworten leicht verringert	RA: +4,5/- 3,25/77° LA: +5,75/- 2,5/84°;	Astigmatismus, LA Glaskörperblutung, Hyperopie, GF regelrecht
480.01	11	M	p.E72K (c.214G>A)	Papille randscharf, RS, vR	RA: s.c. 0,2 LA: s.c. 0,2	b/a Quotient 1,4, nur angedeutet neg. Konfiguration	RA: +0,5/- 0,75/126° LA: +2,0/-1,5/91°	Hyperopie, Astigmatismus, OCT: SNh
480.02	36	C	p.E72K (c.214G>A)					Mutter von 480.01 und 480.03
480.03	3	M	p.E72K (c.214G>A)	Papille randscharf, Netzhaut anliegend	RA: s.c. 0,63 LA: s.c.			Hyperopie

					0,63			
496.01	7	M	p.F108C (c.323T>G)	Papille randscharf, MWr, RS, zentrale Schisis	RA: s.c. 0,2 LA: s.c. 0,2	Stäbchen: RA normal, LA Amplitude erniedrigt; Maximalantwort: neg. Zapfen: b-Welle reduziert	RA: 30%, LA: 20%; RA: +3,0/+1,0/128° LA: +4,5/+1,0/128°	Bruder von 496.02
496.02	11	M	p.F108C (c.323T>G)	Papille randscharf, MWr, nur angedeutete Schisis der Fovea	RA: s.c. 0,3 LA: s.c. 0,2	Stäbchen: normal, Maximalantwort: neg. Zapfen: normal	RA: 30%, LA: 20%	Bruder von 496.01
496.03	35	C	p.F108C (c.323T>G)					Mutter von 496.02 u. 496.01
501.01	37	M	p.P193L (c.578C>T)	MZ RS vR	RA: s.c. 0,1 LA: s.c. 0,2	b-Welle: neg.	RA: 30%, LA: 40%; RA: -1,0/-0,25/66° LA: -0,75/-0,5/178°	Bei Angiografie: Z erkennbar, OCT: SNh
584.01	16	M	c.636deIC	Papille vital, Radiäre Zeichnung der Makula, vR	RA: s.c. 0,5 LA: s.c. 0,2	Skotopisch: RA/LA Stäbchenantwort vermindert; Photopisch: RA/LA Amplitude vermindert	c.c. RA: -1,0/-0,5/30° LA: plan/-0,5/170°	GF leichte Schwellenerhöhung, Hyperopie, Astigmatismus, OCT: SNh
630.01	30	M	p.R102Q (c.305G>A)	RA: Sehnerv mit Konus, vaskuläre Zone der Makula fehlend, große Schisis, Glaskörper unregelmäßig; LA: unterer Bereich A und Schisislöcher, Z; Zentrale Netzhautläsion	RA: s.c. 0,029 LA: s.c. 0,7	Maximalantwort: neg. b/a Quotient: 1,36 Skotopische u. photopische Antworten leicht erniedrigt		Z.n. parazentraler Laserkoagulation, Z.n. Plombenoperation nach Schisisablatio, Z.n. Schiel-Operation, GF-einschränkung
1152.01	10	M	p.R209L (c.626G>T)	RA/LA: Papille vital, randscharf, Makula mit PE-Verschiebungen, MZ, kein MWr, Netzhaut anliegend, peripher heller Fundus, RA: radiärer Cellophanreflex der Makula	RA: s.c. 0,4 LA: s.c. 0,4		RA: +1,0/-2,0/97° LA: +1,0/-2,0/85°	OCT: RA/LA: zystische Makulaveränderung
1152.02	31	C	p.R209L					Mutter von 1152.01

			(c.626G>T)					
1510.01	19	M	p.P193L (c.578C>T)	RA: Pigmentinhomogenität, kein MWr, Glaskörperabhebung, peripher inferior chorioretinale Athrophie, Schisis, pS, Z LA: keine Einsicht	RA: c.c. 0,6	Amplituden beidseits reduziert, Potenziale LA niedriger als RA, oszillatorische Pot.: Latenz verzögert	RA: -1,0/- 2,25/155° LA: -3,0/- 0,25/115°	RA: Z.n. Ablatioop mit Plombenaufnähhung u. Kryokoagulation, Cataracta matura; LA: Ablatioop mit Silikonöltamponade bei Glaskörperblutung; obere GF- einschränkung, OCT: Z
1510.02	45	C	p.P193L (c.578C>T)					Mutter von 1510.01
1332.01	4	M	p.P193L (c.578C>T)	pS RS, kein MWr	RA: s.c. 1,0 LA: s.c. 0,63	b-Welle reduziert	RA: +1,0/- 1,25/3° LA: +0,75/- 0,75/165°	Astigmatismus, Z.n. Glaskörperblutung im LA; bei Angiografie. Retinoschisis erkennbar, OCT: massive Z im Bereich der Makula, SNh
1854.01	7	M	p.P192T (c.574C>A)	Papille vital, randscharf, RS, Kein MWr, Netzhaut anliegend	RA: s.c. 0,5 LA: s.c. 0,4	b-Welle reduziert	RA: +2,0/- 0,25/90° LA: +2,0/-0,5/60°	OCT: SNh
1854.02	47	C						
1854.03	45	M						

**Tabelle 15: Individuelle Daten der Patienten bzw. betroffenen Verwandten, die eine Mutation aufweisen:**

M: männlich und betroffen, C: Konduktorin, A: Ablatio, MWR: Makulawallreflex, MZ: Makula mit zystischen Veränderungen, RS: Radspeichenstruktur, vR: veränderte Reflexe, pS: periphere Schisis, Z: Zysten, SNh: Spaltung der Netzhaut, neg.: negativ, LA: linkes Auge, RA: rechtes Auge, Poly: Polymorphismus, norm: Normbereich, Z.n.: Zustand nach, o.B.: ohne Befund, c.c.: cum correctionem, s.c.: sine correctionem GF: Gesichtsfeld

<sup>a</sup>Das Alter bezieht sich auf das Alter zum Zeitpunkt der Untersuchung

**Tabelle zu Daten der Patienten ohne Mutation**

Patienten	Alter <sup>a</sup>	Geschlecht	Diagnose	Fundus / OCT	Visus	Sonstige Befunde
389.01	11	M		RA: Papille randscharf, bläss, radiäre Struktur der Makula, IPL: multiple Schisis auch über Makula hinaus; kein MWr, RS LA: IPL: multiple Schisis über Papille u. Makula	RA: c.c.1,6 LA: c.c. 0,86	ERG: Reine Stäbchenantwort nicht ableitbar, Maximalantwort stark erniedrigt, b-Welle neg., Photopisch: Amplituden erniedrigt, Latenz verlängert
389.03	3	M		RA/LA: Papille vital und randscharf, kein MWr, MZ,vR, große makuläre Schisis in der IPL mit multiplen kleineren Kavitäten über die Makula hinaus, Netzhaut anliegend, heller Fundus, RS	RA: s.c.0,4, LA: s.c.0,5	ERG: phot. Amplituden auf ca. 40% red., neg. ERG
1653.01	6	M		LA/RA: OCT schlecht auszuwerten, multiple Schisis in IPL über Makula hinaus, RA: zentral große makuläre Abhebung		
1657.01	41	M	Retinoschisis mit Degeneration	RA/LA: OCT schlecht auszuwerten (Nystagmus)		
1682.01	22	M	Retinoschisis mit Degeneration	OCT RA/LA: Mehrere große Kavitäten in der IPL in der Makula		
798.01	9	V.a. C Polymorphismus p.L127L (c.384G>A)	Retinoschisis mit Degeneration	Makula, Peripherie o.B. OCT o.B.	RA: c.c. 0,8 LA: c.c. 0,8	
1097.01	38	M Polymorphismus p.L127L (c.384G>A)		LA/RA: OCT Abhebung auf RPE/ROS-Ebene foveal		

**Tabelle 16: Daten der Patienten, bei denen keine Mutation nachgewiesen wurde incl. der Polymorphismuspatienten**

m: männlich und nicht betroffen, V.a.: Verdacht auf, IPL: innere plexiforme Schicht

<sup>a</sup>Das Alter bezieht sich auf das Alter zum Zeitpunkt der Untersuchung

### **3.2. Ergebnisse im RS1-Gen**

Bei 11 Familien konnte molekulargenetisch eine Mutation festgestellt werden. Zusammen mit den Einzelpatienten hatten 17 Indexfälle eine Mutation im *RS1*-Gen. Die Mutationen im *RS1*-Gen, die bei den Patienten dieser Studie gefunden wurden, sind in Tabelle 17 dargestellt. Bereits publizierte Mutationen findet man unter <http://grenada.lumc.nl/LOVD2/eye/home.php>

Aminosäure- änderung	Nukleotid- änderung	Exon	Restriktions- enzym	PolyPhen <sup>a</sup>	SIFT <sup>b</sup>	Patienten	Referenz
p.E72K	c.214G>A	4	- TaqI	1,732 psd	tolerated	7	1,26,44,17,27,59,70,28,56
p.R102Q	c.305G>A	4	+ AluI	1,802 psd	not tolerated	1	1,26,27
p.F108C	c.323T>G	4		2,189 pbd	tolerated	3	21
p.R141C	c.421C>T	5	- HaeIII	2,320 pbd	tolerated	2	1,21,26
p.R182C	c.544C>T	6	+ BspI	2,572 pbd	tolerated	2	1,26,44
p.P192T	c.574C>A	6		2,183 pbd	tolerated	1	75
p.P193L	c.578C>T	6	+ AvalI	2,956 pbd	not tolerated	6	1,26,57 21,27
p.R209H	c.626G>A	6		1,947 psd	tolerated	3	1,57
p.R209L	c.626G>T	6		2,338 pbd	tolerated	2	69
p.R213Q	c.638G>A	6		1,892 psd	not tolerated	1	27
p.R213fsX24	c.636delC	6			Leseraster	1	diese Studie

**Tabelle 17: In dieser Arbeit identifizierte Mutationen und deren Bewertung bezüglich ihres pathogenen Potenzials**

(<sup>a</sup><http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/index.html>, SIFT: Sorting Intolerant From Tolerant: <sup>b</sup><http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>), psd: möglicherweise deformierend, pbd: wahrscheinlich deformierend

### **3.2.1. Deletionen**

Die einzige Deletionsmutation dieser Studie wurde hier erstmalig identifiziert und zwar bei Patient 584.01 im Exon 6. An Position 636 war die Base Cytosin deletiert. Die Sequenzveränderung ist eine bislang nicht beschriebene pathologische Mutation. Diese führt zu einer Verschiebung des Leserasters und einem Verlust von 12 C-terminalen Aminosäurepositionen, die durch 22 neue Aminosäuren ersetzt werden, wodurch die Eigenschaften des C-Terminus vollständig verändert werden. Der Patient hatte eine sehr starke Hyperopie, zeigte einen Astigmatismus und hatte einen reduzierten Visus. Zusätzlich konnte eine radiäre Zeichnung der Makula mit veränderten Reflexen festgestellt werden. Bei OCT Untersuchungen wurden größere Spaltungen der Netzhaut festgestellt. Die Mutation wurde durch eine auffällige SSCP und Sequenzierung identifiziert und bestätigt.

### **3.2.2. Punktmutationen**

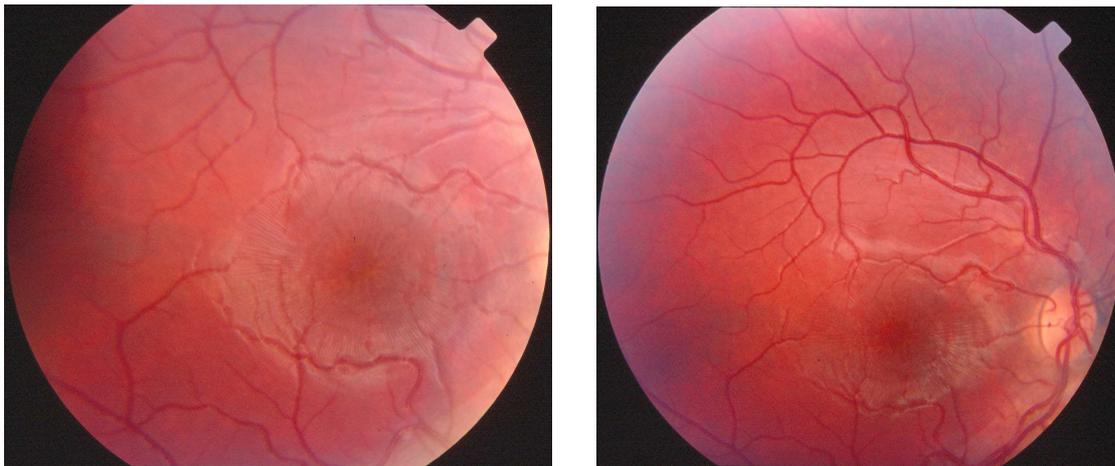
In dieser Studie wurden 10 Punktmutationen im *RS1*-Gen gefunden. Dabei wird eine Base der DNA gegen eine andere ausgetauscht (Substitution), was zu einem veränderten Protein führen kann.

#### **3.2.2.1. Nonsense-Mutation**

Bei einer Nonsense-Mutation wird durch die Punktmutation die Codierung für eine Aminosäure in ein Stoppcodon umcodiert. Bei den untersuchten Patienten dieser Studie wurden keine Nonsense-Mutationen festgestellt.

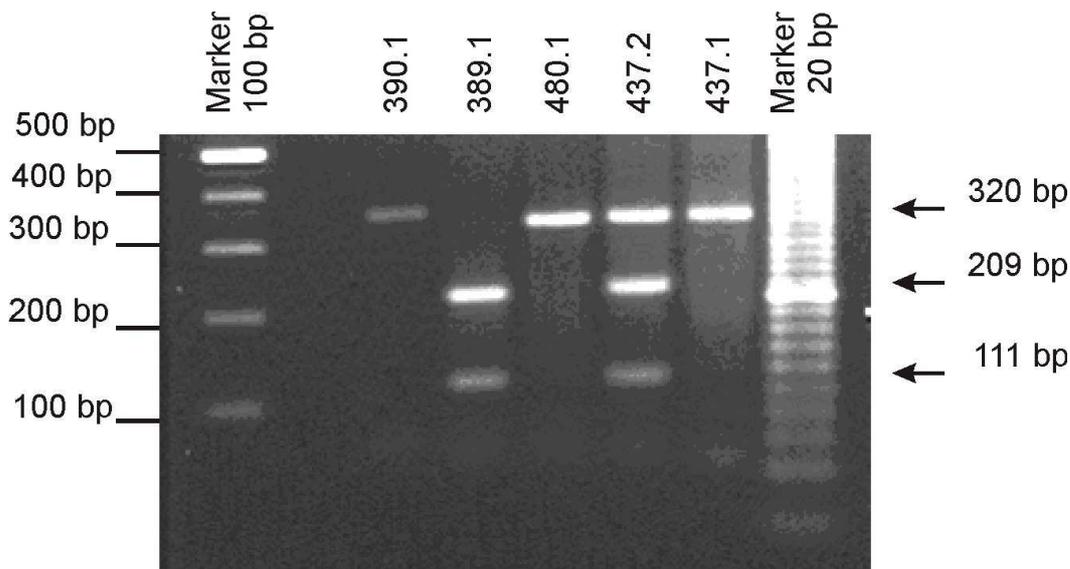
### 3.2.2.2. Missense-Mutation

Eine Missense-Mutation (sinnverändernde Mutation) kodiert das betroffene Codon in eine andere Aminosäure um, wodurch lokale Veränderungen der Primärsequenz entstehen, die zum Funktionsverlust des Proteins führen können. Die bereits vom Retinoschisis Consortium<sup>1</sup> beschriebene Mutation p.E72K in Exon 4 von *RS1* tauscht an der Nukleotidstelle 214 Guanin gegen Adenin (c.214G>A) aus und verändert somit die Kodierung der Aminosäure Glutamin an Position 72 zur Aminosäure Lysin. Diese Mutation zeigten mehrere Probanden dieser Studie (437.01, 437.02, 467.01, 467.02, 480.01, 480.02, 480.03). 437.02 ist Konduktorin der Mutation und hat die Krankheit auf ihren Sohn 437.01 übertragen, der die typischen Befunde einer Retinoschisis wie Zysten und Ablatio der Netzhaut, zeigte. Die Konduktorin zeigte keine wegweisenden Auffälligkeiten an der Netzhaut. (siehe Abb.: 5)



**Abbildung 5: Fundusphotografien von Patient 437.01:** auffällig ist eine blasse, nur leicht pigmentierte Papille und eine Radspeichenstruktur rings um die Fovea (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. B. Lorenz)

Nach der auffälligen SSCP wurden Proben einer Sequenzierung unterzogen, die diese Mutation bestätigten. Auch ein Restriktionsverdau des Exon 4-Amplimers mit dem Enzym TaqI bestätigte das Ergebnis (siehe Abb.: 6).

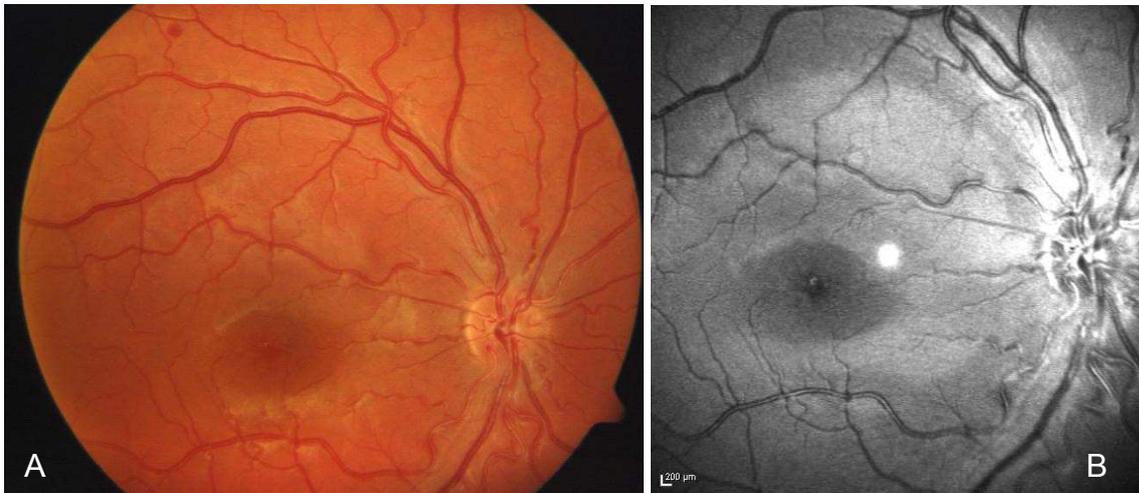


**Abbildung 6: Restriktionsverdau mit TaqI im Exon 4:** Links und rechts des 2%igen-Agarosegels sind zwei verschiedene Marker aufgetragen (100bp Ladder und 20bp Ladder); 390.1 stellt eine Kontroll-DNA dar (Patient hat eine Mutation im Exon 6 und nicht im Exon 4, es sind keine weiteren Banden zu erwarten). Bei 480.1 und 437.1 können keine weiteren Banden festgestellt werden. Bei 437.2 sind drei unterschiedliche Banden zu erkennen, was eine Mutation im Exon 4 beweist.

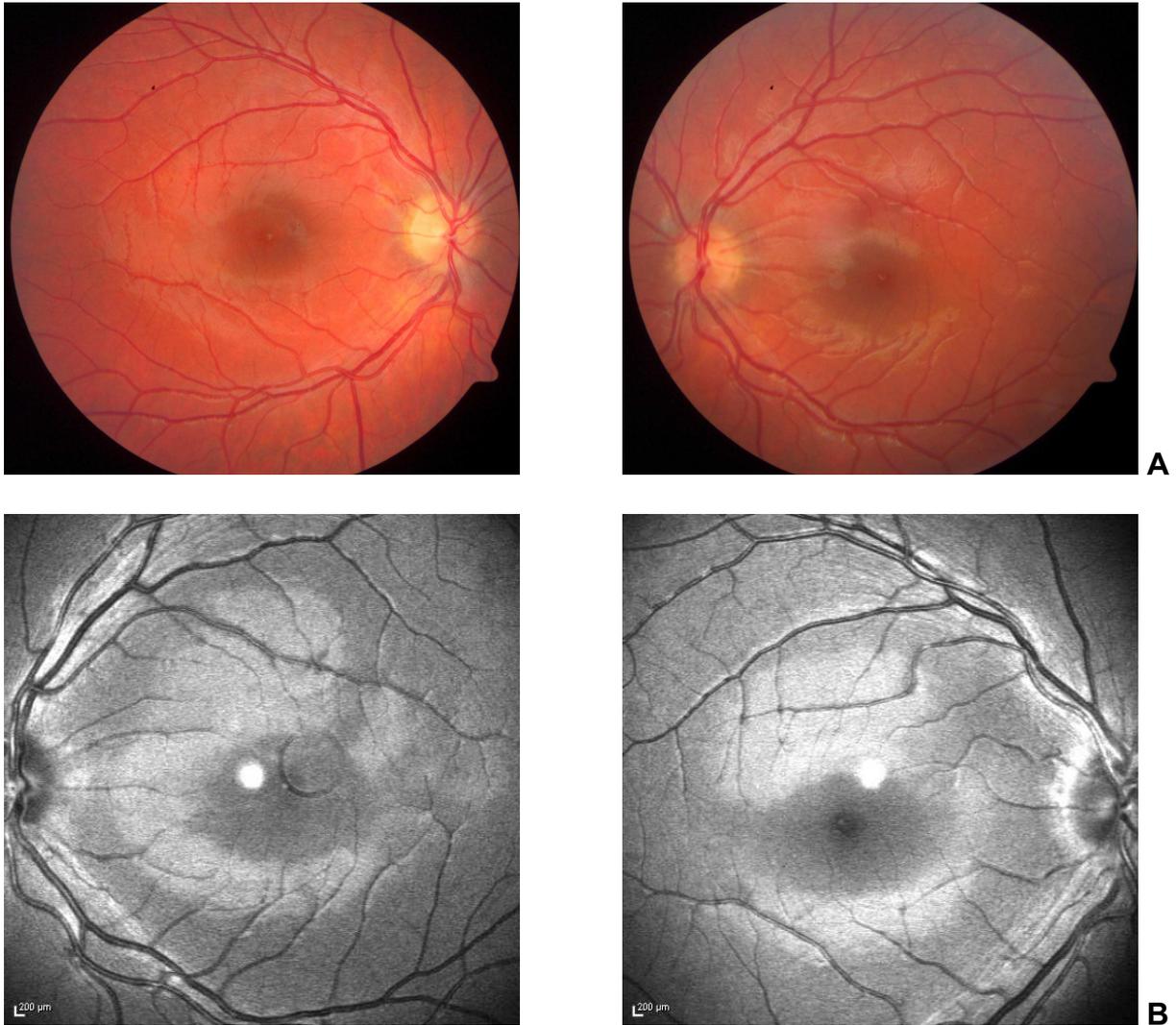
Die Brüder 467.01 und 467.02 zeigten ein sehr ausgeprägtes Krankheitsbild einer Retinoschisis mit retinalen Blutungen, Ablatio, großen Zysten in der Netzhaut und eine deutlich erniedrigte b-Welle im ERG (siehe auch Tab.: 15). Bei 467.01 bestanden ausgedehnte degenerative Veränderungen der Netzhaut. An beiden Augen wurden eine Cerclage und eine Laserkoagulation durchgeführt. Dabei ist es zu einer generellen Verringerung der Amplituden im ERG gekommen. Die Brüder 480.01 und 480.03 trugen beide die Mutation p.E72K (c.214G>A). Bei 480.01 war der Phänotyp einer Retinoschisis viel deutlicher zu erkennen als bei 480.03. 480.03 zeigte zum Zeitpunkt der Untersuchung einen orthoptischen Normalbefund. Es wurden jedoch keine speziellen Untersuchungen wie z.B. ein ERG durchgeführt, da der dreijährige Patient dafür noch nicht kooperativ war. In der SSCP konnte man bei Proband 480.01 im Exon 4 eine deutliche Bandenabweichung erkennen. Die Mutation konnte bei beiden durch Sequenzierung bestätigt werden.

496.01 und 496.02 sind Brüder und litten an einer zentralen Retinoschisis. Beide hatten sehr ähnliche phänotypische Befunde wie eine konstante Sehminderung,

Fundusveränderungen mit einer zentralen Schisis und Radspeichenstruktur und ein negatives ERG. (siehe Abb.: 7 und 8)



**Abbildung 7: Fundusphotografie des rechten Auges (A) und korrespondierende rotfreie Aufnahme (B) von Patient 496.01:** Es zeigt sich eine zentrale Schisis mit einer Radspeichen- bzw. Sternfigur um die Fovea, die in der rotfreien Aufnahme noch einmal verstärkt herauskommen. (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. B. Lorenz)



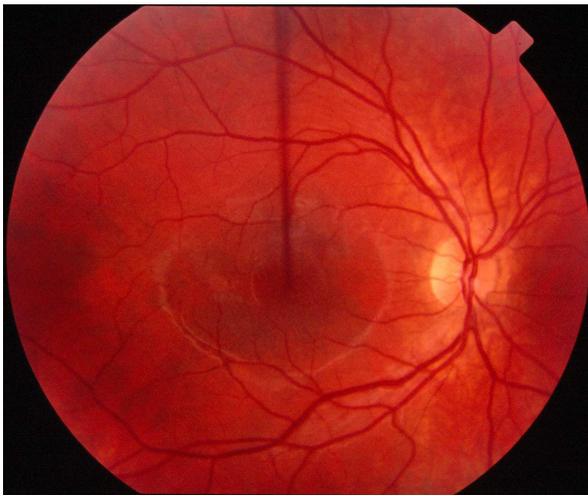
**Abbildung 8: Fundusphotografien (A) und rotfreie Aufnahmen (B) von Patient 496.02:** im Vergleich zu 496.01 ist die Schisis leichter ausgeprägt. (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. B. Lorenz)

Die Mutation p.F108C (c.323T>G), die die Brüder aufweisen, vertauscht an der Nukleotidstelle 323 Thymin gegen Guanin (c.323T>G) und verändert die Kodierung der Aminosäure Phenylalanin an der Position 108 zu Cystein.

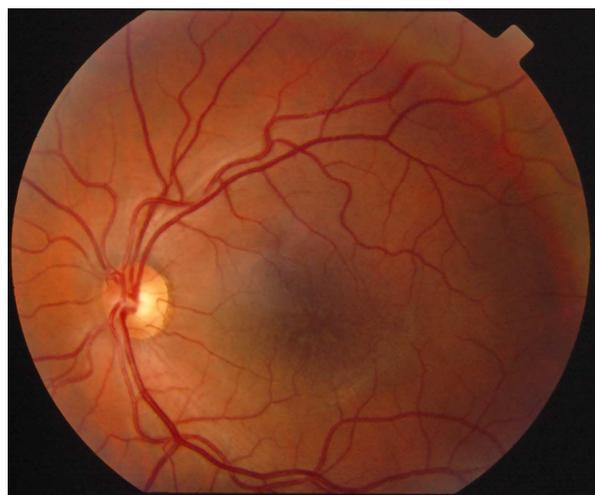
Bei Patient 630.01 fand sich in Exon 4 an der Nukleotidstelle 305 eine Mutation, an der Guanin zu Adenin vertauscht wurde und somit Glutamin an die Stelle von Arginin an Position 102 trat. Diese Mutation wurde schon von mehreren Autoren beschrieben<sup>1,26,27</sup>.

Die einzige Mutation, die im Exon 5 festgestellt wurde, war p.R141C (c.421C>T). Von den beiden Patienten, die diese Mutation trugen, lagen leider keine detaillierten augenärztlichen Untersuchungsergebnisse vor.

Die meisten (63,6%) Mutationen dieser Studie wurden im Exon 6 verifiziert. Die häufig<sup>1,26,27,57,21</sup> beschriebene Mutation p.P193L (c.578C>T), bei der statt Prolin Leucin exprimiert wird, hatten in dieser Untersuchung sechs Patienten (315.01, 315.02, 501.01, 1510.01, 1510.02, 1332.01). Bei Patienten mit dieser Mutation waren die phänotypischen Erscheinungen der Retinoschisis sehr ausgeprägt. Alle Männer zeigten große Zysten mit starker Retinoschisis und hatten keinen Makulawallreflex. (siehe Abb.: 9,10,11,12) Zum Vergleich der übrigen Patienten siehe Tabelle 15.



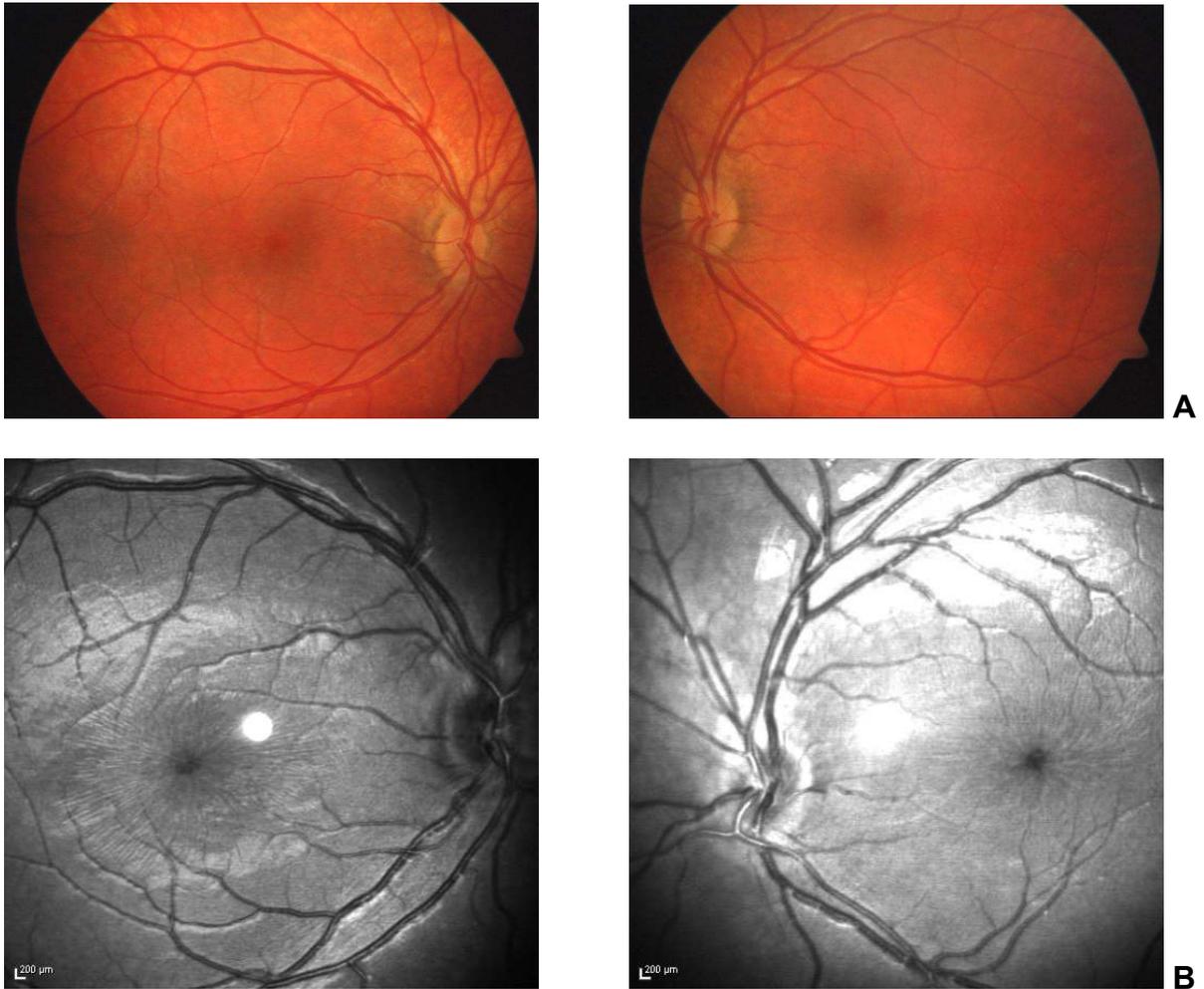
**Abbildung 9: Fundusphotografie von Patient 315.01:** typisch ist hier die Radspeichenstruktur direkt um die Fovea und ein Pigmentepitheldefekt der Makula (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. B. Lorenz)



**Abbildung 10: Fundusphotografien von Patient 501.01:** tyischerweise ist die deutliche Radspeichenstruktur erkennbar und mikrozystische Läsionen in der Fovea. (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. B. Lorenz)

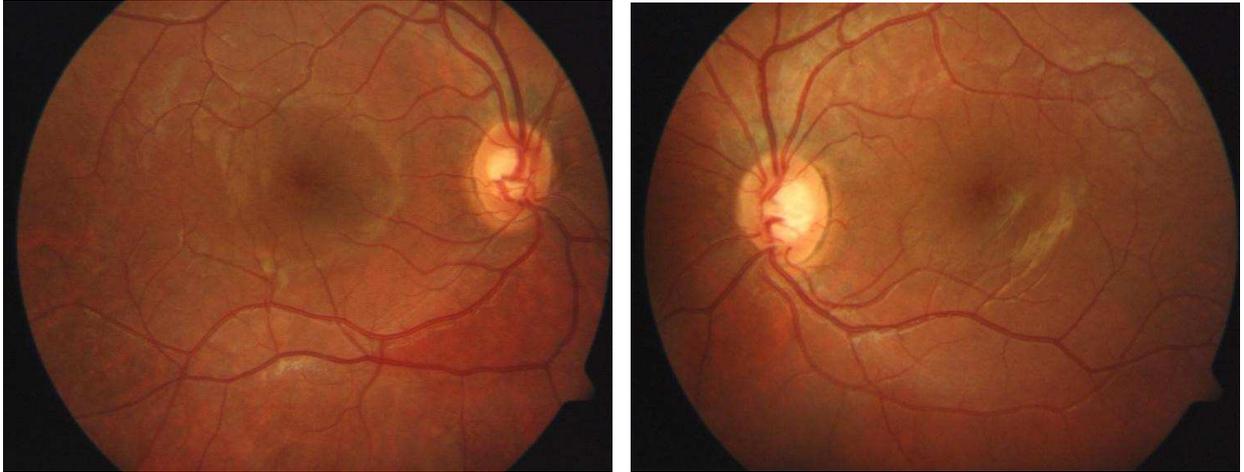


**Abbildung 11: Fundusphotografien von Patient 1510.01:** bullöse periphere Schisis vor allem im unteren temporalen Quadranten mit deutlicher Pigmentinhomogenität und großen, zystischen Veränderungen. (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. B. Lorenz)



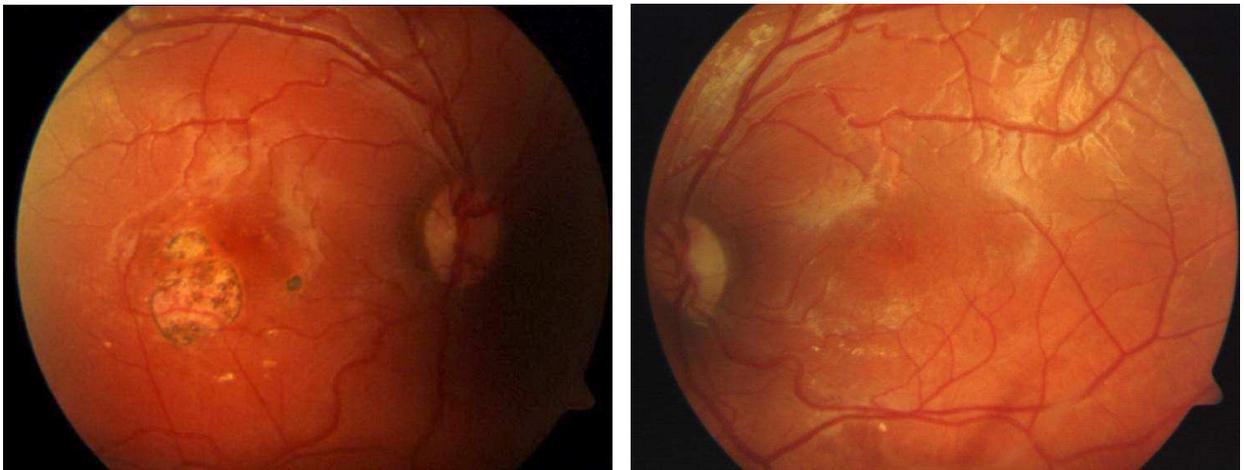
**Abbildung 12: Fundusphotografien (A) und rotfreie Aufnahmen (B) von Patient 1332.01:** typisch ist hier eine zentrale Schisis mit Radspeichenstruktur, die besonders in der rotfreien Aufnahme deutlich wird. (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. B. Lorenz)

Bei einer Familie wurde die Mutation p.P192T (c.574C>T) diagnostiziert. An Position 192 tritt an die Nukleotidstelle 574 Adenin statt Cytosin. Bei dem siebenjährigen Patienten (1854.01) wurde bei der Einschulung aufgrund seines schlechten Visus und Fundusauffälligkeiten wie Radspeichenstruktur und fehlendem Makulawallreflex der Verdacht einer XLRS gestellt und durch den Mutationsnachweis bestätigt. (siehe Abb.: 13)



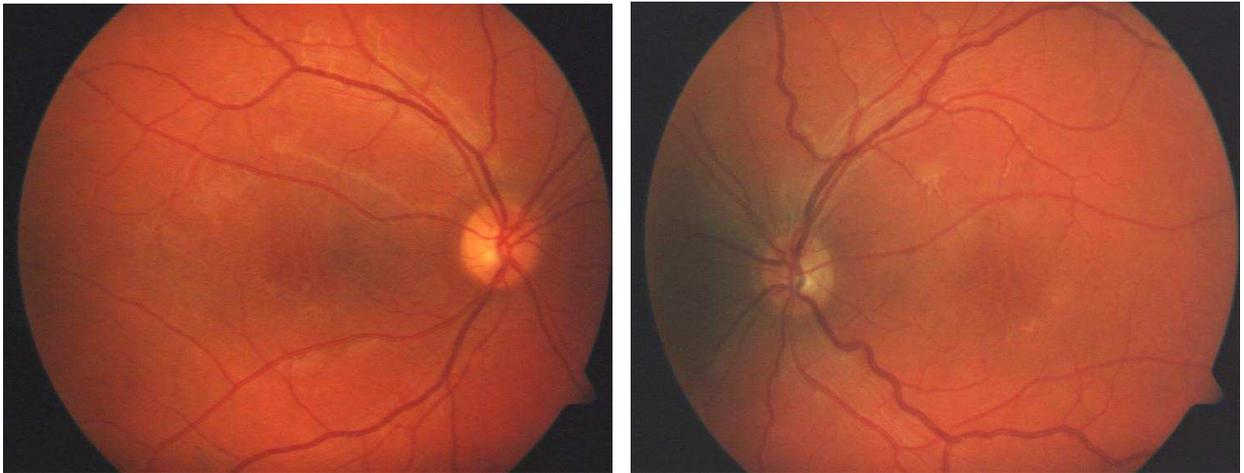
**Abbildung 13: Fundusphotografien von Patient 1854.01:** es zeigen sich eine Radspeichenstruktur perifoveal und weißliche Läsionen bzw. Pigmentinhomogenitäten vor allem im rechten Auge. (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. B. Lorenz)

Eine weitere Familie (349.01, 349.02, 349.03) wies die Mutation p.R209H (c.626G>A) auf. Patient 349.01 wurde schon mit sechs Monaten auffällig, da er einen hochfrequenten Nystagmus zeigte und eine Kopfzwangshaltung bei starker Hyperopie. Die SSCP-Untersuchung war bei 349.01 und 349.03 auffällig. Diese Genmutation wurde ebenfalls schon beschrieben<sup>57,1</sup>. (siehe Abb.: 14)

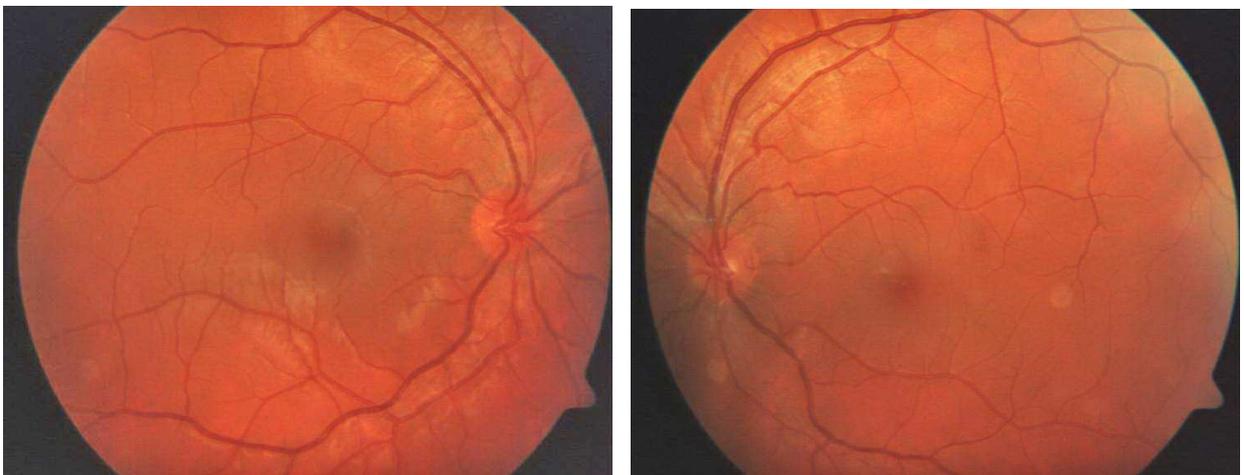


**Abbildung 14: Fundusphotografien von Patient 349.01:** auffällig sind die Radspeichenstruktur im linken Auge und eine starke Atrophie des Pigmentepithels in der Makula des rechten Auges. (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. B. Lorenz)

Eine von Hotta et al.<sup>27</sup> beschriebene Mutation ist p.R213Q (c.638G>A). Diese wurde bei einem Patienten identifiziert (372.01), bei dem Glutamin an die Stelle von Arginin tritt. Dieser hatte die Mutation neu erworben, da seine Mutter (372.04) weder genotypisch noch phänotypisch als Konduktorin erkannt wurde und auch seine Schwester (372.02) keine Auffälligkeiten zeigte. (siehe Abb.: 15 und 16)



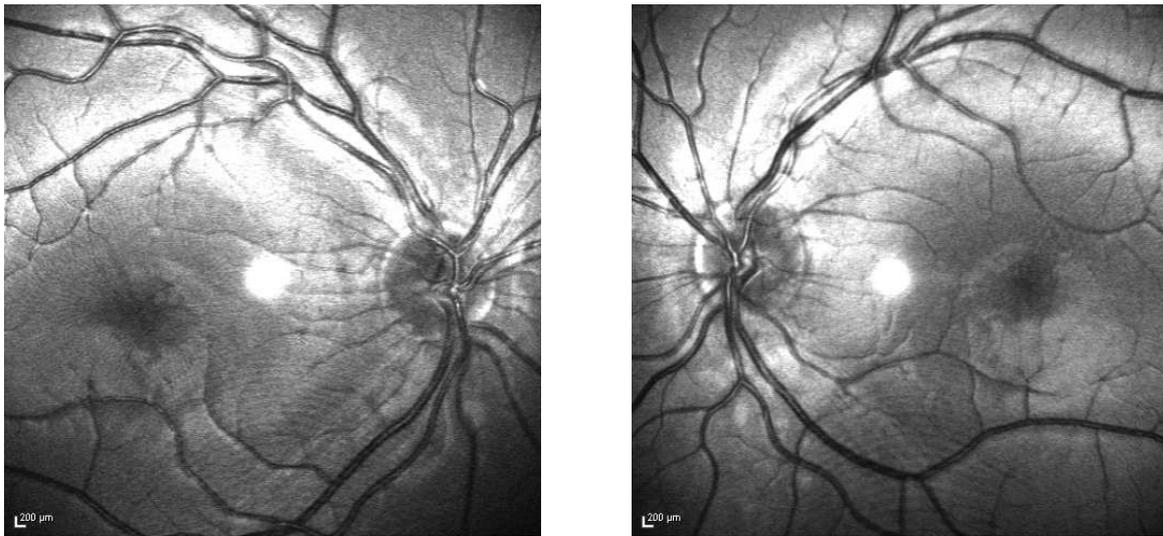
**Abbildung 15: Fundusphotografien von Patient 372.01:** typisch sind die mikrozystischen Veränderungen im zentralen Bereich. (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. B. Lorenz)



**Abbildung 16: Fundusphotografien von Patient 372.05:** signifikant ist die Radspeichenstruktur perifoveal (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. B. Lorenz)

Patientin (eigentlich Konduktorin) 390.02 vererbte ihrem Sohn 390.01 die Mutation p.R182C (c.544C>T). Anstatt Arginin wird an Nukleotidstelle 544 Cytosin kodiert. Die nachfolgende Mutation wurde ein Mal von Lesch et al.<sup>40</sup> beschrieben, p.R209L

(c.626G>T). Hier tritt an Stelle von Guanin Thymin und es wird folglich anstatt Histidin Leucin übersetzt und die Aminosäuresequenz ändert sich. Die Patienten 1152.01 und 1152.02 zeigten diese Substitution. Die Sehschärfe von 1152.01 war stark vermindert und er zeigte, wie die meisten jungen Patienten, hauptsächlich im OCT mehrere Zysten in der Netzhaut, was auf eine typische foveale Retinoschisis hinwies. Von seiner Mutter 1152.02 lagen keine ophthalmologischen Untersuchungen vor. (siehe Abb.: 17)



**Abbildung 17: Fundusphotografien (rotfrei) von Patient 1152.01:** kennzeichnend sind die zystischen Veränderungen in der Makula. (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. B. Lorenz)

### **3.2.2.3. Untersuchungen zur verwandtschaftlichen Beziehung von Patienten mit einer identischen Mutation**

Die Patienten 315.01, 501.1, 1332.01 und 1510.01 stammten alle aus der Gegend um Bogen in Niederbayern und trugen die gleiche Mutation p.P193L (c.598C>T). Dies legte einen Foundereffekt nahe. Die Auswertung von sieben Mikrosatellitenmarkern zwischen dem *RS1*-Locus und dem Telomer zeigte für fünf Marker (DXS1233, DXS9902, DXS999, DXS8001, DXS8002), dass alle Patienten ein Allel identischer Größe trugen. Die gleichzeitige Auswertung der Mütter 315.02 und 1510.02 zeigte, dass beide Mütter homozygot für diese vier Marker waren. Dies spricht dafür, dass diese vier Marker nicht informativ waren. Die Marker DXS1060

und DXS6760 zeigten einheitliche Allele bei den Patienten 1332.01 und 1510.01, die von den Allelen der Patienten 315.01 und 501.01 abwichen. Tabelle 18 gibt die relativen Allele an.

Marker	315.1	315.2	501.1	1332.1	1510.1	1510.2
DXS1233	1	1	1	1	1	1
DXS1060	1	1	1	2	2	2
DXS9902	1	1	1	1	1	1
DXS6760	1	1	1	2	2	2
DXS999	1	1	1	1	1	1
DXS8001	1	1	1	1	1	1
DXS8002	1	1	1	1	1	1

**Tabelle 18: Genotypen der Patienten mit p.P193L Mutation**

### 3.2.3. Polymorphismen

Bei zwei Patienten (798.01 und 1097.01) war die identifizierte Mutation als Polymorphismus zu bewerten, da es sich um eine isokodierende Mutation im Exon 5: p.L127L (c.384G>A) handelte. Genau wie 1097.01 zeigte 798.01 eine Retinoschisis mit Degeneration. Beide tragen denselben Polymorphismus in sich, sind jedoch nicht verwandt.

### 3.3. Patienten ohne Mutationsnachweis

Bei 4 Indexfällen (389.01, 1653.01, 1657.01, 1682.01) konnte keine Mutation im *RS1* Gen gefunden werden, obwohl die männlichen Patienten alle phänotypisch die gleichen Symptome aufwiesen wie Patienten mit Mutation (siehe Tabelle 16). Sie zeigten eine eindeutige Retinoschisis mit Radspeichenstruktur und Degeneration der Makula, hatten keinen Makulawallreflex und wiesen eine erniedrigte b- Welle in der Maximalantwort des skotopischen ERGs auf.

### 3.4. Konduktorinnenuntersuchung

Wie oben erwähnt, können Konduktorinnen durch eine SSCP entdeckt werden, da sie Träger der Mutation sind und auffällige Banden zeigen. Die phänotypischen Untersuchungen wie OCT, ERG oder Fundusbilder der Konduktorinnen präsentierten, dass alle Konduktorinnen dieser Studie keinerlei Auffälligkeiten am Auge zeigten.

### 3.5. Ergebnis der SSCP- Untersuchung

Bei allen Patienten, die bei der SSCP auffällig waren, wurde anschließend eine Sequenzierung veranlasst. Amplimere, die zunächst keine Abweichung von der Norm zeigten, wurden zusätzlich einer Sequenzierung unterzogen, um eine Mutation auszuschließen und die Sensitivität der Methode zu prüfen. Gegebenfalls wurden die Sequenzierergebnisse durch Gegenstrangsequenzierung oder Restriktionsschnittstellenanalyse verifiziert.

Tabelle 19 zeigt Patienten, bei denen oft auch mehrmals eine auffällige SSCP im Exon 6 sichtbar war. Die Tabelle verdeutlicht, dass mit einer SSCP sowohl Betroffene als auch Konduktorinnen aufgefunden werden können. In dieser Studie wurde bei einem auffälligen Bandenmuster in jedem Fall eine Mutation durch die Sequenzierung bestätigt.

	315.01	315.02	349.01	349.02	349.03	372.01	501.01	584.01	1152.01	1152.02
M	+		+		+	+	+	+	+	
C		+		+						+

**Tabelle 19: Positive Ergebnisse bei SSCP im Exon 6**

M: männlich und betroffen, C: obligate Konduktorin, + : auffällige SSCP

Wie schon erwähnt, wurden bei 17 Indexpatienten insgesamt 11 verschiedene Mutationen identifiziert, wobei sieben Mutationen mit der SSCP nachweisbar waren.

30 Patientenproben wurden unter verschiedenen Gelbedingungen in allen 6 Exonen mehrmals einer SSCP-Untersuchung unterzogen. Neun Indexproben zeigten in der SSCP auffallende Banden (315.01, 349.01, 372.01, 501.01, 584.01, 1152.01, 1854.01 im Exon 6; 480.01, 437.01 im Exon 4), bei denen in der Sequenzierung die Mutation identifiziert wurde. Diese 9 Proben zeigten 7 verschiedene Mutationen. Drei Patientenproben zeigten bei der SSCP im jeweiligen Exon keine auffällige Bande, obwohl später bei der Sequenzierung eine Mutation im getesteten Exon gefunden wurde (390.01, 390.02, 630.01). Bei diesen drei Proben konnten zwei weitere Mutationen p.R182C (c.544C>T) und p.R102Q (c.305G>A) identifiziert werden. In dieser Studie zeigte die SSCP-Untersuchung eine Sensitivität (Richtig-Positiv-Rate) von 75% ( $P(\text{positiv erkannt}) = \frac{\text{Anzahl der richtig positiven}}{\text{Anzahl der richtig positiven} + \text{Anzahl der falsch negativen}}$ ). Deshalb wurde der Entschluss gefasst, sechs Indexproben (126.01, 372.05, 496.01, 467.01, 1332.01, 1510.01) nicht mit Hilfe der SSCP zu untersuchen, sondern gleich einer Sequenzierung zu unterziehen, die dann auch die Mutation identifizierte. Unter diesen sechs Proben waren zwei Mutationen, die vorher nicht durch die SSCP erkannt wurden und zwar p.R141C (c.421C>T) und p.F108C (c.323T>C)). Zur besseren Darstellung der verschiedenen Indexfälle mit ihren Mutationen siehe Tabelle 20.

Kategorien Indexfälle	- SSCP + Seq.	+ Seq.	+ SSCP	Verschiedene Mutationen
N=9		9	9	7
N=2	2			2
N=6	Keine SSCP	6	Keine SSCP	2
<b>Gesamt N=17</b>				<b>11</b>

**Tabelle 20: Übersicht der Indexfälle mit Mutationen**

- SSCP: richtig negative getestete Fälle bei der SSCP, keine auffallende Bande;
- +SSCP: richtig positive getestete Fälle bei der SSCP, auffallende Bande;
- +Seq: positive Sequenzierung

Bei den restlichen 12 Proben konnte entweder das SSCP Ergebnis, aufgrund verminderter Probenqualität, nicht ausgewertet werden oder es waren Verwandte der

Indexpatienten, die das gleiche Ergebnis lieferten. Zwei Proben zeigten ein falsch positives Ergebnis bei der SSCP. 437.01 hatte einmal ein auffälliges Bandenmuster im Exon 5, obwohl die Mutation im Exon 4 lag. 1152.01 zeigte zusätzlich eine Auffälligkeit im Exon 4, trotz der eigentlichen Mutation im Exon 6. Die echte Mutation im Exon 6 wurde aber ebenso in der SSCP durch ein auffallendes Bandenmuster nachgewiesen.

### 3.6. Phänotypische Ergebnisse

Bei den 22 männlichen Personen, die eine Mutation im *RS1*-Gen hatten, fiel die phänotypische Analyse oft individuell ganz verschieden aus. (siehe Tabelle 15)

Tabelle 21 zeigt die phänotypischen Veränderungen in Relation zum Alter der Patienten (insgesamt 18 Einzelpatienten mit auswertbaren Phänotypen). Bei den bis zu 10-Jährigen (N= 6) war bei den hier untersuchten Patienten zu 83,3% eine Retinoschisis im Fundus zu erkennen. 62,5% zeigten bei den 10 bis 20-Jährigen eine Retinoschisis. Gemeinsam hatten die Betroffenen, dass alle eine typische Erniedrigung der b-Welle im ERG aufwiesen. Es konnte symptomatisch keine Abhängigkeit zum Alter festgestellt werden.

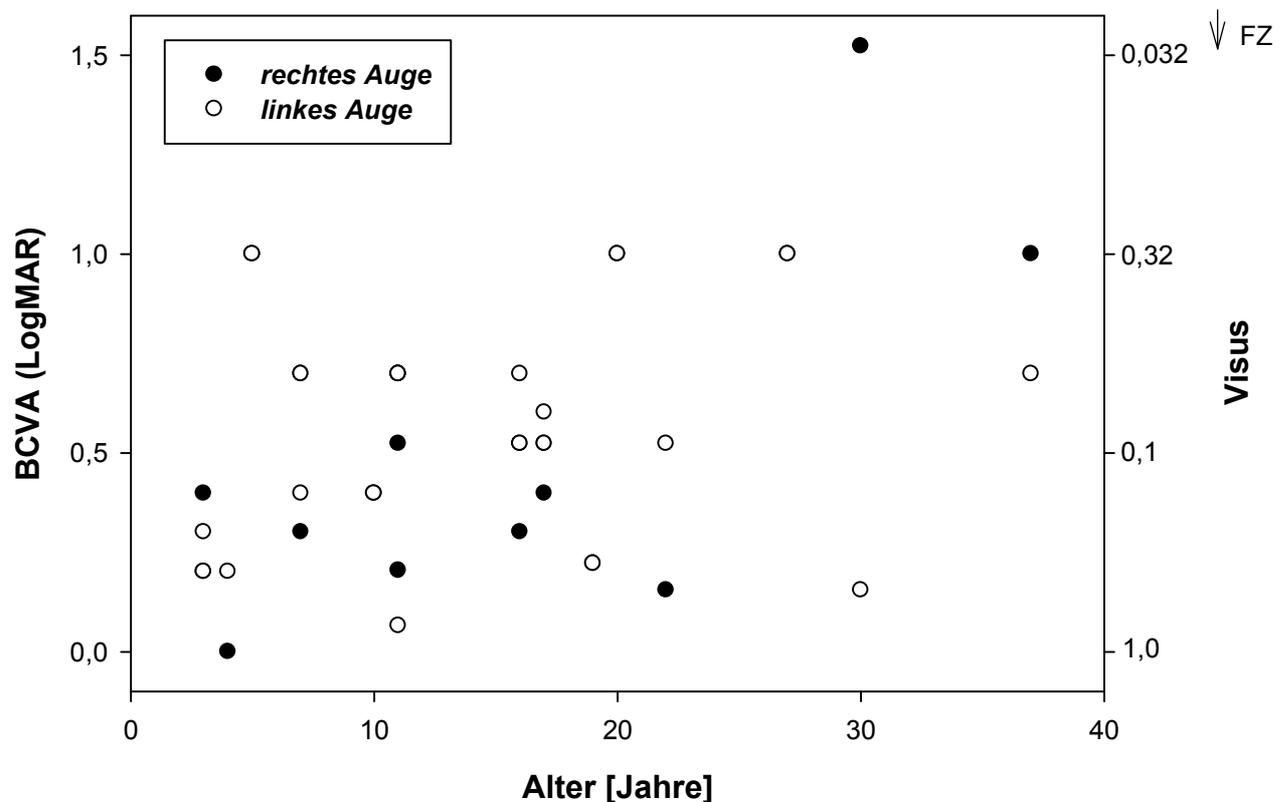
Symptome	1- 10 Jahre [N = 6]	11- 20 Jahre [N = 8]	21- 30 Jahre [N = 3]	Über 30 Jahre [N = 1]
Deutliche Retinoschisis <sup>a</sup>	5	5	2	1
Neg. ERG	6	8	3	1
Auffällige Fundusabweichungen <sup>b</sup>	5	7	3	1
Anzahl der Patienten	6	8	3	1

**Tabelle 21: Phänotypische Ergebnisse in Relation zum Alter**

<sup>a</sup>: Bewertungskriterien: Eindeutige Schisis in der Funduskopie und/oder im OCT erkennbar

<sup>b</sup>: Radspeichenstruktur, Pigmentepitheldefekt, Glaskörperveränderungen, kein Makulawallreflex

Nicht jeder, der eine Mutation in sich trägt, erkrankt gleichermaßen stark an einer Retinoschisis. Selbst die Spaltung der Netzhaut wurde bei den hier Untersuchten (N= 18) nur bei 80% der Patienten eindeutig nachgewiesen. Alle Patienten, bei denen noch keine deutliche Schisis der Netzhaut zu erkennen war, zeigten bestimmte Vorstufen zur Schisis, wie eine Radspeichenstruktur, kleinere Spalten der Netzhaut und einen Pigmentepitheldefekt im Fundusbild, sowie einen schlechten Visus und ein negatives ERG.



**Abbildung 18: Visus bei den betroffenen Männern**

FZ: Fingerzählen

Abbildung 18 demonstriert den Visus der betroffenen Patienten in Abhängigkeit von ihrem Alter. Es wird deutlich, dass der Visus bei den hier untersuchten Patienten in keiner direkten Abhängigkeit zum Alter steht. Alle Patienten zeigten einen etwa gleich schlechten Visus. Bei einem einzigen Patienten war der Visus schlechter als 0,1, bei allen anderen bewegte er sich zwischen 0,1 und 1,0. Rechtes und linkes

Auge waren gleich oft betroffen. Man konnte keine bedeutsamen Unterschiede erkennen.

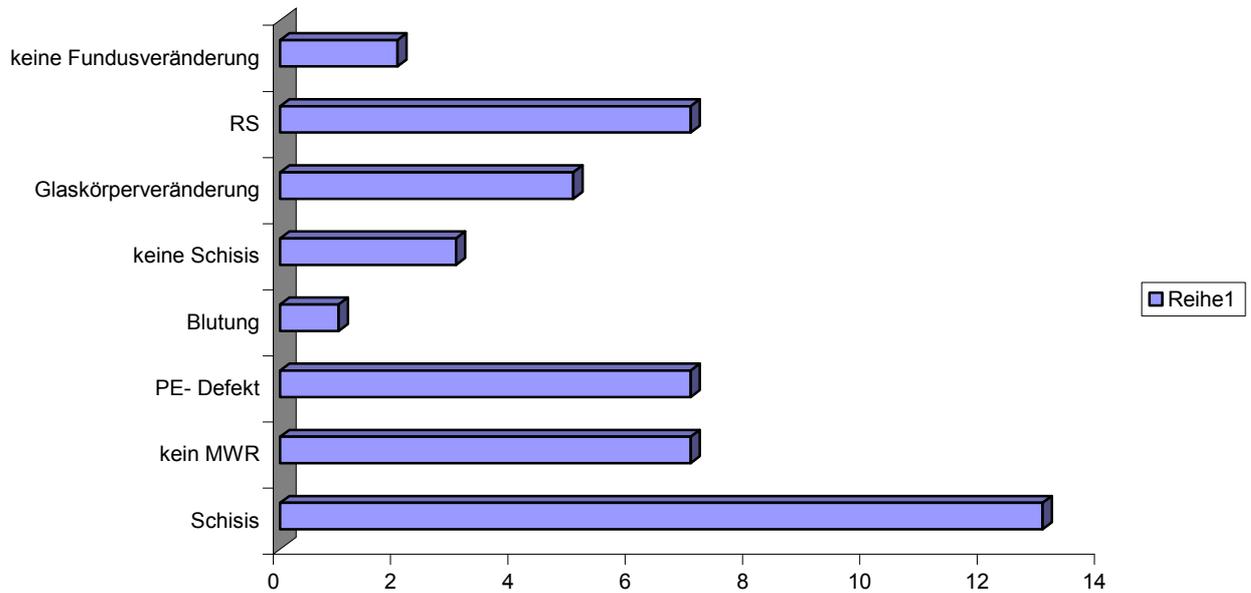
Die Fundusuntersuchungsergebnisse von männlichen Patienten mit und ohne Mutation zeigt Tabelle 22. Von vier betroffenen Männern lagen keine Fundusergebnisse vor.

	Retino- schisis, Spalten	PE- Defekt	RS	Kein MWR	Glaskörper- veränder- ungen	Blutung	Keine Schisis
<b>mit Mutation [N = 18]</b>	13/18	7/18	7/18	7/18	5/18	1/18	3/18
<b>Ohne Mutation [N = 4]</b>	2/4	0/4	4/4	2/4	2/4	0/4	0/4

**Tabelle 22: Fundusuntersuchungsergebnisse**

PE: Pigmentepithel, RS: Radspeichenstruktur, MWR: Makulawallreflex

Zusätzlich demonstriert folgende Abbildung quantitativ die Fundusuntersuchungsergebnisse der betroffenen Männer. Dreizehn von 18 (72,2%) Erkrankten zeigten eine Schisis der Netzhaut. Über ein Drittel (38,9%) hatte keinen Makulawallreflex, eine Radspeichenstruktur und einen Pigmentepitheldefekt. Fünf von 18 (27,5%) zeigten Glaskörperveränderungen mit Trübung, aber nur ein Patient hatte Komplikationen wie z.B. Blutungen. Drei hatten keine Schisis und zwei betroffene Männer zeigten keinerlei Fundusveränderungen.



**Abbildung 19: Grafische Darstellung der Fundusbeschreibungen der betroffenen Männer [N=18]**

### 3.7. Genotyp-Phänotyp-Korrelation

Es konnte in dieser Studie nicht gezeigt werden, dass eine bestimmte Mutation einen bestimmten Phänotyp hervorruft. Tabelle 23 zeigt die verschiedenen Mutationen im Bezug zu den klinischen Parametern. Patienten, die dieselbe Mutation hatten, zeigten ebenso keine Übereinstimmungen in ihren Phänotypen. Wie schon von Wang et al. und Eksandh et al.<sup>17</sup> berichtet, bestätigte auch diese Untersuchung, dass der Phänotyp bei XLRS eine große Variabilität sowohl inter- als auch intrafamiliär zeigt und keine eindeutige Genotyp-Phänotyp-Korrelation erstellt werden kann. In dieser Arbeit konnte dies für die Mutationen p.E72K (c.214G>A) und p.P193L (c.578C>T) gezeigt werden (siehe auch 4.5.).

Mutation	Keine Fundus- veränderung	RS	Glas- körper- veränderung	Keine Schisis	Blutung	PE-Defekt	Kein MWR	Schisis
p.E72K (c.214G>A)	1	1	2		1			3
p.R102Q (c.305G>A)			1			1		1
p.F108C (c.323T>C)		1				1	2	2
p.R141C (c.421C>T)	Keine Angaben							
p.R182C (c.544C>T)	1			1				
p.P192T (c.574C>A)		1					1	1
p.P193L (c.578C>T)		3	1	1		2	2	3
p.R209H (c.626G>A)		1	1	1		1	1	
p.R209L (c.626G>T)						1	1	1
p.R213Q (c.638G>A)						1		1
p.R213fsX24 (c.636delC)								1
<b>Gesamt</b>	<b>2</b>	<b>7</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>13</b>

**Tabelle 23: Identifizierte Mutationen im Bezug zu den klinischen Parametern**

PE: Pigmentepithel, RS: Radspeichenstruktur, MWR: Makulawallreflex

## **4. Diskussion**

### **4.1. Bewertung der SSCP Untersuchung**

Die Aussagekraft des Verfahrens der SSCP ist sehr abhängig von der Struktur der untersuchten PCR-Produkte. Mit einer Nachweisrate bzw. Sensitivität von 75% kann die SSCP beim *RS1* nur als Einstiegsuntersuchung genutzt werden. Es gibt durchaus Mutationen, die mit der SSCP gut erfassbar sind, bestimmte jedoch nicht. Deshalb sollte sich dann bei den SSCP-unauffälligen Proben eine direkte Sequenzierung zur Identifikation von Mutationen anschließen. Das *RS1*-Gen ist klein genug für die direkte Sequenzierung, die nach wie vor den Goldstandard darstellt. Außerdem sollte man immer bedenken, dass unterschiedliche Ionenkonzentrationen der DNA-Proben zu auffälligen Banden bei der SSCP führen können, obwohl keine Mutation vorliegt. Dies war bei zwei Proben dieser Studie der Fall (437.01 und 1152.01), so dass bei *RS1* die direkte Sequenzierung der SSCP vorgezogen werden sollte.

### **4.2. Konduktorinnendiagnostik**

Untersuchungen des Phänotyps mit OCT, ERG oder Funduskopie zeigten bei den hier untersuchten Konduktorinnen keinerlei Auffälligkeiten, wodurch das Risiko für betroffene Nachkommen lange unerkannt bleiben kann. Diese Untersuchungen sind also für die Identifizierung eines Konduktorinnenstatus ungeeignet, was auch den Angaben in der Literatur entspricht. Es zeigt vielmehr die Bedeutung einer genetischen Untersuchung für die Identifikation der Konduktorinnen. Molekulargenetische Untersuchungen wie Sequenzierungen oder die SSCP sind umso ausschlaggebender. Somit kann die Familienanamnese vervollständigt werden und betroffene Frauen können im Hinblick auf ihre Familienplanung kompetent informiert werden.

### 4.3. Aussagekraft der Phänotypisierung der Patienten

Es ist schwierig, bei XLRN-Patienten einen genauen Krankheitsverlauf vorherzusagen, da die Erkrankung eine große Variabilität im Phänotyp zeigt und einen ganz individuellen Verlauf nimmt. Deswegen sind ophthalmologische mit zusätzlich molekulargenetischen Untersuchungen bei XLRN von großer Bedeutung. Die Fundusuntersuchungen zeigten bei den Patienten ganz typische Ergebnisse, waren jedoch in ihrer Ausprägung stark unterschiedlich (siehe Tab.: 15 und 16). In dieser Studie war eine Schisis kein eindeutiges klinisches Vorzeichen für einen positiven Mutationsnachweis bei XLRN, da nur 72,2% der Patienten mit identifizierter Mutation eine Schisis der Netzhaut zeigten, welche man zusätzlich im OCT erkennen konnte. 38,9% hatten zusätzlich keinen Makulawallreflex und 33,3% zeigten Glaskörperveränderungen. Ein Patient hatte eine retinale Blutung und nur fünf Patienten zeigten alle Symptome gleichzeitig (Schisis, kein Makulawallreflex, Glaskörperveränderung). Eine Fundusveränderung gehörte aber meistens zu den ersten Symptomen bei einer XLRN und stellt einen wichtigen Hinweis dar, der zur Diagnose der Krankheit führen kann. Tsang et al. beschrieb ebenfalls als erstes Zeichen einer XLRN feine weiße Punkte in der Makula als Fundusabweichung<sup>9</sup>.

Es zeigten sich intrafamiliär große Variationen im Krankheitsverlauf. Bei den Patienten 480.01 und 480.03 (Mutation p.E72K (c.214G>A)) fiel z.B. der verschieden stark reduzierte Visus auf (480.01 beidseits 0,2 und 480.03 beidseits 0,63). 480.01 zeigte zudem bereits Spaltungen in der Netzhaut, wobei er sechs Jahre älter war als 480.03. Bei 480.03 fanden sich zur Untersuchungszeit noch keine bemerkenswerten Auffälligkeiten an der Netzhaut.

Zu den wesentlichen klinischen Befunden der XLRN gehörte immer ein herabgesetzter Visus. Bei allen Patienten zeigte sich eine deutliche Progredienz des Visusverlustes (siehe Abb.: 18), jedoch konnte keine absolute Korrelation mit dem Alter der Patienten festgestellt werden. Die Entwicklung ihres Visusverlusts konnte zum Teil nicht fortlaufend dokumentiert werden, da der Visus der meisten Patienten nicht kontinuierlich über mehrere Jahre untersucht worden ist. Der Visus eines XLRN-Patienten kann sich im Laufe seines Lebens deutlich verschlechtern, er kann aber auch lange Zeit konstant bleiben<sup>4</sup>. Der Grad der Verschlechterung kann meist nicht genau vorausgesagt werden und wird stark von sekundären Komplikationen, wie z.B. dem Auftreten von vitreoretinalen Blutungen oder regionalen

Netzhautablösungen, beeinflusst<sup>23</sup>. Die Lage der Netzhautspalten ist individuell verschieden und könnte ein Hauptfaktor für die Variabilität des Visus sein. Eine Studie zeigte, dass bei Patienten mit zystischen Veränderungen der Visusverlust schlechter abschätzbar war als bei denen, die Pigmentierungen in der Fovea oder atrophische Läsionen zeigten<sup>3</sup>.

Zusätzlich sind eine sorgfältige individuelle Familienanamnese und elektropysiologische Untersuchungen bei der Diagnosefindung der XLRS erforderlich. Neben dem OCT, welches eine sinnvolle Unterstützung zur Definition der Befunde der Funduskopie darstellt, trägt die ERG-Untersuchung wesentlich zur Diagnosefindung der XLRS-Erkrankung bei, denn eine Gemeinsamkeit bei allen Betroffenen zeigte sich bei den elektrophysiologischen Untersuchungen: es konnte bei allen Patienten ein negatives ERG aufgezeichnet werden. Wie auch Apushkin et al. 2005 bestätigte diese Studie, dass charakteristische Fundusbilder mit einer selektiven oder stark reduzierten b-Welle im ERG eines der deutlichsten diagnostischen Hinweise für eine XLRS sind. Die Erniedrigung der b-Welle stellt einen nützlichen klinischen Marker bei der Diagnostik einer XLRS dar. Auch Linda et al. betonen, dass ERG-Tests eine sehr nützliche Untersuchungsmethode zur Auffindung retinaler Dysfunktionen bei XLRS sein können, jedoch kann das ERG bei anderen Krankheiten wie zum Beispiel Retinitis Pigmentosa ähnlich aussehen<sup>35</sup>. Trotzdem gibt es XLRS-Fälle, bei denen die b- Welle des ERG`s nicht reduziert ist, wie eine Untersuchung von Shinoda K. et al. <sup>59</sup> zeigte.

Der klinische Befund von 349.01 war für eine XLRS vorerst eher unwahrscheinlich, da er schon im Alter von 5 Jahren einen sehr niedrigen Visus hatte und seit Geburt an einem starken Nystagmus litt. Aufgrund des negativen ERG`s und der Familienanamnese (Onkel der Mutter hatte XLRS) wurde eine genetische Untersuchung auf XLRS veranlasst, welche den Verdacht auf die Krankheit bestätigte. Patient 501.01 zeigte ganz typische Merkmale einer XLRS und auch der Stammbaum deutete auf eine X-chromosomale Vererbung hin. Bei 1332.01 bestand bei verwandtschaftlich bekannter XLRS kein Zweifel an der Diagnose der Erkrankung. Obwohl die erste Untersuchung keinen Verlust der b-Welle zeigte, lag klinisch ein eindeutiger Befund vor, der später molekulargenetisch bestätigt wurde.

Ebenso deutete bei drei Familien (349.01, 467.01, 496.01) eine positive Familienanamnese auf eine XLRS hin, bei denen später ebenso molekulargenetisch eine Mutation bestätigt wurde.

#### **4.4. Molekulargenetischer Aspekt**

Bei zwei Patienten (798.01 und 1097.01) war die identifizierte Mutation als Polymorphismus zu bewerten und bei 4 Indexfällen konnte trotz eines phänotypischen Hinweises auf eine XLRS keine Mutation im *RS1*-Gen gefunden werden. Dies zeigt, dass die Krankheit nicht nur aufgrund einer Mutation im *RS1*-Gen zum Ausbruch kommen kann, sondern ist vielmehr ein Hinweis darauf, dass andere Ursachen eine vergleichbare Pathologie zeigen können. Die Indexfälle setzten sich aus fünf Einzelfällen und einem Bruderpaar zusammen. Trotz eines eigentlich eindeutigen phänotypischen Hinweises auf die Krankheit, muss zur Diagnose immer auch eine molekulargenetische Untersuchung durchgeführt werden.

Unser Screening des XLRS-Gens führte nicht zur Identifizierung mehrerer neuer Mutationen. Dies könnte daran liegen, dass das Gen eine relativ kleine Größe hat und folglich keine große Angriffsfläche für mutagene Vorgänge darstellt. Zusätzlich toleriert es auch keinerlei Veränderungen und kann Mutationen somit schlecht kompensieren. Zudem ist das XLRS-Gen molekulargenetisch bereits gut untersucht worden und es wurden bisher 180 verschiedene krankheits-assoziierte Mutationen im *RS1*-Gen identifiziert (siehe auch Kapitel 1.2.3.). Zukünftig sind nur wenige neue Mutationen zu erwarten. Bei unserem Patientengut konnte nur eine noch nicht beschriebene Mutation gefunden werden und zwar bei Patient 584.01 p: R213fsx24 (c.636delC) im Exon 6. Die Sequenzveränderung führte zu einer Verschiebung des Leserasters und einem Verlust von 12 C-terminalen Aminosäurepositionen, was einen völligen Verlust des Genprodukts zur Folge hat.

#### **4.5. Bewertung der Genotyp- Phänotyp- Korrelation**

Die Hypothese, dass eine direkte Genotyp-Phänotyp-Korrelation besteht, musste ausgeschlossen werden, da bei fünf Betroffenen, die die gleiche Mutation trugen (p.E72K (c.214G>A)) und nicht verwandt waren, ein deutlich unterschiedlicher Phänotyp auftrat. Die Unterschiede zeigten sich im Visus, der Refraktion und in den Veränderungen des Fundus. Der eine hatte z.B. eine Schisis der Netzhaut mit Blutung, Glaskörperverdickung und Exsudation und beim anderen war nur die Papille blass und pigmentiert ohne eine Schisis zu zeigen. Auch bei der Mutation p.P193L (c.578C>T) fiel der Phänotyp der Patienten ganz unterschiedlich aus. Ein Betroffener zeigte eine deutliche Retinoschisis mit Zysten und Glaskörperabhebung und ein anderer hatte keine Schisis, sondern nur einen leichten Pigmentepitheldefekt. Ein Dritter mit derselben Mutation hatte keinen Makulawallreflex, die beiden anderen dagegen schon. Das Patientenalter spielte dabei keine signifikante Rolle. Somit bestätigte auch diese Studie, ebenso wie Eksandh et al.<sup>17</sup>, dass der Phänotyp bei gleicher Mutation bei XLR5 eine große Variabilität sowohl inter- als auch intrafamiliär zeigt. Es konnte soweit keine eindeutige Genotyp-Phänotyp-Korrelation durchgeführt werden.

#### **4.6. Verwandtschaftsfrage bei Patienten mit p.P193L Mutation und gleicher geographischer Herkunft**

Vier Patienten dieser Studie (315.01, 501.01, 1332.01, 1510.01) trugen die gleiche Mutation (p.P193L (c.578C>T)) und wohnten bzw. stammten aus derselben Umgebung bei Bogen in Niederbayern. Aufgrund der Stammbaumerhebung war eine verwandtschaftliche Beziehung nur bei 1332.01 und 1510.01 bekannt. Somit stellte sich die Frage, ob hier ein Foundereffekt vorliegt. Die eingesetzten Mikrosatelliten-Marker lagen um den *RS1*-Locus bis hinaus in das Telomer verteilt. Für die Marker DXS1060 und DXS6760 wurden je zwei Allele nachgewiesen, aus denen hervorging, dass die Patienten 315.01 und 501.01 nicht mit 1332.01 und 1510.01 verwandt sind.

Daher ist die p.P193L Mutation als Folge eines unabhängigen mutagenen Vorgangs zu beurteilen. Dieses Phänomen ist bei verschiedenen Genen mit wiederkehrenden Mutationen bekannt (z.B. *hBEST1*).

## 5. Zusammenfassung

Die juvenile Retinoschisis ist eine X-chromosomal rezessiv vererbte Augenkrankheit mit einer sich früh manifestierenden makulären Dysfunktion, welche klinisch durch eine Spaltung der Netzhaut hervorgerufen wird. Bezeichnenderweise für die Krankheit ist, dass in der Regel nur Männer betroffen sind. Im frühen Stadium der Krankheit besteht die Makula typischerweise aus kleinen radial in der Perifovea angeordneten Mikrozysten bzw. Falten. Die zystischen Strukturen können sehr groß werden, die innere Lamina der Retina löst sich ab (Schisis) und sklerotische Abhebungen können entstehen, in die es einbluten kann, was in dieser Untersuchung bei einem Patienten der Fall war. Konduktorinnen können leichte ERG-Veränderungen zeigen, aber ansonsten unauffällig bleiben, was auch in dieser Studie bestätigt wurde. Bei den Untersuchungen mit OCT, ERG oder in Fundusbildern zeigten die Konduktorinnen keinerlei Auffälligkeiten. Deshalb sind für die sichere Diagnose eines Konduktorinnenstatus die molekulargenetischen Untersuchungen wesentlich.

Das Ziel dieser Studie war, die *RS1*-Genotypen im Patientengut der Abteilung für Kinderophthalmologie, Strabismologie und Ophthalmogenetik der Universität Regensburg festzustellen und mit den retrospektiv ausgewerteten phänotypischen Merkmalen der Patienten zu korrelieren. Es wurden 16 Familien und 6 Einzelpatienten (gesamt 43 Individuen) mit dem Verdacht einer XLRS in einem Zeitraum von ca. 10 Jahren mittels SSCP, Restriktionsverdau und Sequenzierungen molekulargenetisch untersucht und deren Phänotypen ausgewertet. 22 Patienten waren männliche Mutationsträger und 9 obligate Konduktorinnen, die über einen Mutationsnachweis molekulargenetisch identifiziert wurden. Das für die X-gebundene juvenile Retinoschisis verantwortliche Gen ist das *RS1*-Gen mit seinen 6 Exons. *RS1* ist ein peripheres Membranprotein und enthält eine hoch konservierte Discoidindomäne. Nach molekulargenetischer Untersuchung konnten in dieser Studie die meisten Missense-Mutationen des *RS1*-Gens in den Exons gefunden werden, die für diese Discoidindomäne kodieren. Die Mutationen der Untersuchung wurden in den Exons 4, 5 und 6 verifiziert, davon 63,6% in Exon 6. Bei zwei Indexfällen wurde ein Polymorphismus diagnostiziert, wobei es sich um eine isokodierende Mutation im Exon 5 handelte.

Bei den betroffenen Patienten wurden 11 verschiedene Mutationen durch eine auffällige SSCP und eine Sequenzierung identifiziert und gegebenenfalls durch Gegenstrangsequenzierung und Restriktionsschnittstellenanalyse verifiziert. Die SSCP-Untersuchung zeigte in vorliegender Studie eine Sensitivität von 75%. Von den gefundenen Mutationen waren 10 Missense-Mutationen und eine Deletionsmutation. Diese wurde in dieser Studie erstmalig identifiziert und zwar p.R213fsX24 (c.636delC) im Exon 6 bei Patient 584.01. Die Sequenzveränderung führte zu einer Verschiebung des Leserasters und einem Verlust von 12 C-terminalen Aminosäurepositionen, die den völligen Verlust des Genprodukts nach sich zog. Bei den 10 anderen Punktmutationen (siehe Tab.: 15 und 16) war der Phänotyp individuell sehr unterschiedlich. Die Verwandtschaftsfrage aufgrund örtlicher Wohnnähe bestimmter Patienten, die dieselbe Mutation hatten, konnte mit Hilfe von Mikrosatellitenmarkern widerlegt werden.

Die klinischen und elektrophysiologischen Befunde der Patienten mit XLRS wurden retrospektiv ausgewertet. Als charakteristische Befunde fanden sich eine Hyperopie (im Mittel  $+2,3 \pm 3,1$ dpt), ein reduzierter Visus (im Mittel  $0,24 \pm 0,2$ ), immer pathologische Veränderungen der Makula und eine reduzierte b-Wellen Amplitude im ERG. Komplikationen waren Visusminderungen bei 100% der Patienten, Glaskörperveränderungen mit Trübung in 33,3% der Fälle, Glaskörperblutungen in 5% der Patienten und spontane Netzhautablösungen in 72,2% der Augen. Die Fundusuntersuchungen zeigten bei den Patienten zwar ganz typische Ergebnisse, jedoch waren die Fundusveränderungen stark unterschiedlich in ihrer Ausprägung. Außerdem zeigten sich auch intrafamiliär große Variationen im Krankheitsverlauf. Alle Patienten zeigten eine Visusverschlechterung, welche jedoch nicht in einer direkten Abhängigkeit zum Alter der Patienten stand. Es konnte gezeigt werden, dass der Phänotyp bei XLRS eine große Variabilität sowohl inter- als auch intrafamiliär mit gleicher Mutation präsentiert und dass keine eindeutige Genotyp-Phänotyp-Korrelation bewiesen werden kann.

## **6. Summary**

X-linked juvenile Retinoschisis is a vitreoretinal disease, featuring a macular dysfunction at an early stage, which is clinically due to a splitting of the retina. Generally, only males are affected. In the early stages, the macula typically shows small, peripheral, radial microcysts or folds. The cysts can develop quite large, the inner retina layer separates and sclerotic detachment may occur, which may result in vitreous hemorrhage as could be seen in a patient in the current study. Female carriers can show subtle electroretinographic (ERG) changes, whereas they otherwise do not show any clinically abnormality. This study showed, that the examination of female carriers with optical coherence tomography (OCT), ERG and fundus photographs did not provide any significant abnormality. A reliable diagnosis of a carrier status requires molecular genetic analysis.

The aim of the study was to define the *RS1*-genotypes among patients of the “Department of Paediatric Ophthalmology, Strabismology and Ophthalmogenetics at the Medical Center of the University of Regensburg”, and to correlate them with retrospectively evaluated phenotypical characteristics of the patients obtained over a period of 10 years. Molecular genetic examinations have been conducted on 16 families and 6 individuals (in total: 43 individuals) with suspected XLRS via single-strand conformation polymorphism (SSCP), restriction digest assay, and direct sequencing of PCR-products. Subsequently, the phenotypes were evaluated. Out of the sample group, 22 were male mutation carriers and 9 were obligate female carriers, which had been identified via a molecular genetic verification. The gene underlying X-linked juvenile Retinoschisis (XLRS1) is the *RS1* gene consisting of 6 exons. *RS1* is a peripheral membrane protein and contains a highly conserved discoidin domain that has been implicated in phospholipid binding and cell-cell interactions on membrane surfaces. After molecular genetic examination, most of the missense mutations of the *RS1* gene could be found in the exons coding for this discoidin domain in this study. The identified mutations were verified in exons 4, 5 and 6, of which 63,6% occurred in exon 6. In two index cases, a polymorphism was diagnosed, represented by an isocoding sequence change in exon 5. Among the patients, 11 different mutations were identified. SSCP showing aberrant banding pattern followed by a DNA sequence analysis confirmed the presence of these

mutations. The SSCP examination showed a sensitivity of 75% in the current study. Out of the mutations determined, 10 were missense mutations and one was a deletion mutation. The deletion mutation (c.636delC (p.R213fsX24) in exon 6) is a novel *RS* mutation, identified in patient 584.01. This deletion causes a frameshift during translation and results in a loss of 12 C-terminal amino acid positions, entailing the complete loss of the gene product. In the case of the 10 other point mutations (see tables 15 and 16) the phenotype was individual. A possible relation among patients with identical mutations due to proximity of their places of domicile could be excluded with the help of microsatellite markers.

The clinical and electrophysical diagnostic findings of the patients with XLRS were retrospectively analysed. Characteristic findings were hyperopia (on average  $+2,3 \pm 3,1$  dpt), a reduced visual acuity (on average  $0,24 \pm 0,2$ ), pathologic changes in the macula and a reduced b-wave amplitude of the ERG. In addition to reduced visual acuity, vitreous veils occurred in 33,3%, vitreous hemorrhages in 5%, and spontaneous retinal detachment in 72,2% of cases. The fundus examinations showed typical results for all patients, however with varying expression. Intrafamilial heterogeneity occurred in the course of the disease. All patients featured a loss of visual acuity, but a direct correlation with age could not be drawn in this study. It could be shown that the phenotype for XLRS featured a large inter- and intrafamilial variability with identical mutation. No unambiguous genotype- phenotype correlation could be shown.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Functional implications of the spectrum of mutations found in 234 cases with X-linked juvenile retinoschisis. The Retinoschisis Consortium. *Human Molecular Genetics* 7[7], 1185-1192. 1998.
2. Aaij C, Borst P. The gel electrophoresis of DNA. *Biochim.Biophys.Acta.* 269[2], 192-200. 1972.
3. Apushkin MA, Fishman GA, Janowicz MJ. Correlation of optical coherence tomography findings with visual acuity and macular lesions in patients with X-linked retinoschisis. *Ophthalmology* 112[3], 495-501. 2005.
4. Apushkin MA, Fishman GA, Rajagopalan AS. Fundus findings and longitudinal study of visual acuity loss in patients with X-linked retinoschisis. *Retina* 25[5], 612-618. 2005.
5. Baumgartner S, Hofmann K, Chiquet-Ehrismann R, Bucher P. The discoidin domain family revisited: new members from prokaryotes and a homology-based fold prediction. *Protein Sci.* 7[7], 1626-1631. 1998.
6. Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC. Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high- resolution PAGE. *American Journal of Human Genetics* 48, 137-144. 1991.
7. Byer NE. Clinical study of senile retinoschisis. *Archives of Ophthalmology* 79[1], 36-44. 1968.
8. Chien A, Edgar DB, Trela JM. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J.Bacteriol.* 127[3], 1550-1557. 1976.
9. Choudhary D, Jansson I, Stoilov I, Sarfarazi M, Schenkman JB. Metabolism of retinoids and arachidonic acid by human and mouse cytochrome P450 1b1. *Drug Metab Dispos.* 32[8], 840-847. 2004.
10. Condon GP, Brownstein S, Wang NS, Kearns JA, Ewing CC. Congenital hereditary (juvenile X-linked) retinoschisis. Histopathologic and ultrastructural findings in three eyes. *Archives of Ophthalmology* 104[4], 576-583. 1986.
11. de Jong PT, Zrenner E, van Meel GJ, Keunen JE, van Norren D. Mizuo phenomenon in X-linked retinoschisis. Pathogenesis of the Mizuo phenomenon. *Archives of Ophthalmology* 109, 1104-1108. 1991.
12. Denden A. X-chromosomale vitreo-retinale Degeneration. ERG- und EOG-Untersuchungsergebnisse. *Klin.Monatsbl.Augenheilkd.* 166[1], 35-43. 1975.
13. Deutman AF. Sex-linked juvenile Retinoschisis. Deutman AF, editor. The hereditary dystrophies of the posterior pole of the eye. 48-98. 1971.
14. Drenser KA, Trese MT, Capone A, Jr., Hartzler M, Dailey W. Elevated levels of cystatin C and tenascin-C in schisis cavities of patients with congenital X-linked retinoschisis. *Retina.* 27[8], 1086-1089. 2007.
15. Dyka FM, Molday RS. Coexpression and interaction of wild-type and missense RS1 mutants associated with X-linked retinoschisis: its relevance to gene therapy. *Invest Ophthalmol Vis.Sci.* 48[6], 2491-2497. 2007.
16. Dyka FM, Wu WW, Pfeifer TA, Molday LL, Grigliatti TA, Molday RS. Characterization and purification of the discoidin domain-containing protein retinoschisin and its interaction with galactose. *Biochemistry.* 47[35], 9098-9106. 2008.
17. Eksandh LC, Ponjavic V, Ayyagari R, Bingham EL, Hiriyantha KT, Andreasson S, Ehinger B, Sieving PA. Phenotypic expression of juvenile X-linked retinoschisis in Swedish families with different mutations in the XLR1 gene. *Archives of Ophthalmology* 118[8], 1098-1104. 2000.
18. Foos RY. Senile retinoschisis. Relationship to cystoid degeneration. *Trans.Am.Acad.Ophthalmol.Otolaryngol.* 74[1], 33-51. 1970.
19. Forsius H, Krause U, Helve J, Vuopala V, Mustonen E, Vainio-Mattila B, Fellman J, Eriksson AW. Visual acuity in 183 cases of X-chromosomal retinoschisis. *Can.J.Ophthalmol.* 8[3], 385-393. 1973.

20. Ganten D, Ruckpaul K. Handbuch der molekularen Medizin - Monogen bedingte Erbkrankheiten. [7], 107-109. 2000. Berlin, Springer.
21. Gehrig A, Weber BH, Lorenz B, Andrassi M. First molecular evidence for a de novo mutation in RS1 (XLR1) associated with X linked juvenile retinoschisis. *Journal of Medical Genetics* 36[12], 932-934. 1999.
22. Gehrig A, White K, Lorenz B, Andrassi M, Clemens S, Weber BH. Assessment of RS1 in X-linked juvenile retinoschisis and sporadic senile retinoschisis. *Clinical Genetics* 55[6], 461-465. 1999.
23. George ND, Yates JR, Moore AT. X linked retinoschisis. *British Journal of Ophthalmology* 79[7], 697-702. 1995.
24. Grayson C, Reid SN, Ellis JA, Rutherford A, Sowden JC, Yates JR, Farber DB, Trump D. Retinoschisin, the X-linked retinoschisis protein, is a secreted photoreceptor protein, and is expressed and released by Weri-Rb1 cells. *Hum Mol.Genet* 9[12], 1873-1879. 2000.
25. Haas J. Über das Zusammenkommen von Veränderungen der Netzhaut. *Arch.Augenheilkunde* 37, 343-348. 1998.
26. Hirianna KT, Bingham EL, Yashar BM, Ayyagari R, Fishman G, Small KW, Weinberg DV, Weleber RG, Lewis RA, Andreasson S, Richards JE, Sieving PA. Novel mutations in XLR1 causing retinoschisis, including first evidence of putative leader sequence change. *Human Mutation* 14[5], 423-427. 1999.
27. Hotta Y, Fujiki K, Hayakawa M, Ohta T, Fujimaki T, Tamaki K, Yokoyama T, Kanai A, Hirakata A, Hida T, Nishina S, Azuma N. Japanese juvenile retinoschisis is caused by mutations of the XLR1 gene. *Human Genetics* 103[2], 142-144. 1998.
28. Huopaniemi L, Rantala A, Forsius H, Somer M, de la CA, Alitalo T. Three widespread founder mutations contribute to high incidence of X-linked juvenile retinoschisis in Finland. *European Journal of Human Genetics* 7[3], 368-376. 1999.
29. Jager GM. A hereditary Retinal Disease. *Transactions of the Ophthalmological Society of the United Kingdom* 73, 617-619. 1953.
30. Jimenez-Sierra JM, Ogden TE, Van Boemel GB. X-linked Retinoschisis. Jimenez-Sierra JM, Ogden TE, Van Boemel GB, editors. *Inherited Retinal Diseases - A Diagnostic Guide*. 210-211. 1989. St. Louis, The CV Mosby Company.
31. Johnson BA, Aoyama N, Friedell NH, Ikeda S, Ikeda A. Genetic modification of the schisis phenotype in a mouse model of X-linked retinoschisis. *Genetics*. 178[3], 1785-1794. 2008.
32. Joshi MM, Drenser K, Hartzler M, Dailey W, Capone A, Jr., Trese MT. Intrachisis cavity fluid composition in congenital x-linked retinoschisis. *Retina*. 26[7 Suppl], S57-S60. 2006.
33. Kaplan J, Pelet A, Hentati H, Jeanpierre M, Briard ML, Journel H, Munnich A, Dufier JL. Contribution to carrier detection and genetic counselling in X linked retinoschisis. *Journal of Medical Genetics* 28, 383-388. 1991.
34. Kellner U, Brummer S, Foerster MH, Wessing A. X-chromosomale kongenitale Retinoschisis. Klinik und Elektrophysiologie. *Fortschr.Ophthalmol*. 87[3], 264-268. 1990.
35. Kim LS, Seiple W, Fishman GA, Szlyk JP. Multifocal ERG findings in carriers of X-linked retinoschisis. *Doc.Ophthalmol*. 114[1], 21-26. 2007.
36. Kirsch LS, Brownstein S, de Wolff-Rouendaal D. A histopathological, ultrastructural and immunohistochemical study of congenital hereditary retinoschisis. *Can.J.Ophthalmol*. 31[6], 301-310. 1996.
37. Kjellström S, Bush RA, Zeng Y, Takada Y, Sieving PA. Retinoschisin gene therapy and natural history in the Rs1h-KO mouse: long-term rescue from retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis.Sci*. 48[8], 3837-3845. 2007.
38. Ko ML, Liu Y, Shi L, Trump D, Ko GY. Circadian regulation of retinoschisin in the chick retina. *Invest Ophthalmol Vis.Sci*. 49[4], 1615-1621. 2008.
39. Le Pecq JB, Paoletti C. A new fluorometric method for RNA and DNA determination. *Analytical Biochemistry* 17[1], 100-107. 1966.

40. Lesch B, Szabo V, Kanya M, Varsanyi B, Somfai GM, Hargitai J, Vamos R, Fiedler O, Farkas A. Truncation of retinoschisin protein associated with a novel splice site mutation in the RS1 gene. *Molecular Vision* 14: 1549-58., 1549-1558. 2008.
41. Linz U, Degenhardt H. Die Polymerase-Kettenreaktion: Ein Überblick. *Naturwissenschaften* 77[11], 515-530. 1990.
42. Löffler G. Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie. 4, 354. 2001. Berlin, Springer.
43. Lorenz B, Preising MN, Kretschmann U. Molekulare und klinische Ophthalmogenetik. *Deutsches Ärzteblatt* 98[51-52], A3445-A3449. 2001.
44. Mashima Y, Shinoda K, Ishida S, Ozawa Y, Kudoh J, Iwata T, Oguchi Y, Shimizu N. Identification of four novel mutations of the XLR51 gene in Japanese patients with X-linked juvenile retinoschisis. *Human Mutation* 13[4], 338. 1999.
45. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16, 1215. 1988.
46. Min SH, Molday LL, Seeliger MW, Dinculescu A, Timmers AM, Janssen A, Tonagel F, Tanimoto N, Weber BH, Molday RS, Hauswirth WW. Prolonged recovery of retinal structure/function after gene therapy in an Rs1h-deficient mouse model of x-linked juvenile retinoschisis. *Mol. Ther.* 12[4], 644-651. 2005.
47. Molday LL, Hicks D, Sauer CG, Weber BH, Molday RS. Expression of X-linked retinoschisis protein RS1 in photoreceptor and bipolar cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 42[3], 816-825. 2001.
48. Molday LL, Wu WW, Molday RS. Retinoschisin (RS1), the protein encoded by the X-linked retinoschisis gene, is anchored to the surface of retinal photoreceptor and bipolar cells through its interactions with a Na/K ATPase-SARM1 complex. *Journal of Biological Chemistry* 282[45], 32792-32801. 2007.
49. Molday RS. Focus on molecules: retinoschisin (RS1). *Exp. Eye Res.* 84[2], 227-228. 2007.
50. Peachey NS, Fishman GA, Derlacki DJ, Brigell MG. Psychophysical and electroretinographic findings in X-linked juvenile retinoschisis. *Archives of Ophthalmology* 105[4], 513-516. 1987.
51. Robson AG, Michaelides M, Saihan Z, Bird AC, Webster AR, Moore AT, Fitzke FW, Holder GE. Functional characteristics of patients with retinal dystrophy that manifest abnormal parafoveal annuli of high density fundus autofluorescence; a review and update. *Doc. Ophthalmol.* 116[2], 79-89. 2008.
52. Roesch MT, Ewing CC, Gibson AE, Weber BH. The natural history of X-linked retinoschisis. *Can. J. Ophthalmol.* 33[3], 149-158. 1998.
53. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239[4839], 487-491. 1988.
54. Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, Hutchison CA, Slocombe PM, Smith M. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature.* 265[5596], 687-695. 1977.
55. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 74, 5463-5467. 1977.
56. Sato M, Oshika T, Kaji Y, Nose H. Three novel mutations in the X-linked juvenile retinoschisis (XLR51) gene in 6 Japanese patients, 1 of whom had Turner's syndrome. *Ophthalmic Res.* 35[5], 295-300. 2003.
57. Sauer CG, Gehrig A, Warneke Wittstock R, Marquardt A, Ewing CC, Gibson A, Lorenz B, Jurklics B, Weber BH. Positional cloning of the gene associated with X-linked juvenile retinoschisis. *Nat. Genet.* 17[2], 164-170. 1997.
58. Shi L, Jian K, Ko ML, Trump D, Ko GY. Retinoschisin, a new binding partner for L-type voltage-gated calcium channels in the retina. *Journal of Biological Chemistry* . 2008.
59. Shinoda K, Ishida S, Oguchi Y, Mashima Y. Clinical characteristics of 14 Japanese patients with X-linked juvenile retinoschisis associated with XLR51 mutation. *Ophthalmic Genetics* 21[3], 171-180. 2000.

60. Shukla D, Rajendran A, Gibbs D, Suganthalakshmi B, Zhang K, Sundaresan P. Unusual manifestations of x-linked retinoschisis: clinical profile and diagnostic evaluation. *American Journal of Ophthalmology* 144[3], 419-423. 2007.
61. Sikkink SK, Biswas S, Parry NR, Stanga PE, Trump D. X-linked retinoschisis: an update. *Journal of Medical Genetics* 44[4], 225-232. 2007.
62. Singer M, Berg P. Die Sprache der Gene. 1992. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
63. Sorsby A, Klein M, Gann JH, Siggins G. Unusual retinal detachment, possibly sex-linked. *British Journal of Ophthalmology* 35, 1-10. 1951.
64. Sunnucks P, Wilson AC, Beheregaray LB, Zenger K, French J, Taylor AC. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Mol.Ecol.* 9[11], 1699-1710. 2000.
65. Takada Y, Fariss RN, Muller M, Bush RA, Rushing EJ, Sieving PA. Retinoschisin expression and localization in rodent and human pineal and consequences of mouse RS1 gene knockout. *Molecular Vision* 12: 1108-16., 1108-1116. 2006.
66. Takada Y, Vijayasarathy C, Zeng Y, Kjellström S, Bush RA, Sieving PA. Synaptic pathology in retinoschisis knockout (Rs1<sup>-/-</sup>) mouse retina and modification by rAAV-Rs1 gene delivery. *Invest Ophthalmol Vis.Sci.* 49[8], 3677-3686. 2008.
67. Tantri A, Vrabec TR, Cu-Unjieng A, Frost A, Annesley WH, Jr., Donoso LA. X-linked retinoschisis: a clinical and molecular genetic review. *Surv.Ophthalmol.* 49[2], 214-230. 2004.
68. Tariverdian G, Buslmaier W. Humangenetik. 3. 2004. Heidelberg, Springer.
69. Tsang SH, Vaclavik V, Bird AC, Robson AG, Holder GE. Novel phenotypic and genotypic findings in X-linked retinoschisis. *Archives of Ophthalmology* 125[2], 259-267. 2007.
70. Tuvdendorj D, Isashiki Y, Ohba N, Sonoda S, Izumo S. Two Japanese patients with mutations in the XLRS1 gene. *Retina.* 22[3], 354-357. 2002.
71. Vijayasarathy C, Takada Y, Zeng Y, Bush RA, Sieving PA. Organization and molecular interactions of retinoschisin in photoreceptors. *Advances in Experimental Medical Biology* 613: 291-7., 291-297. 2008.
72. Wabbels B, Demmler A, Paunescu K, Wegscheider E, Preising MN, Lorenz B. Fundus autofluorescence in children and teenagers with hereditary retinal diseases. *Graefes Arch.Clin.Exp.Ophthalmol.* 244[1], 36-45. 2006.
73. Walia S, Fishman GA, Molday RS, Dyka FM, Kumar NM, Ehlinger MA, Stone EM. Relation of Response to Treatment with Dorzolamide in X-Linked Retinoschisis to the Mechanism of Functional Loss in Retinoschisin. *American Journal of Ophthalmology* . 2008.
74. Weber BH, Schrewe H, Molday LL, Gehrig A, White KL, Seeliger MW, Jaissle GB, Friedburg C, Tamm E, Molday RS. Inactivation of the murine X-linked juvenile retinoschisis gene, Rs1h, suggests a role of retinoschisin in retinal cell layer organization and synaptic structure. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99[9], 6222-6227. 2002.
75. Zeng Y, Takada Y, Kjellström S, Hiriyanna K, Tanikawa A, Wawrousek E, Smaoui N, Caruso R, Bush RA, Sieving PA. RS-1 Gene Delivery to an Adult Rs1h Knockout Mouse Model Restores ERG b-Wave with Reversal of the Electronegative Waveform of X-Linked Retinoschisis. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 45[9], 3279-3285. 2004.

## **8. Internetreferenzen**

[www.retinascience.de](http://www.retinascience.de)

[www.pubmed.de](http://www.pubmed.de)

[www.retina-international.org/sci-news/](http://www.retina-international.org/sci-news/)

[www.unboundmedicine.com](http://www.unboundmedicine.com)

[www.wikipedia.de](http://www.wikipedia.de)

[www.biomedexperts.com](http://www.biomedexperts.com)

[www.genetics.org](http://www.genetics.org)

[www.jbc.org](http://www.jbc.org)

[www.genetics.bwh.harvard.edu/pph/index.html](http://www.genetics.bwh.harvard.edu/pph/index.html)

[www.blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html](http://www.blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html)

[http: //grenada.lumc.nl/LOVD2/eye/home.php](http://grenada.lumc.nl/LOVD2/eye/home.php)

## 9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Histologischer Schnitt durch die gesunde perimakuläre humane Netzhaut .....	10
Abbildung 2: Fundusphotographie des rechten Auges: .....	13
Abbildung 3: Schematische Darstellung der 6 Exone des <i>RS1</i> - Gens.....	17
Abbildung 4: Positionierung der eingesetzten Markerloci.....	46
Abbildung 5: Fundusphotografien von Patient 437.01 .....	56
Abbildung 6: Restriktionsverdau mit TaqI im Exon 4.....	57
Abbildung 7: Fundusphotografie von Patient 496.01 .....	58
Abbildung 8: Fundusphotografien von Patient 496.02.....	59
Abbildung 9: Fundusphotografie von Patient 315.01 .....	60
Abbildung 10: Fundusphotografien von Patient 501.01 .....	60
Abbildung 11: Fundusphotografien von Patient 1510.01 .....	61
Abbildung 12: Fundusphotografien von Patient 1332.01 .....	62
Abbildung 13: Fundusphotografien von Patient 1854.01 .....	63
Abbildung 14: Fundusphotografien von Patient 349.01 .....	63
Abbildung 15: Fundusphotografien von Patient 372.01 .....	64
Abbildung 16: Fundusphotografien von Patient 372.05.....	64
Abbildung 17: Fundusphotografien von Patient 1152.01 .....	65
Abbildung 18: Visus bei den betroffenen Männern .....	70
Abbildung 19: Grafische Darstellung der Fundusbeschreibungen der betroffenen Männer .....	72

## 10. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1: Geräte in der Molekularbiologie.....</b>	<b>20</b>
<b>Tabelle 2: Geräte in der Phänotypisierung.....</b>	<b>21</b>
<b>Tabelle 3: Chemikalien .....</b>	<b>23</b>
<b>Tabelle 4: Enzyme .....</b>	<b>24</b>
<b>Tabelle 5: Kits .....</b>	<b>25</b>
<b>Tabelle 6: Puffer und Lösungen .....</b>	<b>26</b>
<b>Tabelle 7: Zusammensetzung eines 8% PAA-Gels .....</b>	<b>28</b>
<b>Tabelle 8: Zusammensetzung von 6% und 10% PAA-Gelen.....</b>	<b>29</b>
<b>Tabelle 9: Mastermix PCR.....</b>	<b>35</b>
<b>Tabelle 10: Programm für PCR.....</b>	<b>36</b>
<b>Tabelle 11: Primersequenzen .....</b>	<b>37</b>
<b>Tabelle 12: Elektrophoresebedingungen für Agarosegele .....</b>	<b>39</b>
<b>Tabelle 13: Elektrophoreseparameter.....</b>	<b>42</b>
<b>Tabelle 14: Daten der eingesetzten Mikrosatelliten.....</b>	<b>46</b>
<b>Tabelle 15: Individuelle Daten der Patienten bzw. betroffenen Verwandten, die eine Mutation aufweisen .....</b>	<b>51</b>
<b>Tabelle 16: Daten der Patienten, bei denen keine Mutation nachgewiesen wurde .....</b>	<b>52</b>
<b>Tabelle 17: In dieser Arbeit identifizierte Mutationen und deren Bewertung bezüglich ihres pathogenen Potenzials .....</b>	<b>54</b>
<b>Tabelle 18: Genotypen der Patienten mit p.P193L Mutation.....</b>	<b>66</b>
<b>Tabelle 19: Positive Ergebnisse bei SSCP im Exon 6 .....</b>	<b>67</b>
<b>Tabelle 20: Übersicht der Indexfälle mit Mutationen .....</b>	<b>68</b>
<b>Tabelle 21: Phänotypische Ergebnisse in Relation zum Alter .....</b>	<b>69</b>
<b>Tabelle 22: Fundusuntersuchungsergebnisse .....</b>	<b>71</b>
<b>Tabelle 23: Identifizierte Mutationen im Bezug zu den klinischen Parametern.</b>	<b>73</b>

## **11. Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre: „Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten 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 Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Wolfartshausen im Februar 2011

Julia Schmeißer

## **12. Danksagung**

In erster Linie möchte ich Frau Prof. Dr. med. Birgit Lorenz danken, die durch die Aufgabenstellung und die Bereitstellung von Materialien und der Labortechnik diese Dissertation möglich gemacht hat.

Ein ganz herzliches Dankschön geht an Herrn Dr. rer. medic. Dipl.-Biol. Markus Preising für die intensive Betreuung bei den Laborarbeiten und Auswertungen von Ergebnissen. Dr. Preising hatte für Fragen immer ein offenes Ohr und stand mir mit Rat und Tat zur Seite.

Außerdem möchte ich den Mitarbeitern des molekulargenetischen Labors der Abteilung für Pädiatrische Ophthalmologie, Strabismologie und Ophthalmogenetik, Regensburg, Dagmar und Renate für deren stete Hilfsbereitschaft und Mitarbeit danken.

Vielen herzlichen Dank auch an Mario, der mir durch Gespräche immer zur Seite stand und mir oft zu neuer Motivation verhalf.

Den größten Dank spreche ich meiner Familie, meiner lieben Mama, meinem Papa, meiner Schwester Doris und meinem Bruder Martin aus, die mich in jeder Lebenssituation unterstützen und mich immer wieder für mein Tun ermutigen und mir neue Kraft geben. Vielen Dank meine Lieben!

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen  
Version der Arbeit entfernt.**

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

