

**Zum genotypischen und phänotypischen Spektrum  
der North-Carolina-Macular-Dystrophy (NCMD)  
bei Sequenzvariationen in *PRDM13* und *IRX1***

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

vorgelegt von Platschek, Marc Torben  
aus Hannover

Gießen 2020

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

Gutachter: PD Dr. Preising  
Gutachter: Prof. Dr. Neubauer  
Tag der Disputation: 19.04.2021

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	ANATOMIE UND FUNKTION DES AUGES	1
1.2	GRUNDLAGEN DER ERBINFORMATION	3
1.2.1	<i>Das Genom</i>	3
1.2.2	<i>Transkription</i>	3
1.2.3	<i>Translation</i>	5
1.2.4	<i>Sequenzvariationen</i>	5
1.3	ÜBERBLICK MAKULÄRER ERKRANKUNGEN	6
1.4	NORTH-CAROLINA-MACULAR-DYSTROPHY (NCMD)	7
1.4.1	<i>Phänotyp</i>	7
1.4.2	<i>Genetische Ursachen der NCMD</i>	8
1.5	ZIELSETZUNG	12
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>13</b>
2.1	DAS PATIENTENKOLLEKTIV	13
2.2	GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN	14
2.2.1	<i>Materialnachweis</i>	14
2.2.2	<i>Stammlösungen</i>	15
2.2.3	<i>Vektoren und Plasmide</i>	16
2.2.4	<i>Wirtszellen</i>	19
2.2.5	<i>Verbrauchsmaterialien</i>	19
2.2.6	<i>Geräteliste</i>	20
2.2.7	<i>Enzyme</i>	21
2.2.8	<i>Primer</i>	22
2.3	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	24
2.3.1	<i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	24
2.3.2	<i>Elektrophoretische Auftrennung in Agarose-Gelelektrophoresen</i>	26
2.3.3	<i>Isolation von Nukleinsäure-Strängen aus einem Agarose-Gel</i>	28
2.3.4	<i>Restriktionsverdau</i>	28
2.3.5	<i>Ligation</i>	29
2.3.6	<i>DNA-Klonierung</i>	30
2.3.7	<i>Isolation von Nukleinsäuren</i>	32
2.3.8	<i>Herstellung eines Glyzerinstocks</i>	33
2.3.9	<i>Sanger-Sequenzierung</i>	33
2.3.10	<i>Transfektion der HEK-293 Zellen</i>	34
2.3.11	<i>One-step Luciferase assay</i>	35
2.4	PHÄNOTYPISCHE UNTERSUCHUNGSMETHODEN	36

2.4.1	<i>Visus</i> .....	36
2.4.2	<i>Fundusphotographie</i> .....	36
2.4.3	<i>Fundusautofluoreszenzaufzeichnung</i> .....	36
2.4.4	<i>Optische Kohärenztomographie (OCT)</i> .....	37
2.4.5	<i>Elektroretinogramm (ERG)</i> .....	39
2.4.6	<i>Farbsehtauglichkeitsprüfung</i> .....	39
2.4.7	<i>Gesichtsfeldanalyse</i> .....	39
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>41</b>
3.1	AUSWAHL DES PATIENTENKOLLEKTIVS .....	41
3.2	GENOTYPISIERUNG VON PATIENTEN AUF SEQUENZVERÄNDERUNGEN IN <i>PRDM13</i> UND <i>IRX1</i> .....	42
3.2.1	<i>Sequenzvarianten in der Promotor-Kontroll-Region von PRDM13</i> .....	42
3.2.2	<i>Copy Number Variations (CNV) in PRDM13 und IRX1</i> .....	44
3.2.3	<i>Untersuchung der Wirkung der Sequenzvariationen der Promotor-Kontroll-Region auf die Genexpression des PRDM13-Gens</i> .....	47
3.3	ERGEBNISSE DER PHÄNOTYPISIERUNG.....	57
3.3.1	<i>Fundusphotographie</i> .....	59
3.3.2	<i>Fundusautofluoreszenzaufzeichnung (FAF)</i> .....	59
3.3.3	<i>Optische Kohärenztomographie (SD-OCT)</i> .....	61
3.3.4	<i>DiOCTA – Auswertung</i> .....	63
3.3.5	<i>Elektroretinogramm (ERG)</i> .....	69
3.3.6	<i>Farbsehtauglichkeitsprüfung</i> .....	69
3.3.7	<i>Perimetrie nach Goldmann</i> .....	69
3.3.8	<i>Untersuchung der Progression bei NCMD</i> .....	71
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>72</b>
4.1	BEWERTUNG DES PATIENTENKOLLEKTIVS .....	72
4.2	BEWERTUNG DER GENOTYPISIERUNGEN IN <i>PRDM13</i> .....	73
4.3	BEWERTUNG DES LUCIFERASE-ASSAYS.....	74
4.4	BEWERTUNG DER COPY-NUMBER-VARIATIONS (CNV) IN <i>PRDM13</i> UND <i>IRX1</i> .....	76
4.5	UNTERSCHIEDE UND GEMEINSAMKEITEN DER PHÄNOTYPISIERUNG.....	77
4.6	BEWERTUNG DES <i>PRDM13</i> -GENS IM ZUSAMMENHANG MIT NCMD .....	81
4.7	AUSBlick .....	83
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>84</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>85</b>
<b>7</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>86</b>
<b>8</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>87</b>
<b>9</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>88</b>

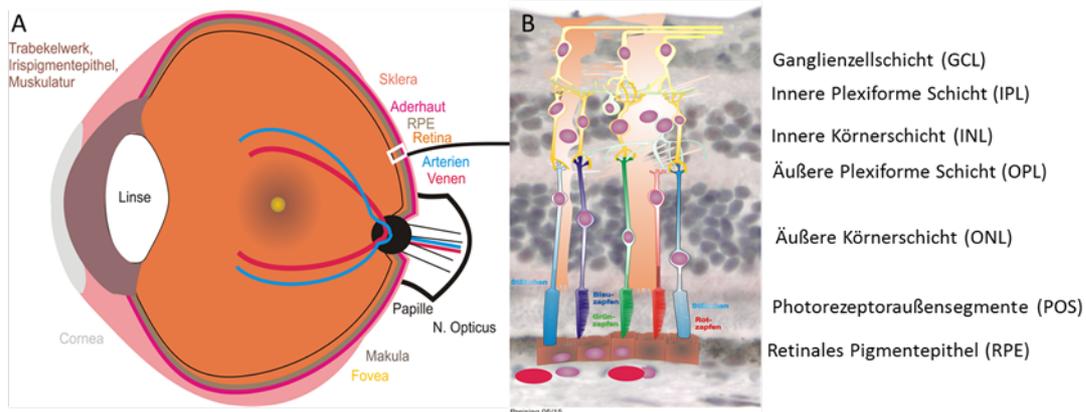
## Inhaltsverzeichnis

<b>10</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>90</b>
<b>11</b>	<b>PUBLIKATIONSVERZEICHNIS.....</b>	<b>100</b>
<b>12</b>	<b>EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG.....</b>	<b>101</b>
<b>13</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>102</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Anatomie und Funktion des Auges

Das Auge ist das bevorzugte Sinnesorgan des Menschen [39]. Es registriert mehr als 80% der Sinneseindrücke des Menschen [100].



**Abbildung 1-1: Aufbau des menschlichen Auges und der Netzhaut.**

A) zeigt den anatomischen Aufbau des menschlichen Auges. B) skizziert eine schematisierte Darstellung der Netzhaut. RPE: Retinales Pigmentepithel; POS: Photorezeptoraußensegmente; ONL: Äußere Körnerschicht; OPL: Äußere Plexiforme Schicht; INL: Innere Körnerschicht; IPL: Innere Plexiforme Schicht; GCL: Ganglienzellschicht. (Mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. Markus Preising)

Die äußere Hülle des Auges wird von der weißlichen Lederhaut (Sklera) und der Hornhaut (Cornea) gebildet. Die darunterliegende Aderhaut (Choroidea) ist besonders reich vaskularisiert und versorgt zum Teil die innerste Schicht des Auges, die Netzhaut (Retina). In der Netzhaut werden die visuellen Informationen in Nervenimpulse umgesetzt [27, 39].

Prinzipiell handelt es sich bei der Netzhaut um eine Ausstülpung des Gehirns [123]. Sie ist mehrschichtig aufgebaut und besitzt etwa 127 Mio. Photorezeptoren für die Lichtwahrnehmung. Innerhalb der Photorezeptoren unterscheidet man zwischen den Zapfen und Stäbchen. Zapfen sind hauptsächlich im Zentrum der Netzhaut, in der Makula lokalisiert. Sie sind vor allem für das Tagsehen und für die Farbwahrnehmung verantwortlich. Stäbchen sind überwiegend in der Peripherie vorzufinden und

ermöglichen das Dämmerungs- und Bewegungssehen. Im Bereich der Fovea, dem Zentrum der Makula, befindet sich die höchste Dichte an Zapfen und somit der Ort des schärfsten Sehens [34, 39].

Hinsichtlich des Aufbaus der Netzhaut werden die inneren Schichten als neurosensorische Netzhaut und die äußerste Schicht als retinales Pigmentepithel (RPE) bezeichnet [39]. Zwischen der Choroidea und der RPE-Schicht befindet sich die Bruchsche Membran, die eine wichtige Funktion in der Gefäßversorgung und der Regulation des Molekülflusses besitzt [10]. Nach innen angrenzend folgen an das RPE die Außen- und Innensegmente der Photorezeptoren (POS, PIS). Hier entsteht nach einem Lichtreiz ein Nervenimpuls zu Beginn der Sehnehmung. Die sich an die Außen- und Innensegmente der Photorezeptoren anschließende Schicht wird Membrana limitans externa genannt. Sie besteht aus den Fortsätzen der Müller-Gliazellen. Die Fortsätze trennen die Zellkörper der Photorezeptoren von ihren Innensegmenten. An die Membrana limitans externa schließt sich die äußere Körnerschicht (ONL) mit den Zellkernen der Photorezeptoren und daran die äußere plexiforme Schicht (OPL) mit den Synapsen der Photorezeptoren auf die Bipolarzellen an. Hier werden die Nervenimpulse der Photorezeptoren an die Bipolarzellen übergeben, deren Zellkerne zusammen mit den Amakrinen Zellen und Horizontalzellen in der inneren Körnerschicht (INL) liegen. An den Bipolarzellen erfolgt bereits eine Vorauswertung der Nervenimpulse. Das verschaltete Signal der Bipolarzellen wird nun an die Dendriten der Ganglienzelle in der inneren plexiformen Schicht (IPL) weitergegeben [39, 100]. Die Amakrinen Zellen modulieren die Verschaltung zwischen den Bipolar- und Ganglienzellen. Hierfür stehen die Amakrinen Zellen einerseits mit den Axonen der Bipolarzellen, andererseits mit den Dendriten der Ganglienzellen in Kontakt [11]. Es existieren zahlreiche Subtypen von Amakrinen Zellen, von denen die Mehrheit kein definiertes Axon besitzen. Sie kommunizieren ihre ein- und ausgehende Signale über ausgeprägte Dendritenbäume [74]. Funktionell wird den Amakrinen Zellen ein hemmender Effekt der visuellen Verschaltung zugesprochen [7, 75, 23]. Die Zellleiber der Ganglienzellen befinden sich in der Ganglienzellschicht (GCL). Ihre Axone verlaufen unterhalb der Netzhautoberfläche als Nervenfaserschicht (NFL) und bilden den zweiten Hirnnerv (N. opticus). Die Ganglienzellen stellen gleichzeitig das erste Neuron der Sehbahn dar. Zuletzt grenzt noch die Membrana limitans interna an, die wiederum mithilfe der Fortsätze der Müller-Gliazellen die Nervenfaserschicht von der Netzhautoberfläche abgrenzt [39, 100].

### 1.2 Grundlagen der Erbinformation

#### 1.2.1 Das Genom

Unter dem Begriff Genom wird die Gesamtheit der genetischen Informationen eines Virus, einer Bakterienzelle oder einer eukaryotischen Zelle zusammengefasst. Hierbei unterscheidet sich das Genom einer menschlichen, eukaryotischen Zelle bezüglich seiner Größe deutlich von einer bakteriellen, prokaryotischen Zelle [38].

Das im Zytoplasma befindliche Genom einer prokaryotischen Zelle besteht aus einem ringförmigen und meist doppelsträngigen DNA-Molekül [30]. Darüber hinaus existieren bei einigen Bakterien unabhängige DNA-Fragmente, die als Plasmide bezeichnet werden. Diese Plasmide sind übertragbar und können Gene exprimieren, die der bakteriellen Zelle zusätzliche Eigenschaften verschaffen [33].

Im Gegensatz dazu ist das Erbgut einer eukaryotischen Zelle innerhalb eines Zellkerns lokalisiert und in Form einer strangförmigen DNA-Doppelhelix gespeichert. Während des Replikationsvorgangs kondensiert die menschliche DNA auf insgesamt 46 Chromosomen [94]. Bei diesem Vorgang sind zahlreiche Hilfsproteinen wie Histone beteiligt [93].

Strukturell betrachtet, besteht die DNA aus zwei komplementären Einzelsträngen, deren Bausteine die vier Basen Adenin, Thymin, Cytosin und Guanin sind. Ihre variable Basenabfolge innerhalb eines DNA-Stranges enthält das genetische Erbgut und somit sämtliche Informationen zur Herstellung aller Genprodukte [94]. Zum Zweck der Herstellung der Genprodukte werden bestimmte Bereiche der DNA in Form einer Transkription abgeschrieben, welche im anschließenden Abschnitt erläutert wird [2].

#### 1.2.2 Transkription

Das Ziel der Transkription ist die Herstellung der mRNA, die die genetische Information der DNA für den zytoplasmatisch gelegenen Proteinsyntheseapparat zugänglich macht. RNA unterscheidet sich hierbei in drei wichtigen Gesichtspunkten von der DNA: Erstens enthält sie Ribose anstelle von Desoxyribose, zweitens ist sie einzelsträngig und drittens wird Uracil statt Thymin in ihrer Basensequenz verwendet [2].

Im Zellkern von Eukaryoten sind drei verschiedene RNA-Polymerasen bekannt, von denen die RNA-Polymerase-II die RNA-Kopie herstellt. Innerhalb eines Gens befindet sich etwa 30 Nukleotide vor dem kodierenden Abschnitt (Transkriptionsstart) eine

spezifische DNA-Sequenz, der Promotor [66]. An diese Promotor-Sequenz binden regulatorische Proteine, Transkriptionsfaktoren, welche die Transkription aktivieren (*Gene-enhancing*) oder reprimieren (*Gene-silencing*) können. Erst mithilfe von Transkriptionsfaktoren kann die RNA-Polymerase-II an die Promotorsequenz binden und eine komplementäre RNA in 5'-3' Richtung synthetisieren [38]. Aufgrund ihrer Struktur können Transkriptionsfaktoren in verschiedene Gruppen klassifiziert werden. Hierzu zählen die Helix-Turn-Helix-Proteine, die Zinkfinger-Proteine, die Homöodomänen-Proteine, die Leucin-Zipper-Proteine sowie die Helix-Loop-Helix-Proteine [76, 136].

Darüber hinaus existieren weitere regulatorische Elemente, die den Promotor bezüglich seiner Aktivität beeinflussen können [124]. Regulatorische Elemente werden als Promotor-Kontroll-Regionen (PKR) bezeichnet, die zwischen 200 - 1500 bp umfassen und bis zu 1000 kb vor oder hinter einem Gen lokalisiert sind [104]. Je nachdem, ob sie den Promotor in seiner Aktivität verstärken oder abschwächen, werden die PKR als Enhancer bzw. Silencer bezeichnet [65]. In Abhängigkeit von der Komplexität eines Gens, können mehrere PKR Einfluss auf denselben Promotor nehmen [104]. Zusätzlich gibt es PKR, die in der Lage sind mehrere Gene gleichzeitig zu regulieren [124].

Kontroll-Regionen und Promotoren kommunizieren miteinander über chromosomale Loops [124]. Diese großen Schleifen entstehen durch Wechselwirkungen von Bindungsproteinen, die eine Konformationsänderung der DNA erzeugen. Erst durch die räumliche Annäherung zwischen Transkriptionsfaktor und dem zugehörigen Promotor, kann deren modulierender Effekt in Kraft treten [38]. Dabei gilt, je größer die Distanz zwischen der Kontrollsequenz und dem Promotor, desto komplexer ist der Organismus insgesamt in seinem Aufbau [124].

Nach der Transkription wird die RNA-Kopie als hnRNA (heteronukleäre RNA) bezeichnet. Dieser RNA-Einzelstrang wird noch innerhalb des Zellkerns umfangreich modifiziert, um letztendlich als fertige mRNA (*messenger RNA*) in das Zytoplasma eingeschleust zu werden.

Zum Schutz der RNA-Enden werden am 5'-Ende eine Kappenstruktur aus 7-Methyl-Guanosin und am 3'-Ende ein Poly-AMP-Schwanz angehängt [105]. Nicht kodierende Abschnitte (Introns) der hnRNA, die nicht relevant für die spätere Proteinsynthese sind, werden in einem Spleißvorgang (*Splicing*) herausgeschnitten. Hierfür wird ein Spleißosom ausgebildet, welches sich aus snRNPs, snRNA und Proteinen zusammensetzt. Unter Ausbildung einer Intron-Lasso-Struktur mithilfe zweier Umesterungsreaktionen und einer 2'-5'-Phosphodiesterbrücke, können die Introns aus

der hnRNA entfernt werden [94]. Die verbliebenen Abschnitte (Exons) werden wieder zusammengefügt und stellen die fertige mRNA dar. Bei dem alternativen Splicing werden zusätzlich zu den Introns auch Exons oder nur Teile der Introns herausgeschnitten, sodass aus einem einzigen Gen auch verschiedene Proteine gebildet werden können [128].

### 1.2.3 Translation

Die spezifische Nukleotidsequenz der mRNA wird während der Translation für die Proteinbiosynthese verwendet und in eine Abfolge unterschiedlicher Aminosäuren übersetzt [130]. Für die Initiation trägt die mRNA am 5'-Ende eine 7-Methyl-Guanosin-Kopfgruppe als Erkennungssignal für die kleine ribosomale Untereinheit. Diese wandert ausgehend vom 5'-Ende bis zum ersten Codon, dem Startcodon der mRNA, welches sich aus dem Basentriplett AUG (Adenin, Uracyl, Guanin) zusammensetzt [5]. Mit dem Startcodon wird das Leseraster der Translation festgelegt und die Aminosäurekette initiiert. Jeweils drei Nukleotide bilden ein Basentriplett (Codon), das über das komplementäre Anticodon der tRNA für eine spezifische Aminosäure kodiert. Terminiert wird die Elongation der Aminosäurekette durch eines der drei Stoppcodons UAG, UAA oder UGA [130].

Man spricht davon, dass der Code degeneriert ist. Das bedeutet, dass verschiedene Basentriplets für die gleiche Aminosäure kodieren, die sich meistens nur in der dritten Base (Wobble-Base) unterscheiden. Nach der Wobble-Hypothese ist die Komplementarität der dritten Base eines Triplets nicht zwingend erforderlich für die Komplexbildung des Codons mit seinem Anticodon [38].

### 1.2.4 Sequenzvariationen

Sequenzvariationen sind Veränderungen des genetischen Materials (DNA) und können in verschiedene Mutationsklassen unterteilt werden. Punktmutationen sind Folge einer Substitution, Deletion oder Insertion einzelner Basenpositionen und können zu Funktionsveränderungen oder -verlusten eines Gens führen [40]. Strukturelle Anomalien betreffen dabei einen längeren DNA-Abschnitt und können mit einer Deletion oder Insertion (z.B. Duplikation) ganzer Genabschnitte einhergehen [105]. Duplikationen werden auch als Copy-Number-Variation (CNV) bezeichnet [120].

Besteht eine Sequenzvariation innerhalb eines proteinkodierenden Abschnitts, so kann eine Verschiebung des Leserasters (*Frameshift-Mutation*), ein Abbruch der Transkription durch ein Stoppcodon (*Nonsense-Mutation*) oder eine Veränderung der Proteinsequenz (*Missense-Mutation*) auftreten [105]. Liegen Sequenzvariationen in den regulatorischen Bereichen eines Gens, also in den Promotor- oder Promotor-Kontroll-Regionen, kann die Steuerung der Genexpression beeinflusst werden [111, 38].

Nicht jede *Missense-Mutation* führt zwingend zu einer gestörten Proteinbiosynthese. Wie bei der Translation erwähnt, kann eine Aminosäure durch mehrere Tripletts codiert werden. Ein SNP im Bereich der Wobble-Base eines Tripletts führt zu keiner Veränderung des Aminosäureeinbaus und wird als stille Mutation bezeichnet [38]. Sequenzvariationen tragen so zur genetischen Variabilität bei. Sie können aber auch zu erheblichen Erbkrankheiten führen [94].

### 1.3 Überblick makulärer Erkrankungen

In der Ophthalmologie liegt eine Vielzahl an Erkrankungen vor, deren Auslöser pathologische Prozesse der makulären Region sind. Eine Unterscheidung der verschiedenen Erkrankungen erfolgt anhand ihrer phänotypischen Erscheinungsform bzw. aufgrund ihrer genotypischen Ursache. In dem nachfolgenden Abschnitt werden zunächst makuläre, differentialdiagnostische Erkrankungen kurz vorgestellt, die einen ähnlichen Phänotyp zu der in dieser Arbeit untersuchten North-Carolina-Macular-Dystrophy (NCMD) besitzen.

Makulaerkrankungen, wie die Zapfen-Stäbchen-Dystrophie (CRD), sind oftmals hereditären Ursprungs [78]. Jene CRD gehört zur Gruppe der hereditären Netzhauterkrankungen, die den Verlust der Photorezeptorschicht und des retinalen Pigmentepithels (RPE) umfasst [46]. Es kommt primär zu einer Schädigung der Zapfen und erst sekundär zu einem Untergang der Stäbchen [47]. Da die Zapfen bevorzugt in der Makula, dem Ort des Sehzentrums, vorzufinden sind, führt eine *CRD* zu einer Verschlechterung der Sehschärfe (*Visus*) [91]. Funktionell ist daher bei einer *CRD* die Farbwahrnehmung gestört und zusätzlich das Gesichtsfeld eingeschränkt [57]. Die Symptome, die im Verlauf eine Progression aufweisen, treten bereits innerhalb der ersten Lebensdekade auf [85]. In der Literatur werden *ABCA4*, *CRX*, *GUCY2D* und *RPGR* als häufige ursächliche Gene der *CRD* beschrieben [27].

Die autosomal-dominant vererbte Central-Areolar-Choroidal-Dystrophy (CACD) führt nicht nur zu einer Atrophie des retinalen Pigmentepithels (RPE), sondern schädigt auch die darunterliegende Choroidea [84]. Typischerweise manifestieren sich Pigmentveränderungen zunächst parafoveal und entwickeln sich erst später in das Zentrum der Makula hinein [109]. Aufnahmen des Augenhintergrunds zeigen, dass choroidale Gefäße gelb-weißlich durch den fovealen Defekt hindurch schimmern, während die periphere Netzhaut davon unbetroffen scheint [57]. Zudem werden zentrale Gesichtsfeldausfälle (Skotome) und abnormale Farbwahrnehmungen beobachtet [63, 60]. Betroffene Patienten werden zwischen der dritten und vierten Lebensdekade symptomatisch und entwickeln sich im weiteren Verlauf fort [97]. Als verantwortliches Gen wurde das *PRPH2* nachgewiesen [33].

Mit zunehmenden Alter, vorwiegend ab der sechsten Lebensdekade, können Patienten eine altersbedingte-Makuladegeneration (AMD) entwickeln, die zu einem progredienten Verlust der Sehschärfe führt [77, 69]. Diese Erkrankung wird in eine trockene und feuchte Form unterteilt [15]. Jene trockene Form beginnt mit der Ablagerung (Drusen) von Stoffwechselendprodukten unterhalb des RPE in der Fovea [12]. Im weiteren Verlauf wird die Durchblutung der Choroidea gestört und das RPE beginnt zu degenerieren [9].

In den nächsten Kapiteln wird, basierend auf der vorliegenden Literatur, die in dieser Arbeit untersuchte North-Carolina-Macular-Dystrophy (NCMD) zunächst phänotypisch und anschließend genotypisch vorgestellt.

## **1.4 North-Carolina-Macular-Dystrophy (NCMD)**

### **1.4.1 Phänotyp**

Es handelt sich bei der North-Carolina-Macular-Dystrophy (NCMD) um eine seltene und autosomal-dominant vererbte Erkrankung der Makula, der zentralen Struktur der Netzhaut [22]. Erstmalig wurde die NCMD im Jahre 1971 bei einer Familie im nordamerikanischen Bundesstaat North-Carolina phänotypisch beschrieben. In dieser Studie wurden insgesamt 70 Familienmitglieder untersucht, von denen 25 eine gut abzugrenzende Makuladegeneration in beiden Augen zeigten. Morphologisch wurden innerhalb einer Familie verschiedene Ausprägungen von makulären Läsionen festgestellt, die sich bereits im frühen Alter manifestierten. In weniger stark ausgeprägten Fällen zeigte sich eine Pigmentierung innerhalb der Makula, wohingegen sich in

schwerwiegenderen Fällen eine Vernarbung abzeichnete. Als Besonderheit fiel in dieser Studie auf, dass die Patienten normwertige Visuswerte vorwiesen, obwohl die Makula Degenerationen zeigte [68]. Basierend auf den vorgenannten Veröffentlichungen wurde im Jahre 1974 dieselbe Familie weiter untersucht und die Erkrankung zunächst als „dominant-progressive-foveale-Dystrophie“ bezeichnet [32]. In dieser Studie wurde die NCMD erstmalig in drei Grade klassifiziert. Der erste Grad beinhaltet einzelne, feinerstreuete Drusen und Pigmentierungen, begrenzt in der fovealen Region. Im zweiten Grad sind die Drusen nicht einzeln vorzufinden, sondern fließen bzw. konfluieren im Bereich der Makula. Der dritte Grad ist gekennzeichnet durch choroidale Atrophien, makuläre Vernarbungen und retinale Drusen, die nun auch bis in die Peripherie ausstrahlen [32, 106, 110, 115]. Im Jahre 1984 erschien eine Studie, die Familien mit einer NCMD nicht nur morphologisch, sondern auch funktionell näher untersuchte. Sowohl die Elektrophysiologie, als auch die Farbwahrnehmung und Dunkeladaptation wurden bei Patienten mit einer NCMD als normwertig eingestuft [51]. Mehrere Veröffentlichungen bestätigen, dass die retinalen Funktionen trotz der makulären Degenerationen nur in schweren Fällen reduziert sind [51, 4, 61, 79, 62, 98]. In einer detaillierten Studie im Jahre 1991 wurden die Familienmitglieder mit einer NCMD aus vorherigen Berichten über einen Zeitraum von zehn Jahren begleitet und phänotypisch ausgewertet. Als Ergebnis dieser Studie konnte im Unterschied zu Annahmen vorheriger Untersuchungen keine Progression der NCMD festgestellt werden [115]. Unterstützend belegen neuere Studien aus dem Jahre 2016 und 2017, dass sich die seltene NCMD bereits zum Zeitpunkt der Geburt manifestiert und nicht-progressiv verläuft [7, 13].

### 1.4.2 Genetische Ursachen der NCMD

Bei der NCMD handelt es sich um eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung, die eine vollständige Penetranz aufweist [22, 61]. Erstmals wurde 1992 von einer Kopplung der NCMD mit einem Locus auf dem Chromosombereich 6q13-q16 (*MCDR1*) berichtet [113, 114]. In diesem Bereich befindet sich das *PRDM13*-Gen inklusive seiner Promotor-Kontroll-Region (PKR), für welche später Sequenzvariationen als mögliche Ursache einer NCMD beschrieben wurden [7]. Im Jahre 2003 wurde von einer weiteren Kopplung der NCMD berichtet, welche sich auf einem Locus im Chromosombereich 5q13-q15 (*MCDR3*) befindet [79]. Dieser Chromosomenabschnitt enthält das *IRX1*-Gen [22].

Im Jahre 2016 wurde erstmalig eine detaillierte Genomanalyse im *MCDR1*-Locus und im *MCDR3*-Locus bei Patientenfamilien mit einer NCMD durchgeführt. In dieser Studie

wurden im *MCDR1*-Locus drei verschiedene Sequenzvarianten (Substitutionen) in der Promotor-Kontroll-Region des *PRDM13*-Gens (V1-V3) detektiert. Am häufigsten trat die Sequenzvariante V1 (g.6:100040906 G>T) auf, die bei sechs Familien aus dem nordamerikanischen Bundesstaat North-Carolina nachgewiesen wurde. Drei weitere Familien wiesen die Sequenzvariante V2 (g.6:100040987 G>C) auf. Dabei sind die Herkunftsorte von zwei Familien der V2 nicht bekannt, die dritte Familie stammt aus Frankreich. Die Sequenzvariante V3 (g.6:100041040 C>T) wurde in einer weiteren Familie entdeckt, über deren Herkunftsort keine Angabe gemacht wurde [111].

Es wurde zudem eine Sequenzvariation V4 im Sinne einer CNV (g.6:100020205-100143306) inklusive des gesamten *PRDM13*-Gens und seiner PKR festgestellt. Die Patienten stammen aus einer Familie aus dem mittelamerikanischen Belize [111]. Analog zum *PRDM13*-Gen wurde in derselben Studie eine weitere CNV V5 (g.5:3587901-4486027) entdeckt, welche sich im *MCDR3*-Locus befindet und das *IRX1*-Gen enthält. Diese Patientenfamilie stammte aus Dänemark. Sequenzvarianten in Form von einzelnen Substitutionen sind im *MCDR3*-Locus nicht beschrieben worden [22, 111].

In einer zweiten Studie im Jahre 2016 wurde in einer amerikanischen Patientenfamilie mit einer NCMD eine neuartige CNV V6 (g.6:99996220-100065140) im *MCDR1*-Locus vorgefunden. Im Unterschied zu der CNV V4 enthält diese Sequenzvariante nicht nur das *PRDM13*-Gen, sondern dazu noch große Anteile des vorgeschalteten *CCNC*-Gens [13].

Basierend auf den vorherigen Publikationen wurde im Juni 2017 berichtet, dass die Sequenzvariante V1 in sieben und die Sequenzvariante V2 in fünf weiteren Patientenfamilien detektiert werden konnten [112].

Im August 2017 erschien eine Studie, in der bei zwei französischen Patientenfamilien mit einer NCMD eine neue CNV V7 (g.6:99984309-100082698) im *MCDR1*-Locus festgestellt wurde. Im Unterschied zu den CNV V4 und V6 liegt sowohl das gesamte *PRDM13*-Gen als auch das gesamte *CCNC*-Gen dupliziert vor [72].

**Tabelle 1-1: Überblick Sequenzvarianten in *MCDR1* und *MCDR3* [111, 72, 13, 112]**

Variante	Familien	Herkunft	Chromosomale Position	Sequenzvariante	Referenzen
V1	13x	Nordamerika	g.6:100040906 ( <i>PKR- PRDM13</i> )	Subs.: G>T	[111, 112]
V2	8x	Frankreich	g.6:100040987 ( <i>PKR- PRDM13</i> )	Subs.: G>C	[111, 112]
V3	1x	kA	g.6:100041040 ( <i>PKR- PRDM13</i> )	Subs.: C>T	[111]
V4	1x	Mittelamerika	g.6:100020205- 100143306 ( <i>PRDM13</i> )	CNV	[111]
V5	1x	Dänemark	g.5:3587901-4486027 ( <i>IRX</i> )	CNV	[111]
V6	1x	Nordamerika	g.6:99996220- 100065140 ( <i>PRDM13/CCNV<sub>Anteile</sub></i> )	CNV	[13]
V7	2x	Frankreich	g.6:99984309- 100082698 ( <i>PRDM13 / CCNV</i> )	CNV	[72]

Legende:

kA = keine Angabe, Subs. = Substitution, CNV = Copy-Number-Variation, PKR = Promotor-Kontroll-Region

### 1.4.2.1 *PRDM13*-Gen

Das *PRDM13*-Gen ist auf dem Chromosom 6 im Genlocus *MCDR1* lokalisiert. Sein Genprodukt PRDM13 gehört zur Familie der Zinkfingerproteine [37, 81]. Es handelt sich bei PRDM13 folglich um einen Transkriptionsfaktor. Zinkfingerproteine zeichnen sich durch eine Zinkfingerdomäne aus, welche Zinkionen koordinativ an den Transkriptionsfaktor binden [95]. Durch den Einbau der Zinkionen entsteht eine schleifenförmige Struktur, wodurch das Protein spezifisch mit der DNA interagieren und die Transkription eines Gens modulieren kann [31].

PRDM13 trägt maßgeblich zur Kontrolle und Regulation von diversen Genen während der embryonalen Entwicklung bei [131, 18]. So reguliert PRDM13 im Bereich des somatosensiblen Rückenmarks, des Kleinhirns und auch der Netzhaut die Balance zwischen inhibitorisch und exzitatorisch wirksamen Neuronen. Durch den Einfluss von PRDM13 wird die Zelldifferenzierung von glutamatergen, exzitatorischen Neuronen gehemmt, während die GABAnergen, inhibitorischen Neurone in ihrer Zelldifferenzierung gefördert werden [48]. *PRDM13* ist das einzige Gen im *MCDR1* Locus, welches in der neuronalen Netzhaut exprimiert wird [111, 131]. Während sich pluripotente Stammzellen zu retinalen Nervenzellen differenzieren, wird das Transkript von *PRDM13* üblicherweise herunterreguliert [13]. Es wird daher von einer negativen Assoziation mit der retinalen Entwicklung berichtet [111, 131]. Mehrere Studien belegen, dass *PRDM13* in retinalen Vorläuferzellen und auch in sich entwickelnden und ausgereiften Amakrinen Zellen der Netzhaut exprimiert wird [7, 37, 129]. Unter den ausgereiften Amakrinen Zellen wird PRDM13 in spezifischen Subtypen vorgefunden. Es handelt sich dabei vorwiegend um glycerinerge Amakrinen Zellen [7, 37].

### 1.4.2.2 *IRX1*-Gen

Das *IRX1*-Gen befindet sich auf Chromosom 5 im Genlocus *MCDR3* und gehört zur Familie der Iroquois-Gene. Diese Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren mit Homeodomänen [21]. Die Homeodomäne ermöglicht den Transkriptionsfaktoren die Bindung an die DNA und die Organisation verschiedenster Gewebesystemen während der embryonalen Entwicklung. So nimmt das IRX1-Protein Einfluss auf die Zellapoptose des interdigitalen Gewebes und auf Wachstumsfaktoren wie FGF und TGF $\beta$  [25]. Andererseits scheint die *IRX*-Familie bei der Regulation der Genexpression in der Retinogenese und Entwicklung der Makula eine besondere Rolle einzunehmen [47].

Studien zeigten, dass *IRX1* während der Retinogenese von retinalen Ganglienzellen exprimiert wird und zur Hochregulation von Sonic Hedgehog Proteinen führen [20, 21]. Hedgehog Proteine bilden wichtige Signaltransduktionswege während der embryonalen Entwicklung [14].

Abseits der Embryogenese gilt das *IRX1* als Tumorsuppressorfaktor bei Magenkarzinomen und wird mit Rheuma in Zusammenhang gebracht [58, 44].

### 1.5 Zielsetzung

Zunächst konnte die Diagnose einer North-Carolina-Macular-Dystrophy (NCMD) nur klinisch anhand des Phänotyps gesichert werden. In der Literatur wurden inzwischen sieben verschiedene Sequenzvariationen im *PRDM13*- und *IRX1*-Gen mit dem Phänotyp einer NCMD korreliert [111, 72, 13, 112].

In dieser Arbeit sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Sind die in der Literatur genannten Sequenzvariationen auch bei Patienten der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Justus-Liebig-Universität in Gießen mit NCMD-artigem Phänotyp vorzufinden?
- Können darüber hinaus weitere ursächliche Sequenzvariationen nachgewiesen werden?
- Wie wirken sich die genetischen Veränderungen auf die Funktion des Genproduktes aus?
- Was charakterisiert die Patienten mit Nachweis einer *PRDM13*-Sequenzvariation phänotypisch?

Für die Phänotypisierung der Patienten wurden die klinischen Daten retrospektiv erfasst und ausgewertet. Da die NCMD als eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung beschrieben wurde, schloss sich bei Nachweis einer Sequenzvariation im Indexpatienten soweit verfügbar eine Segregationskontrolle mit Verwandten an. Für die Untersuchung der Funktion der Sequenzvariationen wurde ein Luciferase-Reporterassay etabliert. Die genotypischen und phänotypischen Daten wurden im Anschluss miteinander abgeglichen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Das Patientenkollektiv

Für diese Studie wurden aus der Probandendatenbank des Labors für Molekulare Ophthalmologie der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen geeignete Kandidaten ausgewählt. Zur Eingrenzung des Patientenkollektivs wurde ein Vorscreening mit den Eingangsdagnosen Zapfendystrophie (COD), Zapfen-Stäbchen-Dystrophie (CRD), Central-Areolar-Choroidal-Dystrophy (CACD), Makuladegeneration (MD) und North Carolina Macular Dystrophy (NCMD) durchgeführt.

Die Patienten wurden zuvor gemäß der Deklaration von Helsinki im Vorfeld aufgeklärt und deren Einverständnis eingeholt. Des Weiteren wurde die Studie von der Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen befürwortet (Ethikantrag 149/07).

In der Vorauswahl wurden 241 Patienten aufgrund der klinischen Diagnose ausgewählt und miteinander verglichen. Zu den Kriterien zählten zunächst das Vorhandensein einer makulären Narbe mit fovealen Drusen-ähnlichen Einlagerungen. Es wurde speziell auf Pigmentveränderungen oder Atrophien des retinalen Pigmentepithels Wert gelegt.

## 2.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

### 2.2.1 Materialnachweis

Tabelle 2-1: Chemikalien

Material	Artikelnummer	Hersteller
dATP (100 mmol)	N0440S	New England BioLabs, Frankfurt
dCTP (100 mmol)	N0441S	New England BioLabs, Frankfurt
dGTP (100 mmol)	N0442S	New England BioLabs, Frankfurt
dTTP (100 mmol)	N0443S	New England BioLabs, Frankfurt
MgCl <sub>2</sub>	A351H	Promega GmbH, Mannheim
DMSO	F-515	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Gel-Ladepuffer	RO611	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Agarose LE	M3044.0500	Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm
TRIS-Puffer	U885.2	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Borsäure	1.001.655.000	Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn
EDTA-Na <sub>2</sub> *2 H <sub>2</sub> O p.a.	8043.2	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Gel-Red	M3199.1010	Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm
SERVA DNA Stain Clear G	39804.01	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	SM0321	MBI Fermentas, St. Leon Rot
GeneRule 1kb DNA Ladder	SM0311	MBI Fermentas, St. Leon Rot
Nucleospin Gel PCR Clean up:	740.609.250	Macherey-Nagel, Düren
Miniprep-Plasmid-DNA- Purification-Kit	740588.10	Macherey Nagel, Düren
ZymoPURE II Plasmid Midiprep	D4200 & D4201	Zymo Research Europe GmbH, Freiburg im Breisgau

Luria Broth (LB)	12795-027	Invitrogen, Darmstadt
Select Agar	30391-023	Invitrogen, Darmstadt
Ampicillin	K029.1	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Soc Medium	15544-034	Invitrogen, Darmstadt
Salt Solution 1.2 M NaCl 0,06M MgCl <sub>2</sub>	1839768	Invitrogen, Darmstadt
Ethanol (absolut)	8006	J.T.Baker, Schwerte
Accutase	AC-EZ-0001	Anprotec, Bruckberg

## 2.2.2 Stammlösungen

**Tabelle 2-2: Stammlösungen**

<b>Ansatz</b>	<b>Art</b>	<b>Menge</b>
0,125 mM dNTP-Lösung	100 mM dATP	12,5 µl
	100 mM dCTP	12,5 µl
	100 mM dGTP	12,5 µl
	100 mM dTTP	12,5 µl
	ddH <sub>2</sub> O	950 µl
10x TBE-Puffer	1M Tris	121,1 g/l
	0,83M Borsäure	51,36 g/l
	10mM EDTA 2H <sub>2</sub> O + 2 Na	3,72 g/l
LB-Medium	Hefeextrakt	5 g/l
	Trypton	10 g/l
	NaCl	10 g/l
	Ampicillin	100 µg/ml
	ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
	ggf. Agar für Plattenkulturen	15 g/l

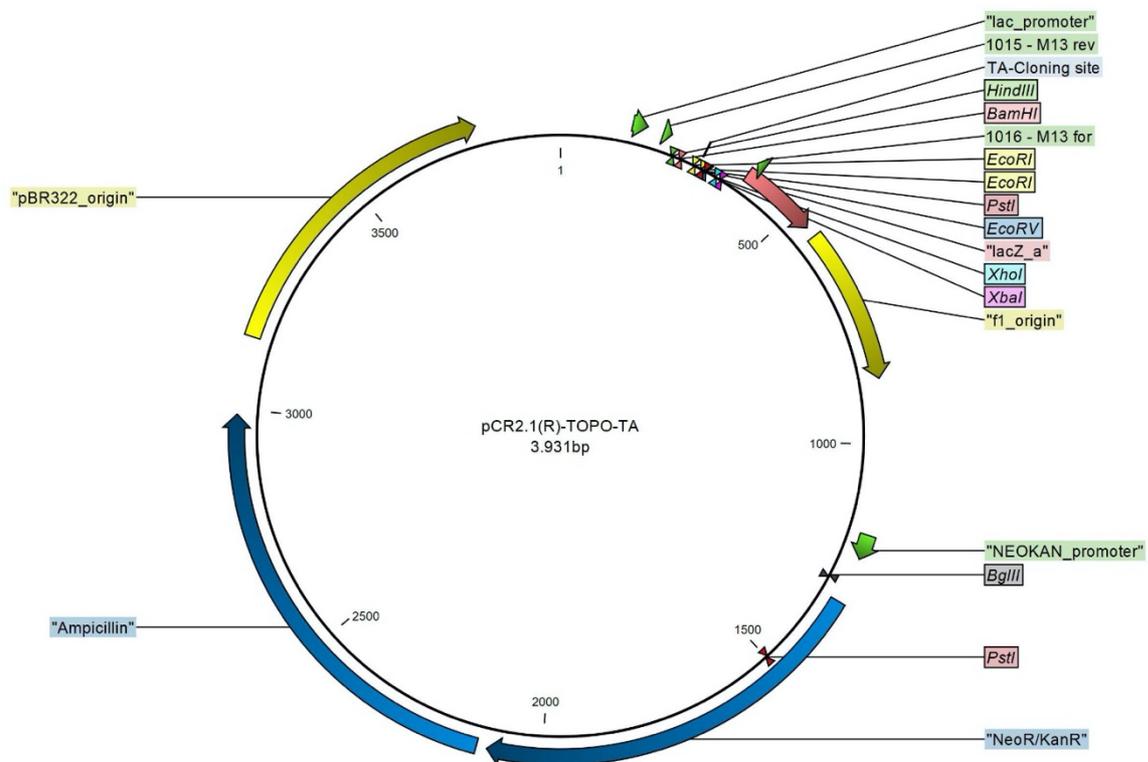
DMEM+++	DMEM	500 ml
	10% FCS	50 ml
	2 mM Glutamin	5 ml
	10.000 U/ml Penicillin	5 ml

**2.2.3 Vektoren und Plasmide****Tabelle 2-3: Vektoren und Plasmide**

<b>Vektoren/Plasmide</b>	<b>Artikelnummer</b>	<b>Hersteller, Ort</b>
pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO <sup>®</sup>	K4560-01	Invitrogen, Karlsruhe
pGL4.10[luc2] Luciferase	E6651	Promega GmbH, Mannheim

### 2.2.3.1 pCR®2.1-TOPO®-Vektor

Der pCR®2.1-TOPO®-Vektor besteht aus 3932 Basenpaaren und enthält Resistenzgene zur Selektion gegenüber Ampicillin, Neomycin und Kanamycin. Innerhalb des Vektors sind Erkennungsstellen für diverse Restriktionsenzyme vorhanden. Dieses ermöglicht unter anderem die gezielte Insertion eines gewünschten Inserts. Um den Erfolg einer Insertion mithilfe einer Sequenzierung zu prüfen, besitzt der Vektor Bindestellen für die Sequenzierprimer wie M13 Forward und M13 Reverse. Eine Unterscheidung von Klonen mit Insert gegenüber Klonen ohne Insert kann zudem über LacZ und der  $\beta$ -Galactosidase-Reaktion erfolgen.

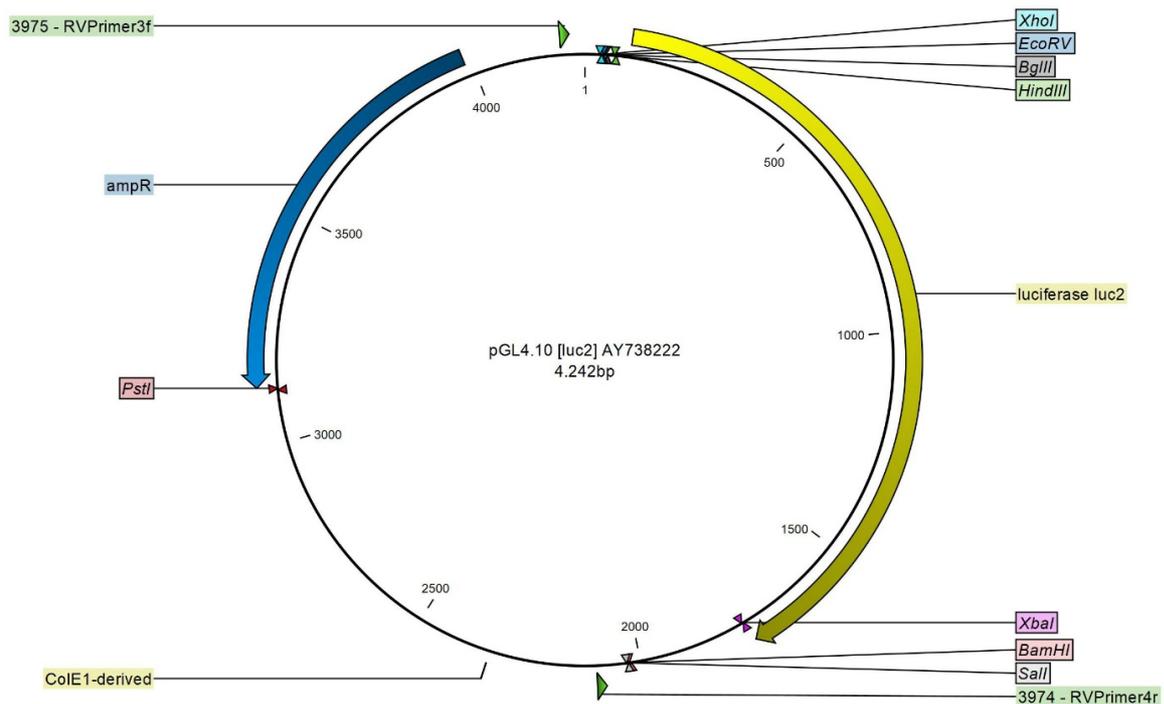


**Abbildung 2-1: pCR2.1®-TOPO®-TA Klonierungsvektor**

TA-Cloning-site: Klonierungsstelle für das Insert; Schnittstellen für Restriktionsenzyme: *BamHI*, *EcoRI*, *PstI*, *EcoRV*, *XhoI*, *XbaI*; M13 (for, rev): Sequenzierprimerbindungsstellen; *lacZ\_a*:  $\beta$ -Galactosidase Gen, *lac\_promoter*: Promoter für *lacZ\_a*; Ampicillin, NeoR/KanR: Antibiotikaresistenzgene; NEOKAN\_promotor: Promotor für NeoR/KanR; pBR322\_origin: Replikationsursprung

### 2.2.3.2 pGL4.10[luc2] Reportervektor

Der Reportervektor pGL4.10[luc2] setzt sich aus 4242 Basenpaaren zusammen und wurde entwickelt, um die Aktivität eines Promotors zu quantifizieren. Über multiple Klonierungsstellen kann eine Promotorsequenz der Wahl eingebracht werden. In Abhängigkeit von der Aktivität des inserierten Promotors emittiert die Luciferase eine Biolumineszenz, die in einem photonensensiblen Detektor gemessen werden kann.



**Abbildung 2-2: pGL4.10 [luc2] Reportervektor**

Restriktionsschnittstellen: *XhoI*, *EcoRV*, *BglIII*, *HindIII*, *XbaI*, *BamHI*, *Sall*, *PstI*; ampR: Antibiotikaresistenzgen für Ampicillin; 3975-RVPrimer3f, 3974-RVPrimer4r: Sequenzierprimerbindungsstellen; luciferase luc2: Luciferase-Reporter-Gen, ColE1-derived: Gen für ColicinE1 zur Hemmung des Wachstums ähnlicher Bakterienarten

## 2.2.4 Wirtszellen

Tabelle 2-4: Wirtszellen

Wirtszellen	Artikelnummer	Hersteller, Ort
TOP 10-Zellen	C404050	Invitrogen, Darmstadt
HEK-293	ATCC-CRL-1573	LGC Standards GmbH, Wesel

Bei den TOP 10-Zellen handelt es sich um elektrokompetente E.coli Bakterien. Diese Zelllinie ist gekennzeichnet durch eine besonders hohe Transformations-Effizienz von  $1 \times 10^{10}$  cfu/ug. TOP 10-Zellen weisen eine stabile Replikationsrate und eine hohe Plasmidkopienzahl auf [28]. Üblicherweise werden die TOP 10-Zellen bei Klonierungsverfahren und Plasmidpräparationen verwendet (vgl. Kapitel 2.3.6.2).

HEK-293 Zellen stammen aus menschlichen embryonalen Nierenzellen. Bei den HEK-293 Zellen handelt es sich um eine Zelllinie, die aus einem Nierentumor isoliert wurde [119]. Sie werden in der Molekulargenetik benutzt, um die Genexpressionen zu bewerten [122]. Die HEK-293 Zellen zeichnen sich durch ihre einfache Kultivierung und effektive Transfektion aus (vgl. Kapitel 2.3.10).

## 2.2.5 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2-5: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Typ	Artikelnummer	Hersteller, Ort
Pipettenspitzen	10 µl	720031	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
	10 µl	701115	Sarstedt, Nümbrecht
	200 µl	4844	Corning Incorporated, Schiphol Rijk, Niederlande
	1000 µl	70762	Sarstedt, Nümbrecht
	2500 µl	22492071	Eppendorf, Hamburg
Reagiergefäße	PCR Softtube 0,2 µl	20514383	Nerbeplus, Winsen/Luhe

	Micro Tube 0,5 ml	72699	Sarstedt, Nümbrecht
	Micro Tube 1,5 ml	72.706.400	Sarstedt, Nümbrecht
	Micro Tube 2,0 ml	72.685.500	Sarstedt, Nümbrecht
	Cellstar Tubes 15 ml	188271	Greiner Bio-One, Frickenhausen

**2.2.6 Geräteliste**

**Tabelle 2-6: verwendete Geräte**

<b>Geräte</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller, Ort</b>
PCR Thermocycler	T-personal	Biometra Whatman, Göttingen
	T-professional basic gradient	Biometra Whatman, Göttingen
Vortexer	Lab dancer	VWR, Darmstadt
Mini Centrifuge	Ministar silverline	VWR, Darmstadt
Pipettierhilfe	Eppendorf Reference	Eppendorf AG, Hamburg
	1 - 10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl	
Pipettierhilfe	Transferpette S	Brand, Wertheim
	0,1-1 µl, 0,5-10 µl, 20-200 µl	
	100-1000 µl, 0,5-5 ml	
Pipettierhilfe	Transferpette S-8	Brand, Wertheim
	0,5-10 µl, 5-50 µl	
	Transferpette S-12	Brand, Wertheim
	0,5-10 µl, 5-50 µl	
Feinwaage	OHAUS Corporation	Ohaus Europe GmbH, Nänikon, Schweiz
	Compact S	Biometra Whatman, Göttingen

## Material und Methoden

Agarose-Gelelektrophorese	Compact M	Biometra Whatman, Göttingen
Spannungsgerät für Gelelektrophorese	Power Pack P25T	Biometra Whatman, Göttingen
	PS 305T	Biometra Whatman, Göttingen
Geldokumentation	Transilluminator (Bio Doc Analyse)	Biometra Whatman, Göttingen
Zentrifuge	1-15 PK	Sigma, Osterode
Photometer	Biophotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Thermoblock	TB2 Thermboblock	Biometra Whatman, Göttingen
Elektroporator, Küvetten	Multiporator	Eppendorf AG, Hamburg
Inkubator	BD 115	Binder, Tuttlingen
Orbitalschüttler	Certomat MOII	Sartorius, Göttingen
Inkubatorhaube	Certomat H	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Julabo TW12	Julabo, Seelbach
Mikroskop	VWRI 630	VWR International GmbH, Darmstadt
Mikroplatten-Reader	Infinite M1000 Pro	Tecan, Crailsheim
Neubauerkammer	Improved	Optiklabor, United Kingdom

### 2.2.7 Enzyme

Tabelle 2-7: Enzyme

Typ	Name	Artikelnummer	Hersteller, Ort
<b>DNA-Polymerase</b>	<i>Go-Taq</i>	M3005	Promega GmbH, Mannheim
	<i>Ph-Taq</i>	F-540L	New England BioLabs, Frankfurt
<b>Ligase</b>	<i>T4-Ligase</i>	M0202S	New England BioLabs, Frankfurt
<b>Phosphatase</b>	<i>rSAP</i>	M0371S	New England BioLabs, Frankfurt

<b>Restriktionsenzym</b>	<i>EcoRI</i>	R0101S	New England BioLabs, Frankfurt
	<i>SmaI</i>	R0141S	New England BioLabs, Frankfurt
	<i>BamHI</i>	R0136S	New England BioLabs, Frankfurt
	<i>Sall</i>	R0138S	New England BioLabs, Frankfurt
	<i>SacI</i>	R0156S	New England BioLabs, Frankfurt
	<i>XhoI</i>	R0146S	New England BioLabs, Frankfurt
	<i>PstI</i>	R0140S	New England BioLabs, Frankfurt
	<i>HindIII</i>	R0104S	New England BioLabs, Frankfurt

### 2.2.8 Primer

**Tabelle 2-8: Primer**

<b>Analyse der Promotor-Kontroll-Region in <i>PRDM13</i> [111]</b>		
<b>PRDM13-DHS-1</b>	Forward Primer	GCATTCCCTAAAGCACTTGACC
	Reverse Primer	GATAGCTACCCCTCCTCTGAATG
<b>PRDM13-DHS-2</b>	Forward Primer	CTGATCATTGAATCAAGGCAG
	Reverse Primer	CAGCACTTGACATTTGTGTC
<b>PRDM13-DHS-3</b>	Forward Primer	GAGAAGACTAGATCAGGCTTCTC
	Reverse Primer	CTCTCATTCTCTGATTTTAC
<b>PRDM13-DHS-5</b>	Forward Primer	CACTGGAAAAATTATGTGGAAATC
	Reverse Primer	GAGTAATTAATGAAGTTGACAAGTTG

<b>CNV-PRDM13: Herstellung der Positivkontrolle</b>		
<b>PRDM13: 5'-Promotor-Region (Dup1)</b>	Forward Primer	AGTCGACCTCTGTCACCCGGGTTGG
	Reverse Primer	GTTGTGGCTCTTTTTGCATT
<b>PRDM13: 3'-UTR-Region (Dup2)</b>	Forward Primer	GAGGCTGAGGCAGTAGAA
	Reverse Primer	GCCCGGGTAAAGGTTTGT
<b>PRDM13-Duplikation- Ligase (DupL)</b>	Forward Primer	GATAAATCATATCTTAGACCGC
	Reverse Primer	CTCATGCCTATAATCCCAGCAC
<b>CNV-IRX1: Herstellung der Positivkontrolle</b>		
<b>IRX1: 5'-Promotor-Region (I-Dup1)</b>	Forward Primer	GCCCGGGAGAAGAAAATG
	Reverse Primer	TAGTCTGGGGTTCTTAGC
<b>IRX1: 3'-UTR-Region (I-Dup2)</b>	Forward Primer	AACAGGCAACTGAAAACAAC
	Reverse Primer	GAGAATCCCGGGTTATGCTT
<b>IRX1-Duplikation- Ligase (I-DupL)</b>	Forward Primer	GTTTTCACGAAAGTGCAAAGG
	Reverse Primer	GGGGTGGGAAGAGAAGAGAGG
<b>PRDM13: Untersuchung der Genexpression</b>		
<b>Promotor- Region (PROM)</b>	Forward Primer	CGCCAGAGCTCAATAGAAGT
	Reverse Primer	TGTTGCCGCCGCCCGGGCAGGC
<b>PKR- Region (PKR)</b>	Forward Primer	ACGTATCGGATCCAGGCAT TCCCTAAAGCACTTGACC
	Reverse Primer	GCTTGTGACGAATTGAGTAA TTAATGAAGTTGACAAGTTG
<b>PKR im TOPO- Vektor (PKR-TO)</b>	Forward Primer	ACGTATCGGATCCAGGCAT TCCCTAAAGCACTTGACC
	Reverse Primer	GCTTGTGACGGATCCGTAA TTAATGAAGTTGACAAGTTG

### 2.3 Molekularbiologische Methoden

#### 2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Methodische Grundlage zur Erkennung von Erbkrankheiten und Klonierung von Genen ist die enzymatische Vervielfältigung einer definierten Nukleinsäuresequenz mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (engl. *Polymerase chain reaction* = PCR). Der Ablauf einer PCR erfolgt in mehreren Zyklen, deren jeweilige Produkte die Vorlage für den folgenden Zyklus darstellen. Somit steigt die Anzahl an DNA-Kopien exponentiell. Basis für eine erfolgreiche PCR sind zwei spezifische Oligonukleotidprimer, die komplementär zu den Enden der Vorbild-DNA sind. Voraussetzung für eine autonome PCR sind hitzestabile DNA-Polymerasen.

##### 1. Schritt: Auftrennung der DNA-Doppelhelix (Denaturierung)

Der PCR-Zyklus beginnt mit der thermischen Überführung der DNA-Doppelhelix in einzelsträngige DNA. Hierfür wurde eine Temperatur von 94 °C gewählt, um die Wasserstoffbrücken innerhalb der DNA-Doppelhelix aufzubrechen.

##### 2. Schritt: Primerhybridisierung (Annealing)

Im Anschluss an die Denaturierung erfolgte die Hybridisierung der Oligonukleotidprimer an die komplementären Sequenzabschnitte des einzelsträngigen DNA-Templates. Durch diesen Vorgang wird die DNA-Sequenz für die enzymatische Amplifikation definiert. Die Primer müssen entgegengesetzt und aufeinander zu orientiert sein. In Abhängigkeit von der Länge und Sequenz der Oligonukleotidprimer, wird hierfür eine primerspezifische Temperatur zwischen 53 - 65 °C gewählt, da jedes Primerpaar ein spezifisches Temperaturoptimum besitzt. Um für jedes Primerpaar das Temperaturoptimum herauszufinden, wurde eine Gradienten-PCR von 53 – 65 °C in einem „T-professional basic gradient“ Thermocycler durchgeführt. Dabei temperiert dieser Thermocycler die Slots in den 12 Spalten des Heizblocks aufsteigend im Rahmen der Temperaturvorgaben. Die verwendeten Primer wiesen eine Länge von ca. 20 - 40 Nukleotiden auf. Die Rahmenbedingungen einer Polymerase-Kettenreaktion können verändert werden, um die Primerhybridisierung zu verbessern. Neben der Temperatur können die Konzentrationsverhältnisse der Einzelkomponenten wie Primer, der DNA oder die Polymerase verändert werden.

Es gibt zudem spezielle Zusätze wie Dimethylsulfoxid (DMSO). Das DMSO verändert die Grundkonfiguration der DNA-Doppelhelix und verbessert somit das Annealing der Primer.

### 3. Schritt: DNA-Amplifikation durch thermostabile DNA-Polymerasen (Elongation)

Durch die Primerhybridisierung kann die DNA-Polymerase die gewünschte DNA-Sequenz beginnend am 3'-Ende kopieren. Typischerweise liegt das Temperaturoptimum der thermostabilen DNA-Polymerase bei 72 °C. Nach dem 1. Zyklus entstehen als Produkte überlange DNA-Einzelstränge an den 3'-Enden. Diese Produkte dienen als DNA-Matrize für den folgenden Zyklus, an deren überlangem 3'-Ende die Oligonukleotidprimer anlagern. Im Anschluss des 2. Zyklus entstehen erstmalig DNA-Moleküle der gewünschten Länge.

Um eine hohe Konzentration der spezifischen DNA-Sequenz zu erhalten, werden im Thermocycler bis zu 35 Zyklen durchlaufen.

Ein PCR-Ansatz besteht aus folgenden Komponenten:

- DNA-Template: Nukleinsäuremischung, die die zu amplifizierende Nukleinsäuresequenz enthält
- DNA-Polymerase: Enzym, das die DNA-Abschrift mit Desoxyribonukleotiden synthetisiert
- Reaktionspuffer: ermöglicht ein konstantes Milieu für die DNA-Polymerase
- Zwei Oligonukleotidprimer: definieren die zu amplifizierende Region des Templates
- Desoxynukleotide: Bausteine zur Synthese der DNA-Abschrift
- Magnesiumchlorid: stabilisiert die DNA-Polymerase als Kofaktor
- Doppelt destilliertes Wasser

Der folgende PCR-Standardansatz wurde in ein PCR-Softtube (0,2 ml) pipettiert und im Thermocycler mit einem primer-spezifischen Programm bei einer primer-spezifischen Annealingtemperatur inkubiert:

ddH <sub>2</sub> O		14,8 µl
Puffer (5x)		12,5 µl
dNTP	(0,125 mM)	10,0 µl
MgCl <sub>2</sub>	(25 mM)	7,5 µl
Primer forward	(10 pmol/µl)	2,5 µl
Primer reverse	(10 pmol/µl)	2,5 µl
DNA-Polymerase	(5 U/µl)	0,3 µl
<u>DNA</u>	<u>(20 ng/ µl)</u>	<u>12,5 µl</u>
Gesamtansatz		62,6 µl

**Tabelle 2-9: Ablauf PCR**

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

### 2.3.2 Elektrophoretische Auftrennung in Agarose-Gelelektrophoresen

Mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente bzw. PCR-Produkte, die eine Größe von 100 bp – 15 kb aufweisen, aufgetrennt und analysiert werden. Es handelt sich bei der Agarose um ein Polysaccharid, welches aus Meeralgen isoliert wird und aus L- und D-Galaktose Untereinheiten aufgebaut ist [67].

Zunächst werden durch das Anlegen eines elektrischen Feldes die Nukleinsäureketten linearisiert, die je nach Größe und Ladung unterschiedlich schnell durch die Agarose-Gelmatrix wandern. Aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren wandern die DNA-Fragmente entsprechend ihrer Ladung zur positiv geladenen Anode. Hierbei wirkt das Agarose-Gel wie ein Filtersystem. Ein hochkonzentriertes Agarose-Gel besitzt engmaschigere Poren als ein niedrig konzentriertes, sodass 0,6 - 1,2% Gele DNA-Fragmente einer Größe von 1 kb - 15 kb und 1,5 - 2% Gele Fragmente unter 1 kb auftrennen [56]. Außerdem ist der Logarithmus der elektrophoretischen Beweglichkeit proportional zur Agarose-Konzentration im Gel [50].

Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Moleküle durch das Agarose-Gel ist von der Größe der DNA-Moleküle, der Agarose-Konzentration, der DNA-Konformation, der gewählten Spannung und zuletzt von der Art des Elektrophorese-Puffers abhängig [67]. Dabei gilt, je kleiner das DNA-Molekül, desto einfacher und schneller kann es durch die Poren der Agarose-Matrix wandern. Dementsprechend sammeln sich DNA-Fragmente derselben Größe als Banden auf gleicher Höhe an [130].

Um diese Banden anschließend sichtbar zu machen, gibt es unterschiedliche Färbemethoden. In dieser Arbeit wurde dem Agarose-Gel vor der Elektrophorese SERVA-DNA-Stain-ClearG zugesetzt, der in Verbindung mit DNA grün autofluoresziert. Dadurch konnten die DNA-Moleküle innerhalb des Agarose-Gels visualisiert werden.

**Tabelle 2-10: Versuchsbedingungen Agarose-Gel**

Gelelektrophoresekammer	Gelvolumen	Laufbedingungen	Probenanzahl	1xTBE-Puffer	Agarose	Farbstoff
Compact S	50 ml	100 V, 45 min	15-30	50 ml	1 g	4 µl
Compact M	100 ml	100 V, 60 min	24-48	100 ml	2 g	8 µl

Die Agarose wurde entsprechend der Tabelle 2-10 in einem ausreichend großen Erlenmeyerkolben eingewogen und mit 1xTBE-Puffer versetzt. Danach wurde der Erlenmeyerkolben mit Alufolie verschlossen und in der Mikrowelle bei ca. 650 Watt erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach erneutem Wiegen wurde die Gewichts Differenz durch destilliertes Wasser aufgefüllt und SERVA-DNA-Stain-ClearG hinzu pipettiert. Danach wurde die Abkühlung der Lösung auf ca. 40 °C abgewartet und die Lösung in einen Gelträger mit entsprechenden Kämmen eingegossen.

Nach vollständiger Aushärtung des Gels wurde der Gelträger in die Gelelektrophoresekammer eingesetzt, mit 1xTBE-Puffer überschichtet und die Kämmen entfernt. Im Anschluss wurde in die durch die Kämmen entstanden Slots 5 µl des amplifizierten PCR-Produkts pipettiert. Zur späteren Beurteilung und Visualisierung der Bandenhöhe der DNA-Fragmente wurde immer in den ersten Slot der jeweiligen Kammreihe 5 µl eines DNA-Markers eingefüllt (Gene Ruler 100 bp DNA Ladder oder Gene Ruler 1kb DNA Ladder). Die Elektrophorese wurde in Betrieb genommen, indem die Spannung und Zeit entsprechend der Laufbedingungen aus Tabelle 2-10 mit Hilfe des Power Supplies angelegt wurden.

Nach der Auftrennung wurden die DNA-Fragmente mithilfe eines Geldokumentationsgeräts (Bio Doc Analyser) elektronisch dokumentiert.

### 2.3.3 Isolation von Nukleinsäure-Strängen aus einem Agarose-Gel

Die Isolation der zuvor aufgetrennten DNA-Fragmente innerhalb des Agarose-Gels erfolgte mithilfe des Kits NucleoSpin® Extract II der Firma Macherey-Nagel. Durch dieses Verfahren können sogar sehr kleine DNA-Fragmente gezielt aufgereinigt werden. Die nächsten Arbeitsschritte wurden entsprechend der Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Im ersten Schritt wurden 200 µl Binding-Buffer-NT1 pro 100 g Gel-Blöckchen in ein Eppendorfer Gefäß pipettiert und für 10 min auf 50°C in einem Thermoblock erhitzt. Nachdem sich das DNA-haltige Gel-Blöckchen vollständig aufgelöst hat, wurde die Probe in eine PCR Clean-up-Column (Säule) überführt und für 90 s mit 11.000 g/min zentrifugiert. Dabei wurde die DNA an das Säulenmaterial der PCR Clean-up Column gebunden, während die übrigen Bestandteile der Probe als Durchfluss verworfen wurden. Im dritten Schritt erfolgte eine Aufreinigung der DNA von Salzurückständen durch Zugabe von 700 µl Washing-Buffer-NT3 mit erneuter Zentrifugation. Eine weitere mehrminütige Zentrifugation entfernte schließlich zurückgebliebenen Waschpufferreste aus der Aufreinigungssäule. Nach Trocknung der Säule wurde dieser im letzten Schritt 30 µl des Elution-Buffer-NE zugesetzt. Die 120s Einwirkzeit wurden abgewartet und die DNA aus der Säule in ein frisches Eppendorfer Gefäß eluiert. Der Durchfluss enthielt nun die aufgereinigte DNA-Probe aus dem anfänglichen Gel-Blöckchen. Abschließend wurde eine photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA-Lösung durchgeführt.

### 2.3.4 Restriktionsverdau

Durch Restriktionsenzyme können DNA-Moleküle, PCR-Produkte oder Plasmide an spezifischen, meist palindromischen, Sequenzen hydrolytisch gespalten werden [82]. Als Produkte entstehen einzelne definierte DNA-Fragmente, die anschließend anhand ihrer Größe analysiert werden oder mithilfe einer Ligase mit anderen, kompatiblen DNA-Fragmenten neu zusammengesetzt werden können.

Unter Berücksichtigung der Enzymspezifität kann der Schnittmechanismus in verschiedene Kategorien eingeteilt werden. Bei *blunt-end-cuttern* erfolgt der Restriktionsschnitt innerhalb der doppelsträngigen DNA-Sequenz an gegenüberliegenden Zuckern der Zucker-Phosphat-Rückgrate. DNA-Fragmente können

nach einem Restriktionsschnitt auch einen 5' oder 3'-Überhang besitzen, die dann als *sticky-ends* bezeichnet werden [116].

Es handelt sich bei den Restriktionsenzymen im Allgemeinen um Typ II-Endonukleasen, die die Phosphordiesterbindungen beider Stränge eines DNA-Moleküls trennen [82]. Als Kofaktor für die hydrolytische Spaltung benötigen die Enzyme vor allem zweifach positiv geladene Magnesium-Ionen [90].

Zusammensetzung eines 10 µl Standard-Verdau-Ansatzes:

Inkubation: 1 Stunde, 37 °C

PCR-Produkt/Plasmid-DNA	1 µl
Restriktionsenzym	1 µl
Restriktionspuffer	1 µl
<u>ddH<sub>2</sub>O</u>	<u>7 µl</u>
Gesamt	10 µl

### 2.3.5 Ligation

DNA-Ligasen sind in allen Zellen vorzufinden und stellen essentielle Enzyme für die DNA-Replikation, Reparatur und Rekombination dar [99]. Funktionell katalysieren sie die Phosphordiesterbindung zwischen 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden [132].

Für die *in vitro* DNA-Rekombination hat sich die prokaryotische DNA-T4-Ligase bewährt. Die ATP-abhängige T4-Ligase stammt dabei aus dem T4-Phagen. Die T4-Ligase besitzt insbesondere die Fähigkeit, sowohl *sticky-ends* als auch *blunt-ends* (vgl. Kapitel 2.3.4) miteinander zu ligieren [36].

Die eingesetzte Menge der zu ligierenden DNA-Fragmente errechnet sich aus der Länge ihrer Basenpaare und deren molekularen Masse. Das molare Verhältnis von Vektor zu Insert (1:3) wurde durch folgende Formel ermittelt:

$$\frac{\text{Vektor (ng)} \times \text{Insert (kb)}}{\text{Vektor (ng)}} \times \frac{\text{Insert (mM)}}{\text{Vektor (mM)}} = \text{Insert (ng)}$$

Zusammensetzung eines 20 µl Standard-Ligation-Ansatzes:

Inkubation: 1 Stunde, Raumtemperatur

T4 Ligase	1,5 µl
T4-Ligase-Puffer	1,5 µl
DNA-Fragment A	x µl
DNA-Fragment B	y µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 20 µl
Gesamt	20 µl

### 2.3.6 DNA-Klonierung

Als Vektoren bezeichnet man DNA-Moleküle zur Einführung einer fremden Erbinformation in eine Empfängerzelle. Die Isolation und Einführung der Ziel-DNA in den Vektor wird als Klonierung bezeichnet und ermöglicht die Vervielfältigung und Analyse des inserierten DNA-Fragments. So können DNA-Fragmente einer Größe von wenigen Basenpaaren bis zu einer Größe von 20 kb in einen Plasmidvektor inseriert werden [70]. Als eine der einfachsten und effizientesten Methoden, um PCR-Produkte unabhängig ihrer Basensequenz in Plasmide zu klonieren, gilt die TOPO-TA-Klonierung.

#### 2.3.6.1 TA-Klonierung in den pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>-Vektor

Ziel der TA-Klonierung ist die Herstellung einer rekombinanten DNA mit der anschließenden Transformation in eine bakterielle Wirtszelle zur exponentiellen Vermehrung des Vektors.

Basis dieser Methode ist die terminale Transferase Aktivität der Taq-DNA-Polymerase, die während der PCR dem 3' Ende des PCR Produkts einen A-Überhang anfügt. Im Gegenzug besitzt der pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>-Vektor wie alle T-Vektoren einen 3'-T-Überhang, der ein effizientes Klonieren durch die komplementären A-Überhänge des PCR-Produkts ermöglicht [133]. Dieser Vorgang wird durch die Vaccinia-Topoisomerase I katalysiert, die für die notwendige Energie die Phosphodiesterbindung eines DNA-Stranges nach einem 5'-CCCTT-Element abspaltet. In der Folge bindet die Topoisomerase I über eine 3'Phosphotyrosylbindung kovalent an das 3'Phosphat des geschnittenen Endes [19]. Durch Angriff eines 5'Hydroxylrestes des DNA-Stranges auf die

3'Phosphotyrosylbindung löst sich die Topoisomerase I wieder ab und der DNA-Strang ligiert mit dem Vektor.

Zusammensetzung eines 5 µl Standard- pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>-Vektor-Ansatzes:

Inkubation: 5min, RT °C

DNA-Insert	1 µl
pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO <sup>®</sup> -Vektor	1 µl
Dilute Salt	1 µl
<u>ddH<sub>2</sub>O</u>	<u>3 µl</u>
Gesamt	5 µl

### 2.3.6.2 Transformation in elektrokompente Zellen

Im Anschluss an die TA-Klonierung erfolgte die Transformation der Vektor-DNA in kompetente TOP 10 Zellen. Es handelt sich dabei um elektrokompente *E.coli*-Bakterien, deren Zellmembranen durch eine Elektroporation vorübergehend permeabel gemacht wurde, um die Vektor-DNA in die Zellen einzuschleusen [126].

Es wurden 1 - 2 µl des Reaktionsansatzes des pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>-Vektor-Ansatzes mit 50 µl frisch auf Eis aufgetauten *E.coli*-Bakterien vermengt und in eine Elektroporationsküvette gegeben. An die Küvette wurde in einem Elektroporator ein elektrisches Feld angelegt (2000 V, 5 ms). Danach wurde der Ansatz in 1 ml LB-Nährmedium aufgenommen und in einem 1,5 ml Reagiergefäß für 90 min bei 37 °C in einem Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 50 - 100 µl des Gemisches auf einer vorgewärmten und mit Ampicillin (c = 100 mg/l) versetzten Agarplatte ausgestrichen und im Brutschrank bei 37 °C für 12 - 18 Stunden inkubiert. Im nächsten Schritt wurden einzelne Bakterienklone mit Pipettenspitzen aus der Agarplatte ausgestanzt und in ein 15 ml großes Kulturgefäß mit 5 ml LB-Medium mit Ampicillin (c = 100 mg/l) überführt. Das Kulturgefäß wurde bei 37 °C und für 12 - 18 Stunden auf einem Orbitalschüttler unter einer Inkubationshaube inkubiert.

### 2.3.7 Isolation von Nukleinsäuren

#### 2.3.7.1 Plasmid-Mini-Präparation

Die Plasmidpräparation zur Gewinnung der Plasmid-DNA aus *E.coli*-Bakterien erfolgte durch das Miniprep-Plasmid-DNA-Purification-Kit der Firma Macherey-Nagel. Zunächst wurden aus der 5 ml Bakterienkultur 2 ml entnommen, in ein 2 ml großes Reagiergefäß pipettiert und bei 10000 g für 10 min abzentrifugiert, sodass sich am Grund des Reagiergefäßes ein Bakterienpellet absetzte. Nachdem der Überstand in ein Sammelgefäß verworfen wurde, wurden zunächst 100 µl des S1 Resuspensionspuffers zur Resuspendierung des Pellets hinzugesetzt und das Pellet gleichmäßig suspendiert. Als nächstes wurden zur Zerstörung der Bakterienwände 100 µl des S2-Lysispuffers hinzugefügt und das Gefäß einmal invertiert. Zuletzt wurden 100 µl des S3-Neutralisierungspuffers hinzugegeben und erneut invertiert, um die Proteine auszufällen. Zur Abtrennung der gefällten Proteine wurde das Gemisch nun für 10 min, bei 4 °C und maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert. Der plasmidhaltige Überstand wurde abpipettiert und in ein frisches 1,5 µl Reagiergefäß übertragen. Danach wurden 700 µl eiskaltes Ethanol (absolut, -20 °C) hinzugefügt und es folgte eine Zentrifugation bei maximaler Umdrehungszahl bei 4 °C. Wiederholt bildete sich ein kleines Pellet am Grund des Reagiergefäßes, der Überstand wurde dekantiert und durch 200 µl Ethanol (70%, -20 °C) ersetzt. Wiederum wurde die Probe unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut dekantiert und das Pellet im Reagiergefäß bei geöffnetem Deckel für 5 min luftgetrocknet. Dem Pellet wurde abschließend 50 µl ddH<sub>2</sub>O hinzugefügt und die Konzentrationsbestimmung in einem Photometer bestimmt.

#### 2.3.7.2 Plasmid-Midi Präparation

Eine Midi-Präparation wird im Vergleich zu der Mini-Präparation dann durchgeführt, um eine höhere Konzentration (100 – 350 µg) eines Plasmids zu erhalten. In dieser Arbeit wurde hierfür das Kit ZymoPURE II-Plasmid-Midiprep der Firma Zymo-Research verwendet.

Im ersten Schritt wurden in einen zwei Liter Erlenmeyer-Kolben 300 ml LB-Medium, Ampicillin und die in der bakteriellen Wirte mit dem klonierten Plasmid angesetzt. Der Erlenmeyer-Kolben wurde nun für 18 Stunden bei 37 °C auf einem Orbitalschüttler inkubiert. Anschließend wurde die bakterielle Kultur durch Zentrifugation bei 5000 g für 10 min gesammelt. Ähnlich wie bei der Minipräparation wurde dem bakteriellen Pellet zunächst 14 ml des Resuspensionspuffers ZymoPURE™ P1, dann 14 ml des

Lysispuffers ZymoPURE™ P2 und abschließend 14 ml des Neutralisierungspuffers P3 hinzugesetzt. Anschließend erfolgte ein gelblicher Farbumschlag mit grün-gelblichem Präzipitat. Dann wurde das Gemisch in den ZymoPURE™ Syringe Filter überführt und die lysierte Debris entfernt. Anschließend wurden 14 ml des ZymoPURE™ Bindungspuffers hinzugegeben und die Lösung in die ZymoPURE™ Vakuum-Säule überführt. Durch eine Vakuumpumpe mit einem Druck von 400 mmHg konnte das Plasmid in der Säule gefiltert und mit Wasch-Puffern aufgereinigt werden. Im letzten Schritt wurde durch Zugabe von 200 µl des ZymoPURE™ Elution-Puffers und einer Zentrifugation bei 10000 g für 1 min das Plasmid in hoher Konzentration aus der Säule eluiert.

### 2.3.8 Herstellung eines Glycerinstocks

Glycerinstocks dienen dazu, Bakterienzellen mit Plasmid-DNA längerfristig aufzubewahren. Hierfür wurden 1 ml Bakterienlösung mit 1 ml 100%-igem Glycerin in einem Kryoröhrchen vermischt und bei -80 °C gelagert.

### 2.3.9 Sanger-Sequenzierung

Die Sanger-Sequenzierung (Kettenabbruchmethode) ist ein 1977 entwickeltes molekulares Verfahren zur Bestimmung der Basenabfolge eines DNA-Stranges [102]. Der Funktionsmechanismus beruht auf vier analogen Ansätzen mit Desoxy-Nukleosidtriphosphaten (dNTPs) unter Zusatz jeweils eines Didesoxy-Nukleosidtriphosphats (ddNTPs). In den vier parallelen Ansätzen befinden sich unterschiedliche ddNTPs, die nun zufällig anstelle des analogen dNTPs eingebaut werden können. Diesen Didesoxy-Nukleosidtriphosphaten fehlt allerdings am C<sub>3</sub>-Atom die Hydroxygruppe, die für die weitere DNA-Elongation durch die DNA-Polymerase erforderlich ist. Infolgedessen bricht die DNA-Synthese nach zufälligem Einbau eines Didesoxy-Nukleosidtriphosphats an dieser Stelle ab [49]. Als Produkte entstehen viele unterschiedlich lange DNA-Fragmente in jedem Reaktionsansatz, die dann parallel elektrophoretisch aufgetrennt werden. Als Resultat kann die Basenabfolge durch Vergleich der vier Ansätze abgelesen werden. Dank dieses Verfahrens können Sequenzveränderungen in Form einer Sequenzvariation innerhalb eines DNA-Fragmentes detektiert werden. Die aktuellen Verfahren zur Bestimmung der DNA-Sequenz beruhen alle auf dieser Methode, werden aber zum Zweck der Automatisierung

und Vereinfachung des Auslesens auf einen einzigen Reaktionsansatz reduziert, der alle vier ddNTPs enthält. Die ddNTPs sind zur Unterscheidung der Nukleotide durch vier verschiedene Fluoreszenzfarbstoffen markiert [3].

Zur Sequenzierung wurden 14 µl aufgereinigtes PCR-Produkt bzw. Plasmid mit 1 µl eines spezifischen Sequenzierprimers (10 pm/µl) in ein 1,5 ml Reagiergefäß pipettiert. Die nachfolgende Sanger-Sequenzierung wurde von einem externen Labor (Seqlab – Sequenz Laboratory Göttingen GmbH) durchgeführt. Die Auswertung und Prüfung der Basenabfolge auf Sequenzvarianten erfolgte im Labor für molekulare Ophthalmologie der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der JLU Gießen mithilfe des Programms CLC DNA-Workbench. Hierbei wurden die sequenzierten Proben mit den in der NCBI-Datenbank befindlichen Referenzsequenzen gegenübergestellt und Abweichungen festgestellt.

### 2.3.10 Transfektion der HEK-293 Zellen

Die Transfektion beschreibt das Einbringen einer Fremd-DNA in eine eukaryotische Zelle und dient der Amplifikation des Genproduktes. Hierfür wurden HEK-293 Zellen mithilfe des Nährmediums DMEM mit Glukose, fetalem Kälberserum (FCS), Penicillin und L-Glutamin kultiviert.

Zunächst erfolgte die Prüfung der Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer. Es wurden 300.000 Zellen pro Well in einer 24 Well-Platte ausgesät und über Nacht mit 500 µl DMEM kultiviert. Nach Austausch des Nährmediums wurde der jeweilige Transfektionsansatz mit dem gewünschten Insert tropfend auf die 24-Well-Platte hinzugegeben. Als nächstes wurde die Platte für 4 – 6 Stunden in den Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurde die 24-Well-Platte in eine 96-Well-Platte übertragen. Das Ablösen und Verteilen der HEK-293 Zellen erfolgte jeweils mit 100 µl Accutase. Die kalkulierte Menge des jeweiligen Inserts wurde in Abhängigkeit von der Größe und der Konzentration des Konstrukts rechnerisch ermittelt.

Zusammensetzung eines Standard-Transfektion-Ansatzes:

Inkubation: 5 min, Raumtemperatur

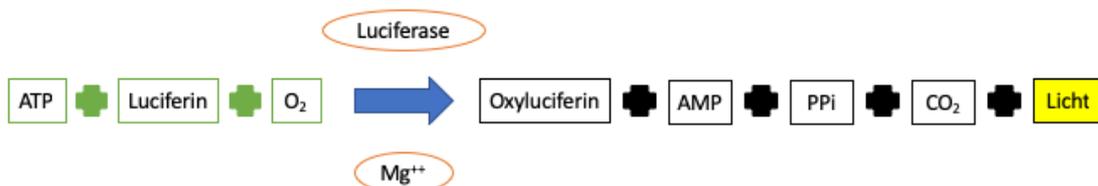
Natriumchlorid (NaCl)	30 µl
pGL4.10 [luc2]-Vektor (mit Insert)	30 µl
<u>Polyethylenimin</u>	<u>40 µl</u>
Gesamt	100 µl

### 2.3.11 One-step Luciferase assay

Das Prinzip des Assay-Kits basiert auf der Eigenschaft einer Biolumineszenz der Firefly-Luciferase. Als Biolumineszenz versteht man die Lichtausbeute in Form eines Photons bei biochemischen Vorgängen. Chemisch betrachtet, wandelt die Firefly-Luciferase in Anwesenheit von ATP, Sauerstoff und  $Mg^{2+}$  ein Luciferin-Molekül zu Oxyluciferin und AMP um. Bei dieser Reaktion wird Licht emittiert, welches in einem Luminometer oder Mikroplatten-Reader gemessen werden kann (vgl. Abbildung 2-3). Die Firefly-Luciferase besitzt eine besonders hohe Quantenausbeute, da bei nahezu jedem oxidiertem Luciferin ein Photon abgegeben wird.

Das Gen der Firefly-Luciferase findet sich innerhalb des pGL4.10 [luc2]-Vektors und wird dort als Reporter-Gen eingesetzt. Als Reporter-Gene bezeichnet man Gene, die abhängig von der Aktivität eines Promotors in einem Vektor eine promotorspezifische quantifizierbare Expression zeigen.

In dieser Arbeit wurde im ersten Schritt ein gewünschtes Insert in den pGL4.10 [luc2]-Vektor eingebracht. Die gewählten Inserts besitzen einen Promotor, deren Aktivität es in Abhängigkeit von ihrer Sequenzvariation zu untersuchen galt. Danach wurde der pGL4.10 [luc2]-Vektor in einem Transfektionsansatz in die HEK-293 Zellen transfiziert. Innerhalb der HEK-293 Zellen erfolgte die Expression der Firefly-Luciferase. Hierbei war die Luciferase-Synthese von der Promotoraktivität des Inserts abhängig. Als nächstes wurde die Luciferase in den HEK-293 Zellen durch das Luciferase-Reagent freigesetzt, um eine Beurteilung der Genexpression vornehmen zu können. Das Luciferase-Reagent führte als Einkomponentensystem zur Lyse der HEK-293 Zellen und lieferte gleichzeitig das Substrat und die Stabilisatoren für die Luciferase-Reaktion. Jedem Well der 96-Well-Platte wurden 100  $\mu$ l des Luciferase-Reagents zugesetzt. Die Biolumineszenz der Firefly-Luciferase wurde anschließend in einem Mikroplatten-Reader ausgelesen.



**Abbildung 2-3: Reaktionsgleichung des One-Step-Luciferase-Assays**

Luciferin reagiert durch Luciferase unter Gabe von ATP,  $O_2$  und  $Mg^{2+}$  zu Oxyluciferin, AMP, PPI,  $CO_2$  und emittiert dabei Licht

### 2.4 Phänotypische Untersuchungsmethoden

#### 2.4.1 Visus

Als Visus wird das maximale Auflösungsvermögen des Auges für kleine Objekte verstanden. Die Sehschärfe beschreibt die Fähigkeit, zwei Objektpunkte getrennt voneinander wahrzunehmen. Dazu wird für die Messung des Visus eine optimale Korrektur von Refraktionsfehlern vorgenommen und die Sehleistung als best korrigierte Sehschärfe (BCVA / Werte in LogMAR) angegeben. Die präzise Detailwahrnehmung basiert auf der Leistung der Zapfen, deren Dichte in der Fovea centralis am höchsten ist. Der Visus wurde für jedes Auge einzeln ermittelt. Die Berechnung der Sehschärfe erfolgt über einen Quotienten aus Ist- und Sollentfernung. Als Referenz für die Sollentfernung werden Werte eines normalsichtigen Erwachsenen definiert. Generell nimmt der Visus im Alter ab. Die Sehschärfe ist im Bereich der Peripherie der Netzhaut vermindert, da dort die Zapfendichte gegen Null geht und mehrere Photorezeptoren zusammen auf nur eine Ganglienzelle projizieren [39, 100, 127].

#### 2.4.2 Fundusphotographie

Die Fundusphotographie ermöglicht erste Informationen über die Netzhautgefäße, das Pigmentepithel und die Aderhautstrukturen. Das ophthalmoskopische Bild ist hierbei abhängig von dem Pigmentgehalt, dem Lebensalter und der Refraktion. Während bei Kleinkindern die Papille heller erscheint, sind bei älteren Patienten im Allgemeinen mehr Drusen, also Ablagerungen von pathologischen Abbauprodukten des retinalen Pigmentepithels (RPE) auffindbar. Die rötliche Farbe der Fundusphotographie ergibt sich durch den Blutgehalt der Choroidea und variiert in Abhängigkeit von der Pigmentierung des RPE. Generell bilden die Funduskopien einen essentiellen Teil der Diagnostik im Zusammenhang mit pathologischen Veränderungen der Netzhaut [87, 6, 39].

#### 2.4.3 Fundusautofluoreszenzaufzeichnung

Die Fundusautofluoreszenzaufzeichnung (FAF) wird mit einem Laser-Scanning-Ophthalmoscope (cSLO) und speziellen Lasern und Detektoren durchgeführt. Diese Untersuchungstechnik basiert auf der Emissionsfähigkeit von Lipofuszin, einem

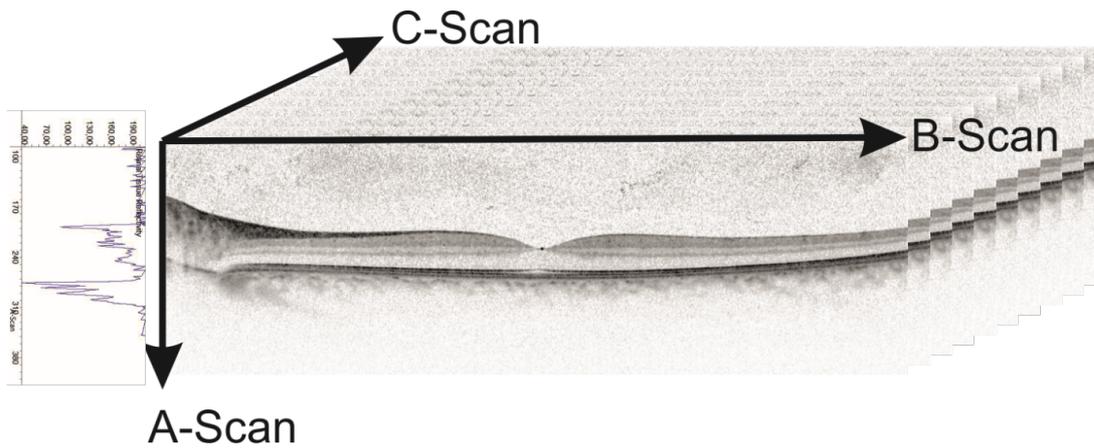
Abbauprodukt des Vitamin A im retinalen Pigmentepithel (RPE). Dazu wird Lipofuszin mit Licht einer Wellenlänge von ca. 480 – 510 nm energetisch angeregt. In Form einer Autofluoreszenz emittiert Lipofuszin selbst ein Licht, welches von einem speziellen Scanner, dem Heidelberg-Retina-Angiographen (HRA), gemessen wird. Die Lipofuszine können bei retinalen Erkrankungen vermehrt oder vermindert vorliegen, welches zu veränderten Autofluoreszenzverteilungen führt [16, 39].

### 2.4.4 Optische Kohärenztomographie (OCT)

Die optische Kohärenztomographie ist ein nicht-invasives, bildgebendes Verfahren zur Visualisierung der Netzhautschichten. Das Verfahren gilt als optische Biopsie, die gegenwärtige Informationen *in situ* liefert. Das Prinzip beruht auf einer Lichtreflexion der unterschiedlichen Netzhautschichten an ihren Grenzflächen. Hierfür wird ein Infrarotlicht einer Super-Lumineszenz-Diode auf die Netzhaut projiziert, welches in einen Proben- und Referenzstrahl unterteilt wird. Die Reflexion der Netzhaut ergibt ein Interferenzmuster, deren Amplituden die Tiefe der einzelnen Schichten errechnen lassen. Mithilfe der optischen Kohärenztomographie können histopathologische Prozesse der Netzhaut erfasst werden. Bei der optischen Kohärenztomographie gibt es verschiedene Scan-Protokolle. Dazu zählt der 3D-Volumen-Scan, der Radial-Scan und der Single-Scan. Ein A-Scan stellt eine eindimensionale Darstellung des OCTs an einer einzelnen Netzhautstelle dar. Mehrere A-Scans in einer Reihe bilden den zweidimensionalen B-Scan. Durch parallel angeordnete B-Scans entstehen der dreidimensionale C-Scan oder der Volumenscan (vgl.

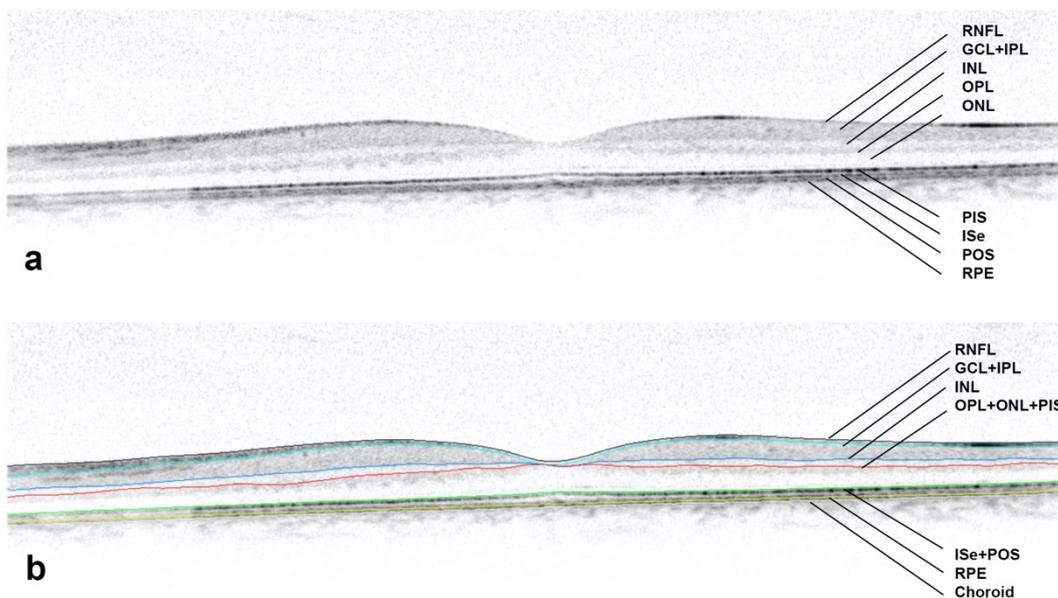
Abbildung 2-4). Wenn möglich, wurde in dieser Arbeit bei der Patientenauswertung auf einen flächigen 3D-Volumen-Scan zurückgegriffen, der die detailreichste Wiedergabe der Netzhaut ermöglicht [8, 35, 1, 117, 118].

Die Bilddaten der optischen Kohärenztomographie wurden in die in Gießen entwickelte Software DiOCTA überführt und ausgewertet. Mithilfe dieser Software wurden die einzelnen Netzhautschichten zunächst automatisch segmentiert und anschließend manuell optimiert [29].



**Abbildung 2-4: SD-OCT – Darstellung der Scan-Richtungen eines Normprobanden**

Die Abbildung zeigt die eindimensionale (A-Scan), zweidimensionale (B-Scan) und dreidimensionale (C-Scan) Ausrichtung der Netzhautdickenerfassung. (Mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. M. Preisung)



**Abbildung 2-5: Optische Kohärenztomographie (OCT) und DiOCTA – Darstellung der Netzhautschichtung eines Normprobanden im B-Scan**

(a) stellt die Aufnahme einer optischen Kohärenztomographie (OCT) dar; (b) zeigt die segmentale Netzhautschichtung durch die DiOCTA-Software; GCL: Ganglienzellschicht, INL: innere Körnerschicht, IPL: innere plexiforme Schicht, ISe: Elipsoidband, ONL: äußere Körnerzellschicht, OPL: äußere plexiforme Schicht, PIS: Photorezeptorschicht - Innensegment, POS: Photorezeptorschicht – Außensegment, RNFL: retinale Nervenfaserschicht, RPE: retinales Pigmentepithel

### 2.4.5 Elektretinogramm (ERG)

Das Elektretinogramm ist eine klinische Untersuchungsmethode zur Darstellung der Funktion der Netzhaut über Potenzialmessungen. Hierzu wird eine Elektrode an der Hornhaut oder der Bindehaut befestigt, während eine weitere Referenzelektrode über die Haut abgeleitet wird. Ein Elektretinogramm wird im dunkel- und im helladaptierten Zustand durchgeführt. Das Potenzial des helladaptierten Zustands wird den Zapfen (photopisches ERG), jenes des dunkeladaptierten Zustands den Stäbchen (skotopisches ERG) zugeordnet. Physiologischerweise treten bei einem normalen ERG eine a-Welle (Photorezeptorzellen), b-Welle (Bipolar- und Müllerzellen) und eine c-Welle (Pigmentepithel) auf. Dabei können die Potenziale für die Stäbchen und Zapfen getrennt voneinander erfasst werden. Weitere Sonderformen stellen das Muster-ERG und das multifokale ERG dar. Das Muster-ERG ermittelt die Reizweiterleitung für die Ganglienzellen, während ein multifokales-ERG die Potenziale in der Makula orts aufgelöst zuordnen kann [73, 83, 39].

### 2.4.6 Farbsehtauglichkeitsprüfung

Die Farbwahrnehmung der Patienten dieser Arbeit wurde durch den Farnsworth-Munsell-Panel-D15 Test untersucht. Im Rahmen dieses Untersuchungsverfahrens müssen Patienten 15 verschiedenfarbige Scheibchen entsprechend ihrer Farbe in die richtige Reihenfolge sortieren. Auf diese Weise können in kurzer Zeit Störungen der Farbwahrnehmung erfasst werden. Zusätzlich können auftretende Verwechslungen einer der drei Farbachsen (rot = Protanachse, grün = Deutanachse, blau = Tritanachse) zugeordnet werden. Der Farnsworth-Munsell-Panel-D15 Test wird in zwei Versuchsdurchgänge unterteilt. Im ersten Durchgang werden gesättigte (saturierte), im zweiten Teil ungesättigte (desaturierte) Farben verwendet [39, 57, 125].

### 2.4.7 Gesichtsfeldanalyse

Für die als Perimetrie bezeichnete Gesichtsfeldanalyse stehen eine Vielzahl verschiedener Untersuchungsgeräte zur Verfügung. In dieser Arbeit wurden die Patienten mit einem Kugelperimeter nach Goldmann getestet. Lichtmarken verschiedener Größe und Leuchtdichte werden nacheinander und für jedes Auge einzeln auf eine Halbkugel projiziert. Der Patient gibt mit einem Signalknopf an, zu welchem

Zeitpunkt er die Lichtmarke erkennt. Die Verbindungslinie zwischen den ermittelten Gesichtsfeldpunkten der gleichen Empfindlichkeit wird als Isopter bezeichnet. Die Grenzen eines Gesichtsfelds hängen unter anderem von der anatomischen Lage des Bulbus und des Oberlids, oder von dem Tragen einer Brille ab.

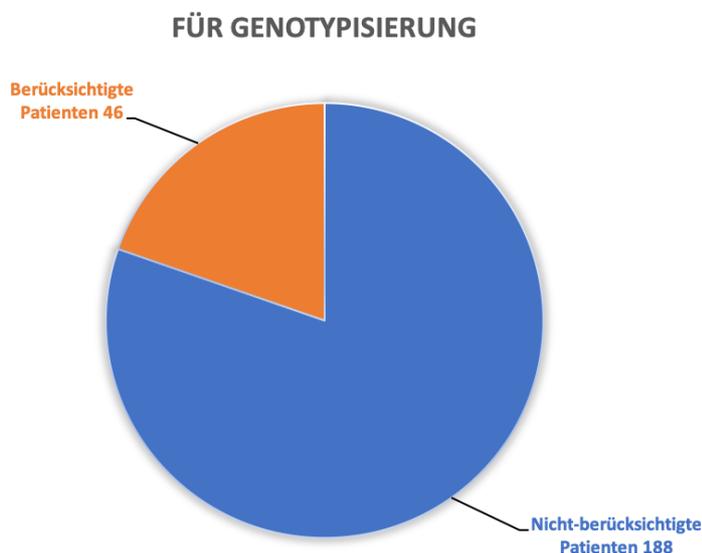
Inselförmige Ausfälle innerhalb eines Gesichtsfelds werden als Skotome bezeichnet. Diese können Folgen einer Störung der Makula, der Sehbahn oder der brechenden Medien sein. Die Gesichtsfeldanalyse und das Auftreten etwaiger Skotome veranschaulichen die Progression einer Erkrankung und sind daher besonders für das Monitoring geeignet [59, 100].

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Auswahl des Patientenkollektivs

Wie in Kapitel 2.1 dargestellt, wurden im Rahmen dieser Studie die klinischen Daten von insgesamt 241 Patienten hinsichtlich des Phänotyps einer North-Carolina-Macular-Dystrophy (NCMD) retrospektiv beurteilt. Diese Patienten wurden aufgrund ihrer Eingangsdignose mit Zapfendystrophie (COD), Zapfen-Stäbchen-Dystrophie (CRD), Central-Areolar-Choroidal-Dystrophie (CACD), Makuladegenerationen (MD) und North-Carolina-Macular-Dystrophie (NCMD) ausgewählt.

Beim Vorscreening des Patientenkollektivs wurden die digitale Fundusphotographie, die Fundusautofluoreszenz und die Optische-Kohärenztomographie (OCT) bewertet. Ausgeschlossen wurden diejenigen Patienten, bei denen bereits eine Sequenzvariation in einem anderen Gen (z.B. *ABCA4*) nachgewiesen wurde. Zudem wurden Patienten, bei denen eine unzureichende phänotypische Datenlage vorlag oder keinerlei DNA-Proben für die genotypischen Analysen vorhanden waren, nicht berücksichtigt. Je Familie wurde zunächst ein Indexpatient zur Genotypisierung ausgewählt. Für die nachfolgende Genotypisierung wurden 46 Indexpatienten selektiert und molekulargenetisch untersucht.



**Abbildung 3-1: Auswahl des Patientenkollektivs**

orange: Anteil der Patienten zur weiteren Genotypisierung; blau: Ausgeschlossen aufgrund nachgewiesener anderweitiger genetischer Ursache oder unzureichender Datenlage

## 3.2 Genotypisierung von Patienten auf Sequenzveränderungen in *PRDM13* und *IRX1*

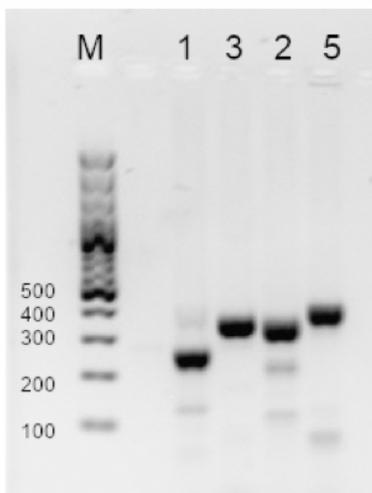
### 3.2.1 Sequenzvarianten in der Promotor-Kontroll-Region von *PRDM13*

Im Zusammenhang mit der NCMD wurde in bisherigen Veröffentlichungen über Sequenzvarianten in der Promotor-Kontroll-Region des *PRDM13*-Gens berichtet [111]. In der nachfolgenden Untersuchung wurde geprüft, ob diese oder weitere Sequenzvariationen in den ausgewählten Patienten nachweisbar waren.

#### 3.2.1.1 Genotypisierung der Patienten-DNA

Im ersten Schritt wurden von insgesamt 46 Indexpatienten die Promotor-Kontroll-Region des *PRDM13*-Gens mithilfe einer PCR (vgl. Kapitel 2.3.1) in vier Fragmenten amplifiziert. Hierfür wurden die vier Primerpaare *PRDM13*-DHS-1, -2, -3 und -5 verwendet (Tabelle 2-8), die der Literatur entnommen wurden [111].

Produkte aus der Polymerase-Kettenreaktion wurden in einer Agarose-Gelelektrophorese (vgl. Kapitel 2.3.2) aufgetrennt und durch das NucleoSpin® Extract II isoliert (vgl. Kapitel 2.3.3).



**Abbildung 3-2: PCR-Amplifikation der Promotor-Kontroll-Region von *PRDM13***

M: GeneRuler 100 bp DNA Ladder mit Markierungsbanden (100 – 500 bp beschriftet), 1-3-2-5: PCR-Amplifikate entsprechend der Primerpaare aus Tabelle 2-8 mit Banden in den erwarteten Größen 1: 264 bp, 3: 365 bp, 2: 345 bp, 5: 408 bp, für einen Indexpatienten.

Die Basensequenz der Amplifikate wurde mithilfe einer Sanger-Sequenzierung in einem externen Labor bestimmt (vgl. Kapitel 2.3.9). Im Falle des Nachweises von Sequenzvariationen bei einem Indexpatienten wurden weitere verfügbare Familienangehörigen hinsichtlich der identifizierten Sequenzvariante untersucht. Es wurden sieben Familienangehörige segregiert, sodass insgesamt 53 Patienten genotypisiert wurden.

Tabelle 3-1: Sequenzvarianten in der Promotor-Kontroll-Region von *PRDM13*

Sequenz-variante	Lokalisation	Index-patient-en	absolute Häufig-keit <sup>1</sup>	relative Häufig-keit <sup>2</sup>	Datenbank
M1	g.6:100.040.510 A>C	4x	5x	9,4 %	gnomeAD dbSNP (rs78020512)
M2	g.6:100.040.453 G>C	3x	3x	5,7 %	gnomeAD dbSNP (rs117637134)
M3	g.6:100.040.987 G>C	2x	6x	11,3 %	V2 [111]
M4	g.6:100.041.011 T>A	7x	8x	15,1 %	gnomeAD dbSNP (rs79450474)
M5	g.6:100.041.341 C>A	17x	22x	41,5 %	gnomeAD dbSNP (rs1908140)

Legende:

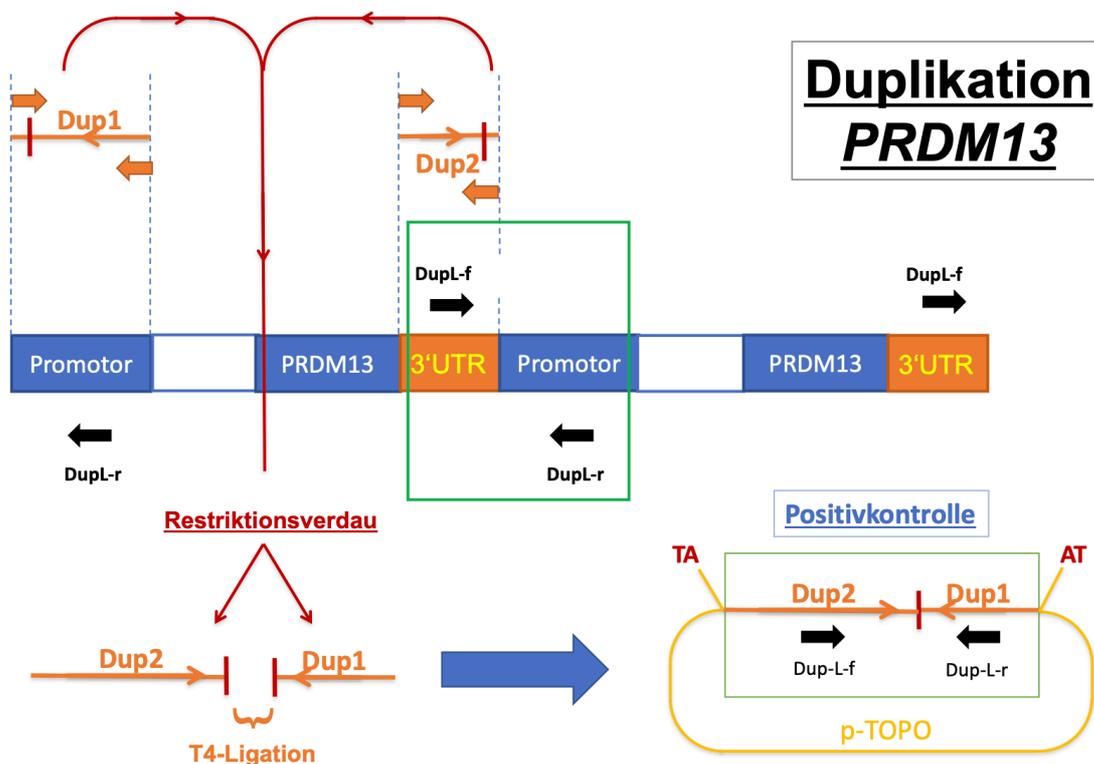
<sup>1</sup> = nach durchgeführter Segregation, <sup>2</sup> = Quotient aus absoluter Häufigkeit und Gesamtanzahl genotypisch untersuchter Patienten in diesem Patientenkollektiv

Es konnten bei 23 von 46 Indexpatienten eine oder mehrere Sequenzvariationen (M1 – M5) in der Promotor-Kontroll-Region des *PRDM13*-Gens identifiziert werden. Eine Segregation konnte in sieben verfügbaren Familienangehörigen eines jeweiligen Indexpatienten bestätigt werden. Neun Patienten wiesen mehr als eine Sequenzvariante auf. Die in zwei Indexpatienten vorgefundene Sequenzvariante M3 wurde in bisherigen Veröffentlichungen als V2 in direkten Zusammenhang mit der NCMD gebracht [111]. Jeder Patient mit einer M3 Variante besaß zusätzlich eine M5 Variante. Die Sequenzvarianten M1, M2, M4 und M5 sind online in der gnomeAD -Datenbank bereits beschrieben. Die Sequenzvariante M5 trat in diesem Patientenkollektiv mit einer relativen Häufigkeit von 41,5 % mit Abstand am häufigsten auf.

### 3.2.2 Copy Number Variations (CNV) in *PRDM13* und *IRX1*

Unter den publizierten Patienten mit einer NCMD wurden die Genduplikationen V4-7 (Tabelle 1-1) in *PRDM13* und *IRX1* vorgefunden [25, 37, 42]. Um das in dieser Arbeit untersuchte Patientenkollektiv auf das Vorhandensein dieser Duplikationen zu prüfen, wurden zunächst Positivkontrollen für *PRDM13* und *IRX1* etabliert. Die folgenden Schritte beziehen sich auf die Herstellung der Positivkontrolle für *PRDM13* und wurden analog für *IRX1* angewendet.

#### 3.2.2.1 Herstellung von Positivkontrollen zum Nachweis von CNV in *PRDM13* und *IRX1*



**Abbildung 3-3: Herstellung der CNV-Positivkontrolle in *PRDM13***

Dup1: PCR-Produkt am 5'-Ende der Promotor Region, Dup2: PCR-Produkt am 3'-UTR-Ende, DupL-f: forward Primer, DupL-r: reverse Primer: PCR-Produkt wird nur bei Duplikation synthetisiert, Restriktionsverdau: Restriktionsschnitt durch *SmaI*, Positionen von Dup2 und Dup1 wurden getauscht, T4-Ligation: Ligation von Dup2 und Dup1 *head-to-tail*, p.TOPO: pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>-Vektor mit Insert Dup2-Dup1

Die Besonderheit an diesem selbst entwickelten Verfahren ist, dass der Forward-Primer DupL-f im 3'UTR des Gens bindet, während sich der Reverse-Primer DupL-r dem 5'-Promotorende anlegt. Sie sind also gegensätzlich orientiert. Ein PCR-Produkt von den DupL Primer entsteht nur dann, wenn das *PRDM13*-Gen dupliziert vorliegt.

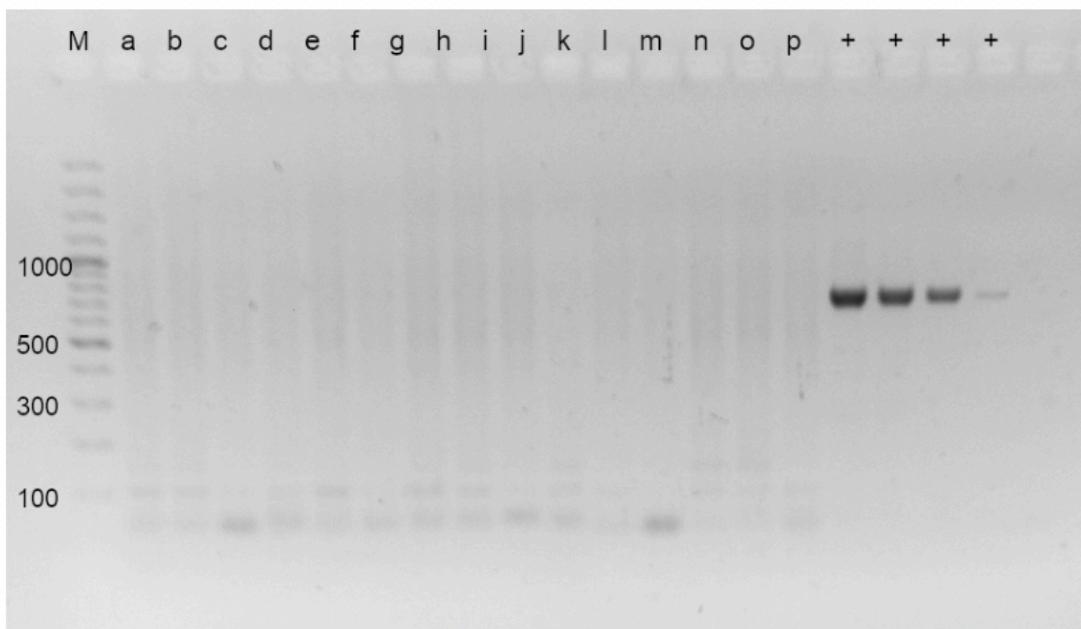
Zuerst wurden mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (vgl. Kapitel 2.3.1) und spezifisch ausgewählten Primer Dup1 und Dup2 (Tabelle 2-8) zwei DNA-Fragmente hergestellt. Es handelt sich um eine Kopie der Sequenz des *PRDM13*-Gens am 5'-Ende innerhalb der Basic-Promotor Region des Gens und um eine Kopie der Sequenz des 3'-Endes des *PRDM13*-Gens innerhalb des 3'-UTR. Die PCR-Produkte der beiden Enden des *PRDM13*-Gens wurden als Dup1 und Dup2 gekennzeichnet. Unter Verwendung des Restriktionsenzym *SmaI* (vgl. Kapitel 2.3.4, Tabelle 2-7) wurden die PCR-Produkte Dup1 und Dup2 mit glatten Enden (*blunt-ends*) versehen. Hierbei wurde Dup1 in der Nähe seines 5'-Endes und Dup2 nahe seines 3'-Endes geschnitten. Zur Inaktivierung und Überprüfung des Erfolgs des Restriktionsenzymverdaus wurden die Proben auf ein 2%-Agarose Gel aufgetragen (vgl. Kapitel 2.3.2) und anschließend mithilfe des Kits NucleoSpin® Extract II aufgereinigt (vgl. Kapitel 2.3.3). Dank der *blunt-ends* konnten die ursprünglichen Positionen der Ausgangsprodukte vertauscht werden und mithilfe einer T4-Ligase (vgl. Kapitel 2.3.5) *head-to-tail* verknüpft werden. Im Anschluss an die Ligation wurde der Ligationsansatz als DNA für eine Gradienten-PCR (vgl. Kapitel 2.3.1) verwendet. Hierbei wurde eine Annealingtemperatur in einem Bereich von 53 - 65 °C gewählt, um das Temperaturoptimum der DupL (Tabelle 2-8) Primer zu ermitteln. Die PCR-Produkte des Ligationsansatz wurden wiederum auf ein 2%-Agarose Gel aufgetragen und anschließend mithilfe des Kits NucleoSpin® Extract II aufgereinigt. Im nächsten Schritt wurde das isolierte PCR-Produkt des Ligationsansatzes als Insert in einer TA-Klonierung (vgl. Kapitel 2.3.6.1) mithilfe des pCR®2.1-TOPO®-Vektors (vgl. Kapitel 2.2.3.1) in die elektrokompenten TOP 10-Zellen transformiert (vgl. Kapitel 2.3.6.2, Tabelle 2-4), um eine große Menge des Plasmids als Positivkontrolle zu erhalten. Nach Vervielfältigung des gewünschten Plasmids wurde dieses durch eine Mini-Präparation (vgl. Kapitel 2.3.7.1) aus den TOP 10-Zellen wieder gewonnen. Zur Prüfung des Klonierungserfolgs erfolgte eine Sanger-Sequenzierung (vgl. Kapitel 2.3.9) durch ein externes Labor. Ein geeigneter Klon wurde als Positivkontrolle verwendet, um die DNA der Indexpatienten auf die Duplikation des *PRDM13*-Gens zu testen.

Die Herstellung der Positivkontrolle zur Überprüfung einer CNV von *IRX1* verlief nach dem gleichen Prinzip wie für *PRDM13*. Die hierfür vorgesehenen Primer I-Dup1, I-Dup2 und I-DupL sind in Tabelle 2-8 aufgelistet. Als Restriktionsenzym wurde ebenfalls *SmaI*

verwendet. Der Erfolg der Klonierung wurde durch eine Sanger-Sequenzierung bestätigt (vgl. Kapitel 2.3.9). Für eine dauerhafte Archivierung der etablierten Positivkontrollen wurde jeweils ein Glyzerinstock (vgl. Kapitel 2.3.8) angelegt.

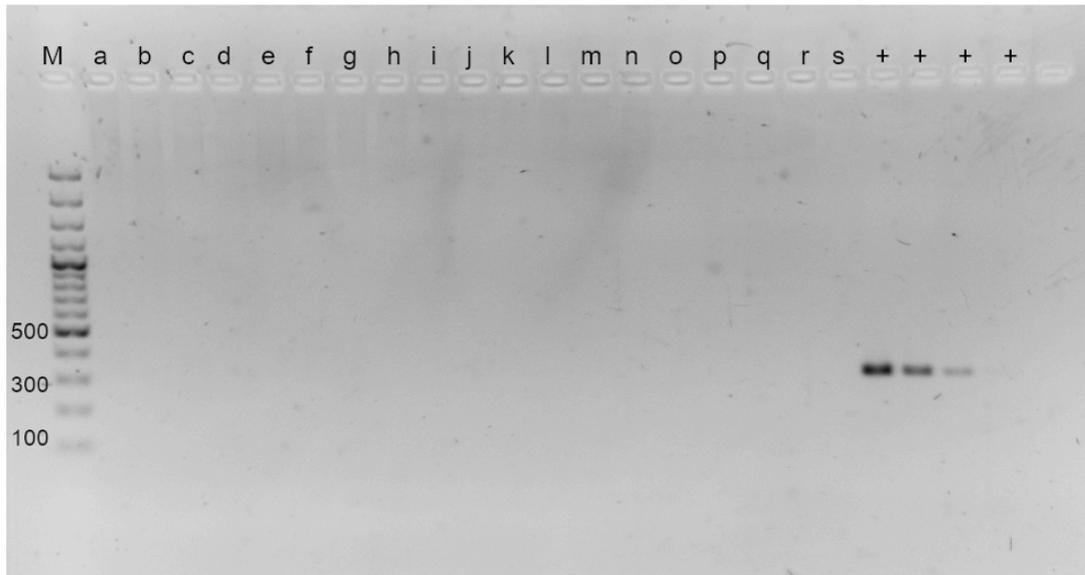
### 3.2.2.2 Duplikationsanalyse der Patienten

Es wurden insgesamt 46 Indexpatienten auf das Vorhandensein einer Copy-Number-Variation in *PRDM13* oder *IRX1* getestet. Die Abbildung 3-4 zeigt die Testung von 16 Indexpatienten hinsichtlich einer *PRDM13*-Duplikation. Die Abbildung 3-5 stellt die Testung von 19 Indexpatienten einer *IRX1*-Duplikation dar. Die Positivkontrollen wurden als jeweilige Verdünnungsreihe für *PRDM13* und *IRX1* amplifiziert. Als Startkonzentrationen der Verdünnungsreihen in *PRDM13* und *IRX1* wurden 0,001 ng/ $\mu$ l gewählt und jeweils um den Faktor 10 verdünnt. Eine Konzentration von kleiner als 0,000001 ng/ $\mu$ l konnte nicht mehr nachgewiesen werden. Es konnte bei keinem der 46 untersuchten Indexpatienten ein PCR-Produkt für *PRDM13* oder *IRX1*- amplifiziert werden.



**Abbildung 3-4: Testung auf *PRDM13*-Duplikation**

M: GeneRuler 100 bp DNA Ladder mit Markierungsbanden 100 – 1000 bp; a – p: 16 Indexpatienten auf Duplikation getestet, +: Positivkontrolle als Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen: 0,001 ng/ $\mu$ l – 0,000001 ng/ $\mu$ l (Faktor 10 Verdünnung)



**Abbildung 3-5: Testung auf IRX-Duplikation**

M: GeneRuler 100 bp DNA Ladder mit Markierungsbanden 100 – 1000 bp; a – s: 19 Indexpatienten auf Duplikation getestet, +: Positivkontrolle als Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen: 0,001 ng/μl – 0,000001 ng/μl (Faktor 10 Verdünnung)

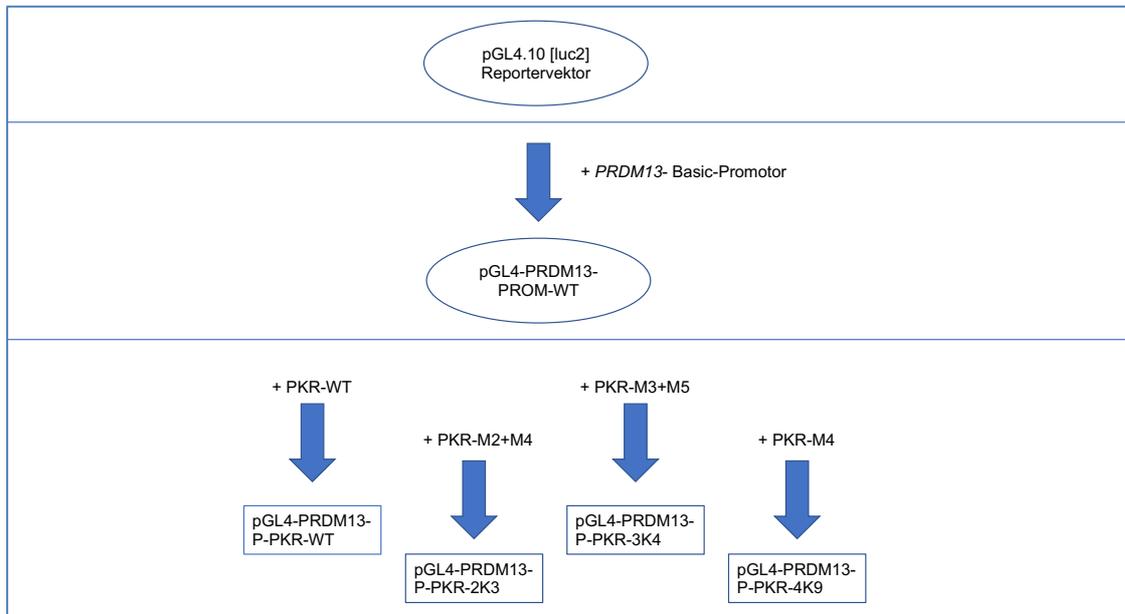
### 3.2.3 Untersuchung der Wirkung der Sequenzvariationen der Promotor-Kontroll-Region auf die Genexpression des *PRDM13*-Gens

#### 3.2.3.1 Überblick

In dieser Messung sollte der Einfluss der Sequenzvarianten, welche in der Tabelle 3-1 aufgelistet sind, hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Expression von *PRDM13* untersucht werden. Hierfür wurde in dieser Arbeit ein Luciferase-Reporterassay entwickelt, der im Folgenden detailliert vorgestellt wird. Als grundlegender Vektor diente der pGL4.10 [luc2] Reportervektor (vgl. Abbildung 2-2). Zunächst wurde in den pGL4.10 [luc2] Reportervektor der Basic-Promotor und anschließend die Promotor-Kontroll-Region (PKR) des *PRDM13*-Gens einkloniert. Dabei wurde die PKR zum einen sequenzvariationsfrei als Wildtyp (WT) und zum anderen mit verschiedenen Sequenzvarianten in jeweils separate Vektoren einkloniert. Abschließend konnte der Einfluss der Konstrukte auf die Expression des *PRDM13*-Gens durch Generierung der Firefly-Luciferase quantifiziert und abgeglichen werden (vgl. Kapitel 2.3.11).

In diesem Ansatz wurden folgende Konstrukte erfolgreich hergestellt und geprüft:

- Wildtyp (WT): als sequenzvariationsfreier Referenzwert
- Klon 2K3: inkl. der Sequenzvariation M2 + M4
- Klon 3K4: inkl. der Sequenzvariation M3 + M5 (M3 = V2)
- Klon 4K9: inkl. der Sequenzvariation M4



**Abbildung 3-6: Herstellung des pGL4-PRDM13-P-PKR**

Als Ausgangsvektor diente der pGL4.10 [luc2] Reportervektor. Zuerst wurde die PRDM13-Promotor Region inkloniert. Anschließend wurde die Promotor-Kontroll-Region als Wildtyp oder mit verschiedenen Sequenzvarianten in den pGL4-PRDM13-PROM-WT inkloniert.

### 3.2.3.2 Klonierung des Basic-Promotors

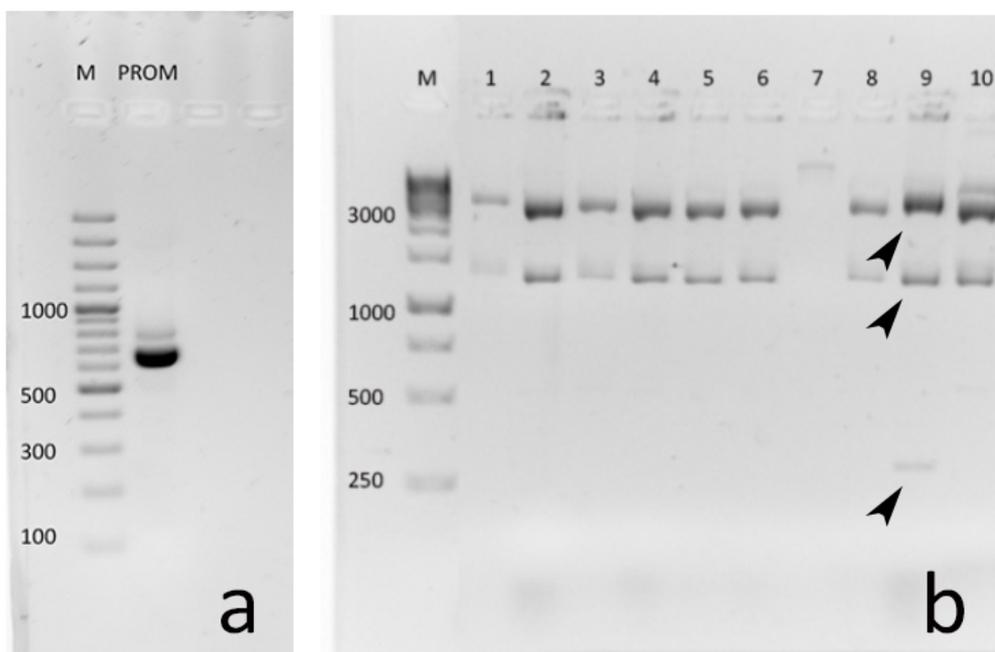
Im ersten Schritt wurde eine Amplifikation der Basic-Promotor Region des *PRDM13*-Gens durch eine PCR (vgl. Kapitel 2.3.1) mit den Primer PROM (Tabelle 2-8) durchgeführt. Dazu wurde die *Phusion-Taq*-Polymerase (Tabelle 2-7) verwendet. Die Produkte der PCR wurden durch eine Gelelektrophorese dargestellt (vgl. Kapitel 2.3.2) und mithilfe des Nucleospin Gel PCR Clean-up Kits (vgl. 2.3.3) aufgereinigt (vgl. Abbildung 3-7).

Zur weiteren Verarbeitung wurde ein Adenin-Überhang durch folgenden Ansatz ergänzt:

- Inkubation: 1 Stunde, 72 °C

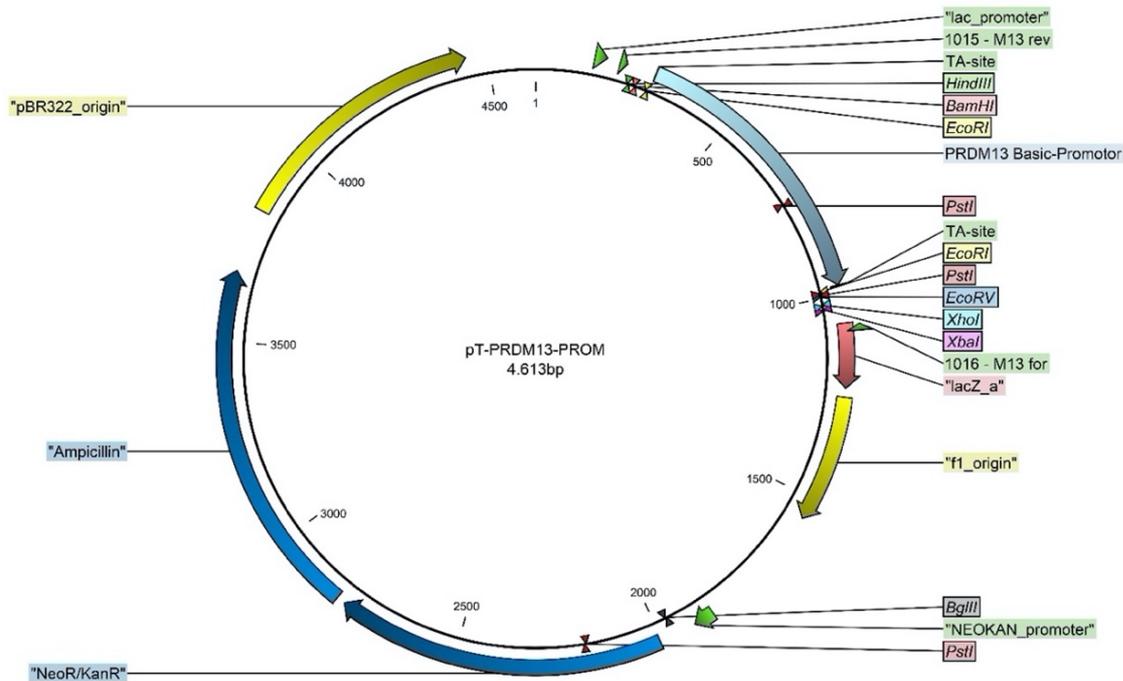
PCR-PRDM13-Prom <sub>SmaI,SacI</sub>	5,2 µl
Go-Taq-Polymerase	0,1 µl
Polymerase-Puffer	2 µl
dNTPs (0,125mM)	1,6 µl
<u>MgCl<sub>2</sub> (25mM)</u>	<u>1,2 µl</u>
Gesamt	10,1 µl

Im Anschluss wurde eine TA-Klonierung (vgl. Kapitel 2.3.6.1) und eine Transformation (vgl. Kapitel 2.3.6.2) in elektrokompente TOP 10 Zellen durchgeführt. Die Plasmide wurden durch eine Minipräparation (vgl. Kapitel 2.3.7.1) freigesetzt und mit dem Restriktionsenzym *PstI* (Tabelle 2-7) verdaut. Bei erfolgreicher Klonierung besaß der gewünschte Klon eine zusätzliche dritte *PstI*-Schnittstelle, sodass ein kleines Fragment von 248 bp entstand (vgl. Abbildung 3-7 b und Abbildung 3-8). Abschließend wurde die Basensequenz des Inserts durch eine Sanger-Sequenzierung bestimmt (vgl. Kapitel 2.3.9). Der Klon 9 wurde auserwählt und als pT-PRDM13-PROM bezeichnet.



**Abbildung 3-7: Klonierung der Basic Promotor Region von PRDM13**

(a) zeigt die PCR-Amplifikation mit den Primerpaar PROM (Tabelle 2-8), erwartete Bandengröße = 682 bp; (b) zeigt den Nachweis des geklonten Konstrukts in Kapitel 3.2.3.2 durch einen *PstI*-Verdau, Klon 9 (mit Pfeilen markiert) besitzt die erwarteten Bandengrößen = 3175 bp, 1190 bp, 248 bp

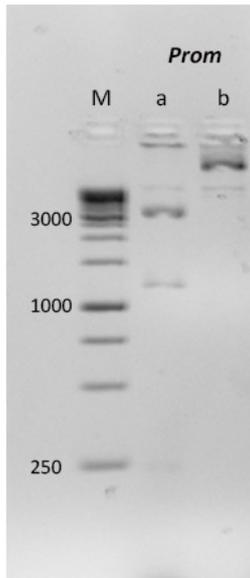


**Abbildung 3-8: pT-PRDM13-PROM**

*PRDM13*-Basic-Promotor: Basic-Promotor Region des *PRDM13*-Gens; Restriktionschnittstellen: *XhoI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *BglII*, *HindIII*, *XbaI*, *BamHI*, *PstI*; M13 (for, rev): Sequenzierprimerbindungsstellen; *lacZ\_a*:  $\beta$ -Galactosidase Gen, *lac\_promotor*: Promoter für *lacZ\_a*; Ampicillin, NeoR/KanR: Antibiotikaresistenzgene; NEOKAN\_promotor: Promotor für NeoR/KanR; pBR322\_origin: Replikationsursprung

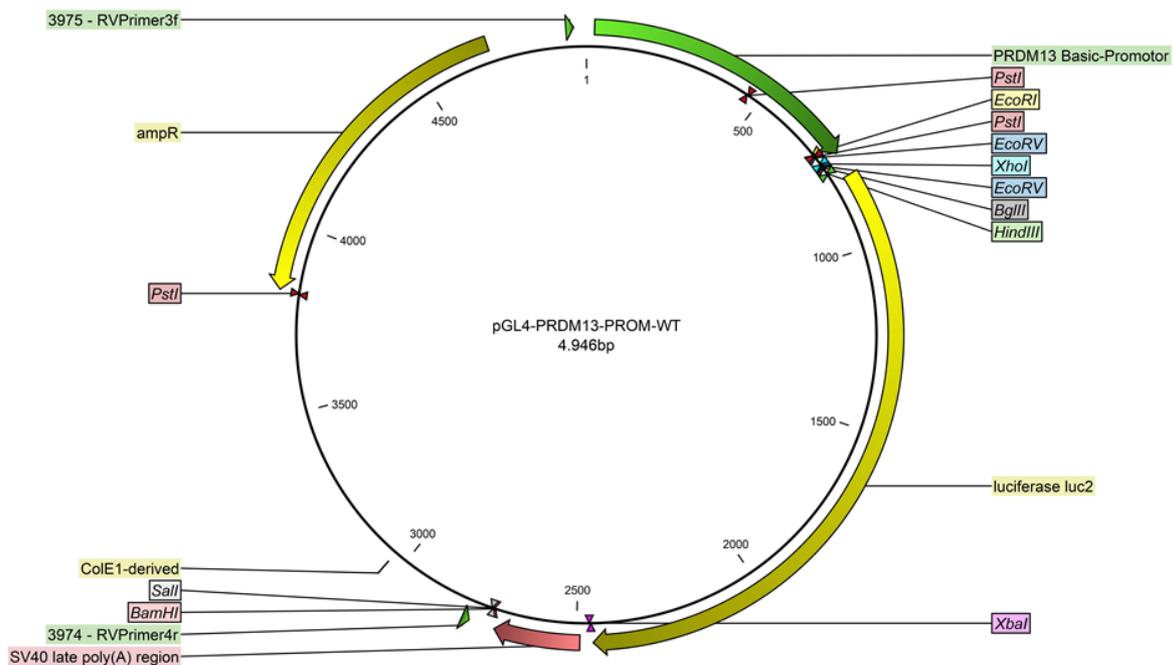
### 3.2.3.3 Klonierung der Basic-Promotor Region in den pGL4.10 [luc2] Reportervektor

Um den pT-PRDM13-PROM (vgl. Kapitel 3.2.3.2) in das pGL4.10 [luc2] Reporterplasmid (vgl. Abbildung 2-2) einzuklonieren, wurden beide Konstrukte mit den Restriktionsenzymen *SacI* und *XhoI* verdaut (vgl. Kapitel 2.3.4, Tabelle 2-7). Anschließend wurden aufgrund der gemeinsamen Schnittstellen das Plasmid pT-PRDM13-PROM-WT und das pGL4.10 [luc2] Reporterplasmid zusammen ligiert (vgl. Kapitel 2.3.5). Das Ligationsprodukt wurde wie im vorherigen Abschnitt in elektrokompente TOP 10-Zellen transformiert (vgl. Kapitel 2.3.6.2), die Klone präpariert (vgl. Kapitel 2.3.7.1), mit *PstI* verdaut (vgl. Kapitel 2.3.4, Abbildung 3-9) und sequenziert (vgl. Kapitel 2.3.9). Als Ergebnis dieses Schrittes lag das pGL4-PRDM13-PROM-WT Plasmid vor, welches die Promotorsequenz des *PRDM13*-Gens enthält.



**Abbildung 3-9: Promotor in pGI4 [luc2] Reporterplasmid**

Die Abbildung zeigt den Nachweis des geklonten Konstrukts in Kapitel 3.2.3.3 durch einen *PstI*-Verdau. a = Konstrukt verdaut, Bandengrößen = 3292 bp, 1499 bp, b = Konstrukt unverdaut.

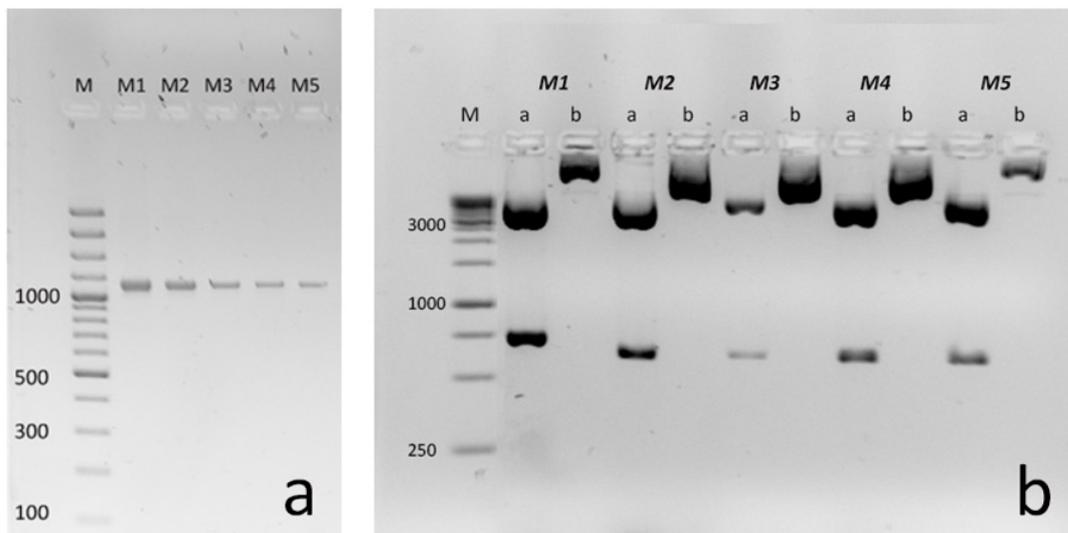


**Abbildung 3-10: pGL4-PRDM13-PROM-WT**

*PRDM13*-Basic-Promotor: Basic-Promotor Region des *PRDM13*-Gens; Restriktionsschnittstellen: *XhoI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *BglII*, *HindIII*, *XbaI*, *BamHI*, *Sall*, *PstI*; ampR: Antibiotikaresistenzgen für Ampicillin; 3974-RVPrimer4r, 3975-RVpRimer3f: Sequenzierprimerbindungsstellen; luciferase luc2: Luciferase-Reporter-Gen; ColE1-derived: Gen für ColicinE1

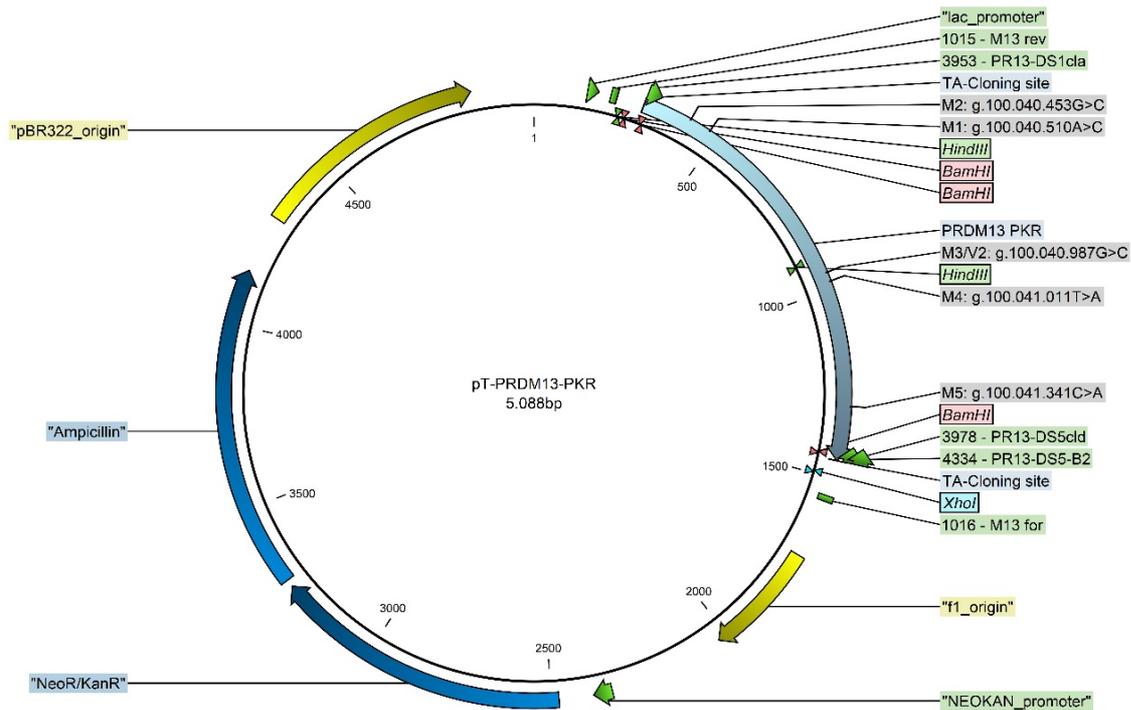
### 3.2.3.4 Klonierung der Promotor-Kontroll-Region (PKR)

Analog zu der Basic-Promotor Region wurde ein PCR-Produkt der Promotor-Kontroll-Region (PKR) des *PRDM13*-Gens als Wildtyp (WT) durch eine PCR (vgl. Kapitel 2.3.1) mit den entsprechenden Primer PKR (Tabelle 2-8) hergestellt. Zusätzlich wurden Kopien der Promotor-Kontroll-Region inklusive verschiedener Sequenzvarianten (vgl. Tabelle 3-1) als separate Konstrukte hergestellt (vgl. Abbildung 3-11a). Hierfür wurde die DNA von Patienten verwendet, die die gewünschten Sequenzvarianten aufwiesen. Die PCR-Produkte wurden zunächst über die TA-Klonierung (vgl. Kapitel 2.3.6.1) in die TOP 10 Zellen transformiert (vgl. Kapitel 2.3.6.2) und anschließend präpariert (vgl. Kapitel 2.3.7.1). Getestet wurden die Plasmide mit einem *HindIII*-Restriktionsverdau (vgl. Kapitel 2.3.4, Tabelle 2-7, Abbildung 3-11) und anschließender Sanger-Sequenzierung (vgl. Kapitel 2.3.9). Durch die Klonierung der Promotor-Kontroll-Region wird eine zusätzliche *HindIII*-Schnittstelle in den pCR2.1®-TOPO®-TA Klonierungsvektor eingefügt (vgl. Abbildung 3-11 und Abbildung 3-12).



**Abbildung 3-11: Klonierung Promotor-Kontroll-Region von *PRDM13***

(a) zeigt die PCR-Amplifikation der Sequenzvarianten M1-M5 mit Primer PKR (Tabelle 2-8), Bandengröße = 1157 bp; (b) zeigt den Nachweis des geklonten Konstrukts in Kapitel 3.2.3.4 durch einen *HindIII*-Verdau, a = Konstrukt verdaut, Bandengrößen = 4416 bp, 672 bp, b = Konstrukt unverdaut.



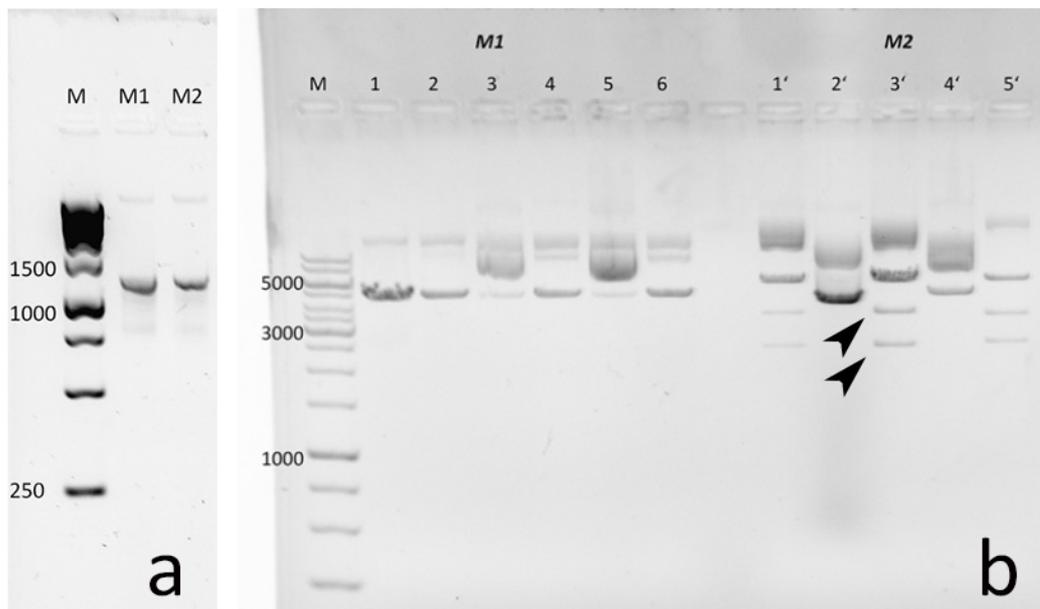
**Abbildung 3-12: pT-PRDM13-PKR**

PRDM13-PKR: Insert der Promotor-Kontroll-Region von *PRDM13*; Sequenzvarianten M1- M5 entsprechend Tabelle 3-1; Restriktionsschnittstellen: *XhoI*, *HindIII*, *BamHI*; Sequenzierprimerbindungsstellen: 1015-M13-rev, 1016-M13-for, 3953-PR13DS1cla, 4334-PR13DHS5b2, 3978-PR13-DS5cld, ; lacZ\_a:  $\beta$ -Galactosidase Gen, lac\_promotor: Promoter für lacZ\_a; Ampicillin, NeoR/KanR: Antibiotikaresistenzgene; NEOKAN\_promotor: Promotor für NeoR/KanR; pBR322\_origin: Replikationsursprung

### 3.2.3.5 Klonierung der Promotor-Kontroll-Region (PKR) in das pGL4-PRDM13-PROM-WT Plasmid

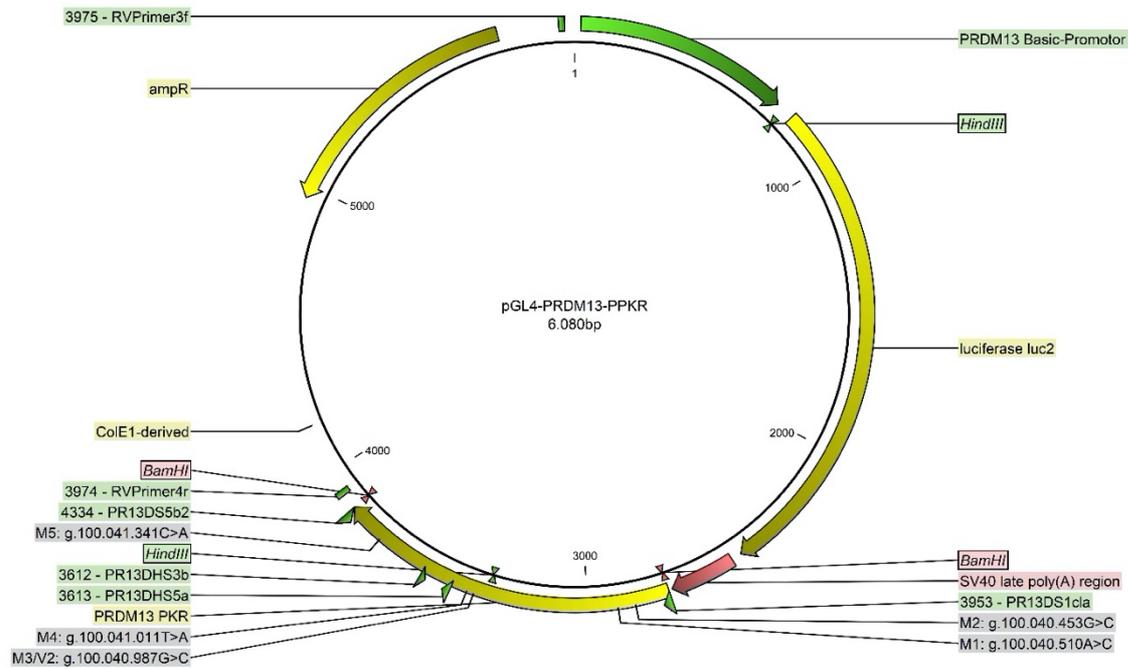
Die Promotor-Kontroll-Region (PKR) im pT-Vektor wurde mit den dazugehörigen Primer PCR-TO (Tabelle 2-8) über eine PCR amplifiziert (vgl. Kapitel 2.3.1, Abbildung 3-13a). Während der Forward-Primer der PCR-TO identisch zu dem Forward-Primer PKR ist, enthält der Reverse-Primer der PCR-TO im Unterschied zu dem Primer PKR eine *BamHI*-Schnittstelle. Diese Schnittstelle ermöglicht die Einklonierung der Promotor-Kontroll-Region in den pGL4-PRDM13-PROM-WT. Dazu wurden die jeweiligen PCR-Produkte und das pGL4-PRDM13-PROM-WT Plasmid zunächst mit *BamHI* verdaut (vgl. Kapitel 2.3.4 und Tabelle 2-7). Im Anschluss wurde der pGL4-PRDM13-PROM-WT Vektor mit der Promotor-Kontroll-Region als WT oder inklusive der Sequenzvarianten (Tabelle 3-1) ligiert (vgl. Kapitel 2.3.5). Damit sich der Vektor pGL4-PRDM13-PROM-WT

nicht mit sich selbst ligiert, wurde diesem vor der T4-Ligation die *Shrimp-Alkaline-Phosphatase rSAP* (Tabelle 2-7) zugesetzt. Wiederum über eine TA-Klonierung wurde das ligierte Konstrukt in elektrokompetente TOP 10 Zellen transformiert (vgl. Kapitel 2.3.6.2), die Klone präpariert (vgl. Kapitel 2.3.7.1), mit *HindIII* verdaut (vgl. Kapitel 2.3.4, Tabelle 2-7, Abbildung 3-13b) und sequenziert (vgl. Kapitel 2.3.9). Als Endprodukte konnten verschiedene pGL4-PRDM13-PPKR Plasmide hergestellt werden (vgl. Kapitel 3.2.3.1).



**Abbildung 3-13: Promotor-Kontroll-Region in pGL4-PRDM13-PROM-WT**

(a) zeigt die PCR-Amplifikation der PKR inkl. der Sequenzvarianten M1-M2 mit Primer PKR-TO (Tabelle 2-8), Bandengröße = 1157 bp; (b) zeigt den Nachweis des geklonten Konstrukts in Kapitel 3.2.3.5 durch einen *HindIII*-Verdau, Klon M2-3' besitzt die erwarteten Bandengrößen = 2558 bp, 3522 bp (markiert mit Pfeilen), die beiden größeren Banden von Klon M2-3' entsprechen unverdauten (zirkuläre) bzw. einfach geschnittenen (linearisierte) Plasmiden



**Abbildung 3-14: pGL4-PRDM13-PPKR Plasmid**

*PRDM13* Basic-Promotor: Sequenz der Basic-Promotor Region von *PRDM13*; *PRDM13*-PKR: Sequenz der Promotor-Kontroll-Region von *PRDM13*; Sequenzvarianten M1- M5 entsprechend Tabelle 3-1; Restriktionsschnittstellen: *HindIII*, *BamHI*; *ampR*: Antibiotikaresistenzgen für Ampicillin; Sequenzierprimerbindungsstellen: 3974-RVPrimer4r, 3975-RVPrimer3f, 3612-PR13DHS3b, 3613-PR13DHS5a, 4334-PR13DHS5b2, 3953-PR13DS1cla; luciferase *luc2*: Luciferase-Reporter-Gen; ColE1-derived: Gen für ColicinE1;

### 3.2.3.6 One-step Luciferase-Assay

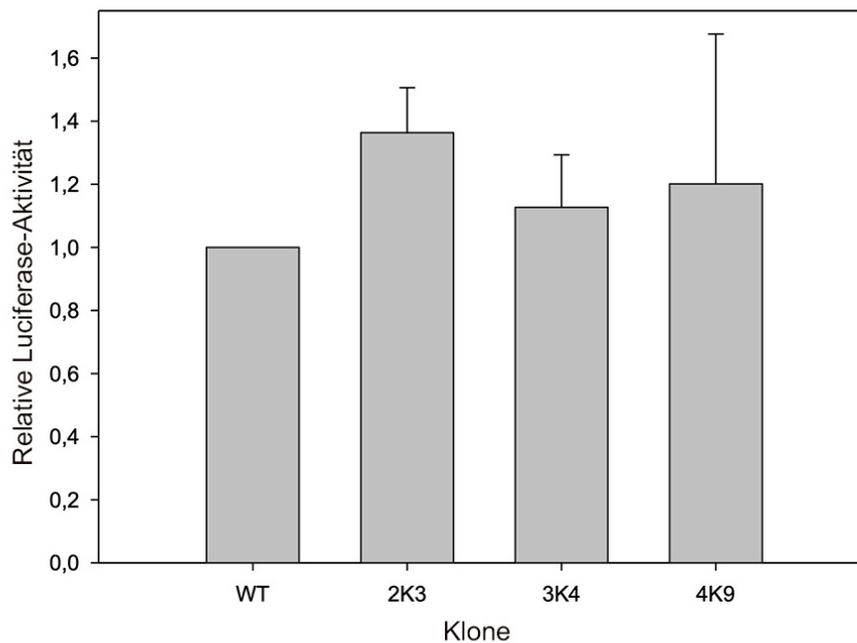
Der Luciferase-Assay wurde entsprechend des Kapitels 2.3.11 durchgeführt. Die Luciferase-Aktivität (Lumineszenz) quantifiziert die Promotorleistung des jeweiligen Konstrukts. Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Ansätze miteinander korreliert (vgl. Kapitel 3.2.3.1):

**Tabelle 3-2: Luciferase-Assay**

Konstrukt	Bestandteile
pGL4.10 [luc2] Reportervektor	Vektor ohne Insert
pGL4-PRDM13-PROM-WT	mit Basic-Promotor als WT
pGL4-PRDM13-P-PKR-WT	mit Basic-Promotor und PKR, beide als WT
pGL4-PRDM13-P-PKR-2K3	mit Basic-Promotor und PKR-Variante M2+M4
pGL4-PRDM13-P-PKR-3K4	mit Basic-Promotor und PKR-Variante M3+M5
pGL4-PRDM13-P-PKR-4K9	mit Basic-Promotor und PKR-Variante M4
Negativprobe	pT-PRDM13-PROM-WT

Mittels bereits genannter Plasmide wurde die Einflussnahme der Sequenzvarianten der PKR auf die Promotorregion des *PRDM13*-Gens untersucht. Unterdessen übernimmt der Promotor auch die Funktion als Indikator für die Genexpression eines Gens. Um den Promotor in seiner Funktion als steuerndes Element zu überprüfen, wurde die Luciferase-Aktivität des pGL4-PRDM13-PROM-WT gegenüber dem insertfreien pGL4.10 [luc2] Reportervektor erfasst. Analog wurde die Luciferase-Aktivität der pGL4-PRDM13-P-PKR-WT inklusive der PKR als WT gegenüber dem pGL4-PRDM13-PROM-WT ohne die PKR getestet. Schlussendlich wurde die Lumineszenz der PKR Sequenzvarianten mit dem PKR als WT verglichen. Als Negativprobe diente der Vektor pT-PRDM13-PROM-WT, der kein Luciferase-Gen beinhaltet. Der Luciferase-Assay wurde insgesamt dreimal wiederholt.

Der pGL4-PRDM13-PROM-WT besaß gegenüber dem pGL4.10 [luc2] Reportervektor eine 2,4-fach höhere Luciferase-Aktivität. Der pGL4-PRDM13-P-PKR-WT zeigte eine um 10% geringere Lumineszenz als der pGL4-PRDM13-PROM-WT. Die PKR Varianten 2K3, 3K4 und 4K9 wiesen allesamt eine höhere Luciferase-Aktivität gegenüber des PKR als WT auf (vgl. Abbildung 3-15).



**Abbildung 3-15: Testung der Aktivität der PRDM13- Promotor-Kontroll-Region**

Die Abbildung zeigt die relative Luciferase Aktivität der verschiedenen Konstrukte. Die Klone mit den Sequenzvarianten der *PRDM13*-PKR besaßen allesamt eine höhere Luciferase-Aktivität gegenüber der PKR als der Wildtyp. WT: pGL4-PRDM13-P-PKR-WT, 2K3: pGL4-PRDM13-P-PKR-2K3, 3K4: pGL4-PRDM13-P-PKR-3K4, 4K9: pGL4-PRDM13-P-PKR-4K9

### 3.3 Ergebnisse der Phänotypisierung

Insgesamt wurden 46 Indexpatienten und sieben angehörige Sequenzvariationsträger phänotypisch korreliert. Die segregierten Familienangehörige waren allesamt betroffen und wiesen ebenso Sequenzvarianten in ihrer Promotor-Kontroll-Region des *PRDM13*-Gens auf. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden im Folgenden sechs Patienten mit detektierten Sequenzvariationen aufgeführt. Hiervon sind die Patienten 2038.01, 2038.02 und 2038.03 miteinander verwandt. Die Tabelle 3-3 stellt eine Zusammenfassung der phänotypischen Ergebnisse dar.

Tabelle 3-3: Ergebnisse-Phänotypisierung

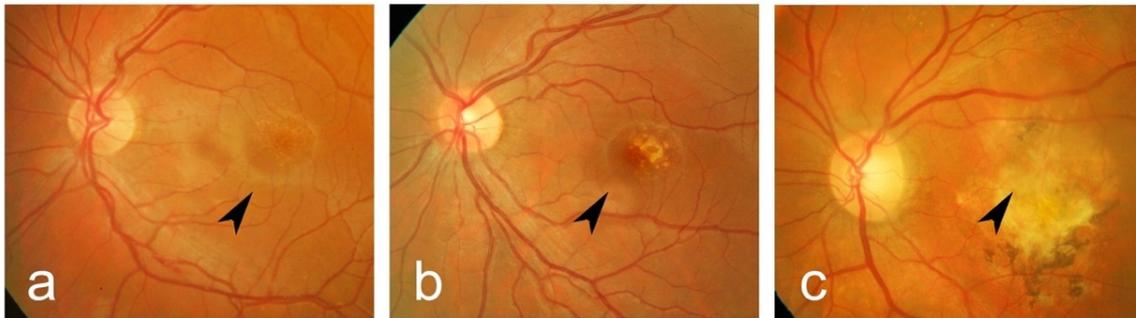
DNA Nummer	Alter (Jahre)	Sequenzvariante <sup>1</sup>	Visus (R/L) <sup>2</sup>	Refraktion (R/L)	Fundusphotographie	NCMD-Grade I – III <sup>3</sup>	Fundusauto-fluoreszenz (FAF) <sup>4</sup>	Optische Kohärenztomographie (OCT) <sup>5</sup>	Goldmann-GF <sup>6</sup>	Panel-D15	Ganzfeld-ERG	Multi-fokales-ERG
2038.01	52	M1 M3 M5	0,2/1,0	R: -1,5/-0,75/142° L: -0,25/-1,0/6°	R (f): N+++ L (f): N+++ R (p): D+ L (p): D+	III	R (f): ↓↓↓ L (f): ↓↓↓ R (p): Ø L (p): Ø	R: NH↓↓ RPE↓, INL↓ POS↓ PIS↓ L: NH↓↓, durchgehend	R: Ø L: Ø	R: des. eV L: des. eV	R: Ø L: Ø	R: Ampl. ↓ L: Ampl. ↓
2038.02	57	M3 M5	0,0/0,97	R: 2,0/-1,0/7° L: 2,0/-1,0/160°	R (f): D+ L (f): D+ R (p): Ø L (p): Ø	I - II	R (f): Ø L (f): ↓ R (p): Ø L (p): ↑	R/L: leichte Δ zw. PIS/ISe	R: dE L: dE	kA	kA	kA
2038.03	31	M3 M5	0,0/0,7	R: -0,5/-0,5/29° L: -0,25/-0,5/12°	R (f): D+ L (f): N++ R (p): D+ L (p): D+	III	R (f): Ø L (f): ↓↓ R (p): ↑ L (p): ↑↑	R/L: NH↓ RPE↓, INL↓ POS↓ PIS↓	R: Ø L: Ø	R: Ø L: des. mV	R: Ø L: Ø	R: Ø L: Ampl. ↓
2286.03	24	M1 M3 M5	0,0/0,0	R: 0,0/-2,25/24° L: 0,0/-3,0/164°	R (f): D+ L (f): D+ R (p): Ø L (p): Ø	I	R (f): Ø L (f): Ø R (p): Ø L (p): Ø	R/L: Ø	R: dE L: dE	R: sat. eV L: sat. eV	R: Ø L: Ø	R: Ø L: Ø
2109.01	45	M4	0,3/0,3	R: -4/-0,5/180° L: -3,25/-1,24/173°	R (f): N++ L (f): N++ R (p): D++ L (p): D++	III	R (f): ↓↓ L (f): ↓↓ R (p): ↑↑ L (p): ↑↑	R/L: NH↓ RPE↓ INL↓ POS↓ PIS↓	R: ZK L: ZK	R: des. mV L: des. mV	R: Ø L: Ø	R: Ampl. ↓ L: Ampl. ↓
2404.01	17	M5	0,52/1,0	R: -0,5/-0,25/4° L: 0,0/-0,5/162°	R (f): N+ L (f): N+ R (p): Ø L (p): Ø	II	R (f): ↓ L (f): ↓ R (p): ↑ L (p): ↑	R/L: NH↓ RPE↓ INL↓ POS↓ PIS↓	R: Ø L: Ø	R: sat. mV L: sat. mV	R: Ø L: Ø	R: Ampl. ↓ L: Ampl. ↓

Legende:

↓ = Reduzierung, ↑ = Zunahme, + = ausgeprägt, ++ = sehr ausgeprägt, Ampl. = Amplituden, D = Drusen, dE = dezente konzentrische Einengung, des. = desaturiert, f = foveal, N = makuläre Narbe, NH = Netzhautdicke, norm. = normwertig, kA = keine Angabe, eV = einzelne unspezifische Verwechslungen, L = linkes Auge, mV = multiple Verwechslungen, p = perifoveal, R = rechtes Auge, sat. = saturiert, ZK = Zentralskotom für die Prüfmarke III/4, Δ = Veränderung, Ø = ohne pathologischen Befund, <sup>1</sup> = vgl. Tabelle 3-1, <sup>2</sup> = Visuswerte in LogMAR, <sup>3</sup> = vgl. Abbildung 3-16, <sup>4</sup> = vgl. Abbildung 3-17, <sup>5</sup> = vgl. Abbildung 3-19, <sup>6</sup> = vgl. Abbildung 3-22

### 3.3.1 Fundusphotographie

Innerhalb der phänotypischen Analyse wurden verschiedene Ausprägungen von Makuladegenerationen detektiert. Die im Kapitel 1.4.1 dargestellten Grade 1 bis 3 einer NCMD konnten im Rahmen dieser Arbeit bei den zu untersuchenden Patienten nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 3-16). In der Tabelle 3-3 ist aus dem Vergleich der Patienten 2038.02 und 2038.03 zu entnehmen, dass unterschiedliche Grade einer NCMD innerhalb einer Familie erfasst wurden, die die gleichen Sequenzvarianten (M3, M5) in der Promotor-Kontroll-Region des *PRDM13*-Gens aufwiesen. Die Grade einer NCMD korrelierten nicht mit dem Alter der Patienten. Patienten, die als NCMD Grad 2 oder 3 eingestuft wurden, zeigten zudem reduzierte Visuswerte (vgl. Tabelle 3-3).

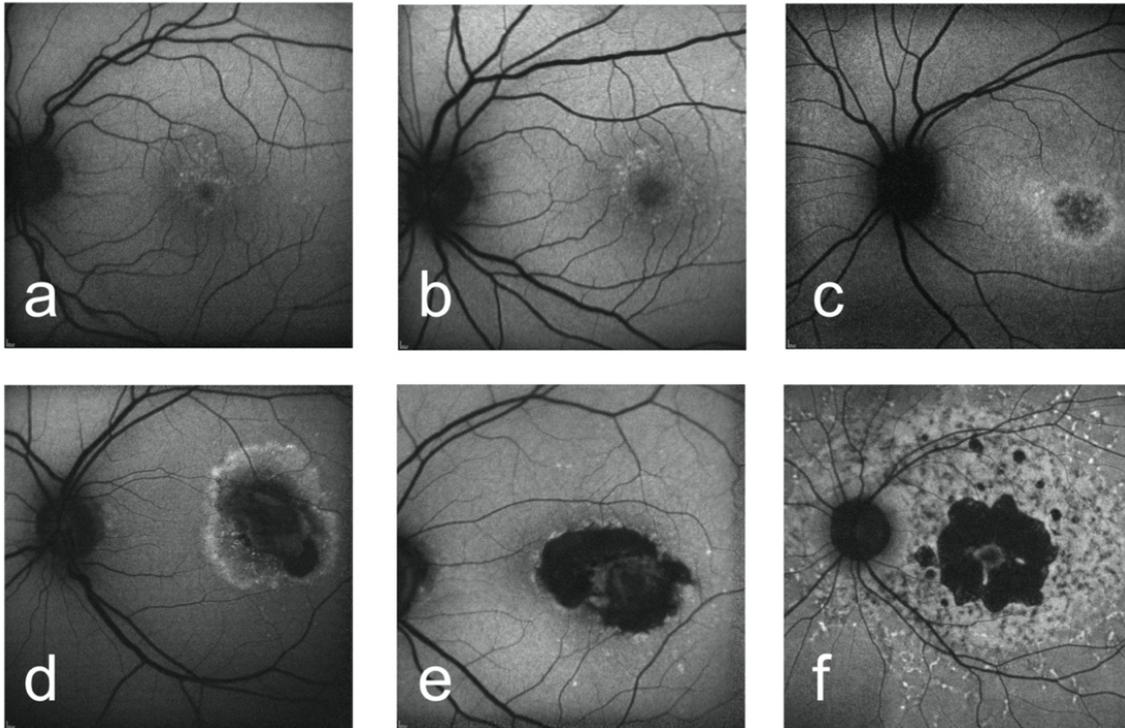


**Abbildung 3-16: Fundusphotographie – NCMD Grade 1-3**

- (a) Patient 2286.03 (24 J.) entspricht dem 1. Grad der NCMD mit vereinzelten Drusen
- (b) Patient 2831.01 (57 J.) entspricht dem 2. Grad der NCMD mit konfluente Drusen
- (c) Patient 2415.03 (51 J.) entspricht dem 3. Grad der NCMD mit makulärer Narbe

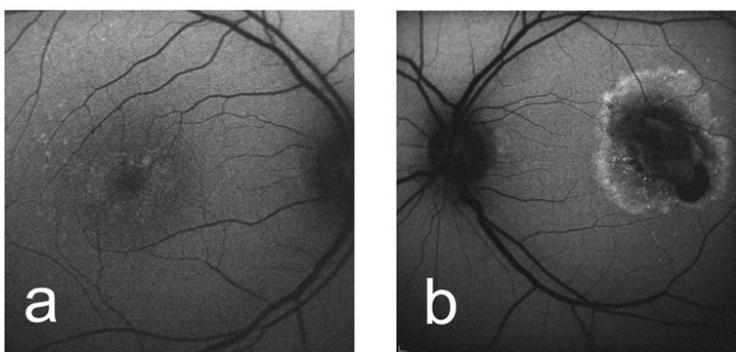
### 3.3.2 Fundusautofluoreszenzaufzeichnung (FAF)

Die Abbildung 3-17 beinhaltet die Fundusautofluoreszenzen (FAF) der in Tabelle 3-3 aufgelisteten Patienten. Die jeweiligen FAFs wurden entsprechend ihrer Ausprägung stufenweise angeordnet. Zentral befinden sich scharf abgegrenzte reduzierte Fluoreszenzen, die sich von (a) – (f) vergrößern. Mit Ausnahme von (e) nehmen ebenso die Intensitäten der zirkulären Fluoreszenzen zu, die die zentralen Hypofluoreszenzen als eine Art Randsaum umgeben. Zwischen den Familienmitgliedern (b) = 2038.02 und (e) = 2038.01, die ein ähnliches Alter aufweisen, sind deutliche Unterschiede in der Ausprägung der Fluoreszenz ersichtlich. Im Seitenvergleich der beiden Augen der untersuchten Patienten wurden beidseitige makuläre Degenerationen festgestellt, die sich jedoch in ihrer Ausprägung unterschieden (vgl. Abbildung 3-18).



**Abbildung 3-17: Fundusautofluoreszenz (FAF) – NCMD**

Die Abbildung stellt die FAFs der Individuen (a) = 2286.03, (b) = 2038.02, (c) = 2404.01, (d) = 2038.03, (e) = 2038.01 und (f) = 2109.01 gegenüber. Von (a) nach (f) nehmen die zentralen Hypofluoreszenzen im Bereich der Makula zu. Die zentralen hypofluoreszierenden Defekte sind von einem Randsaum mit erhöhter Fluoreszenz umgeben.

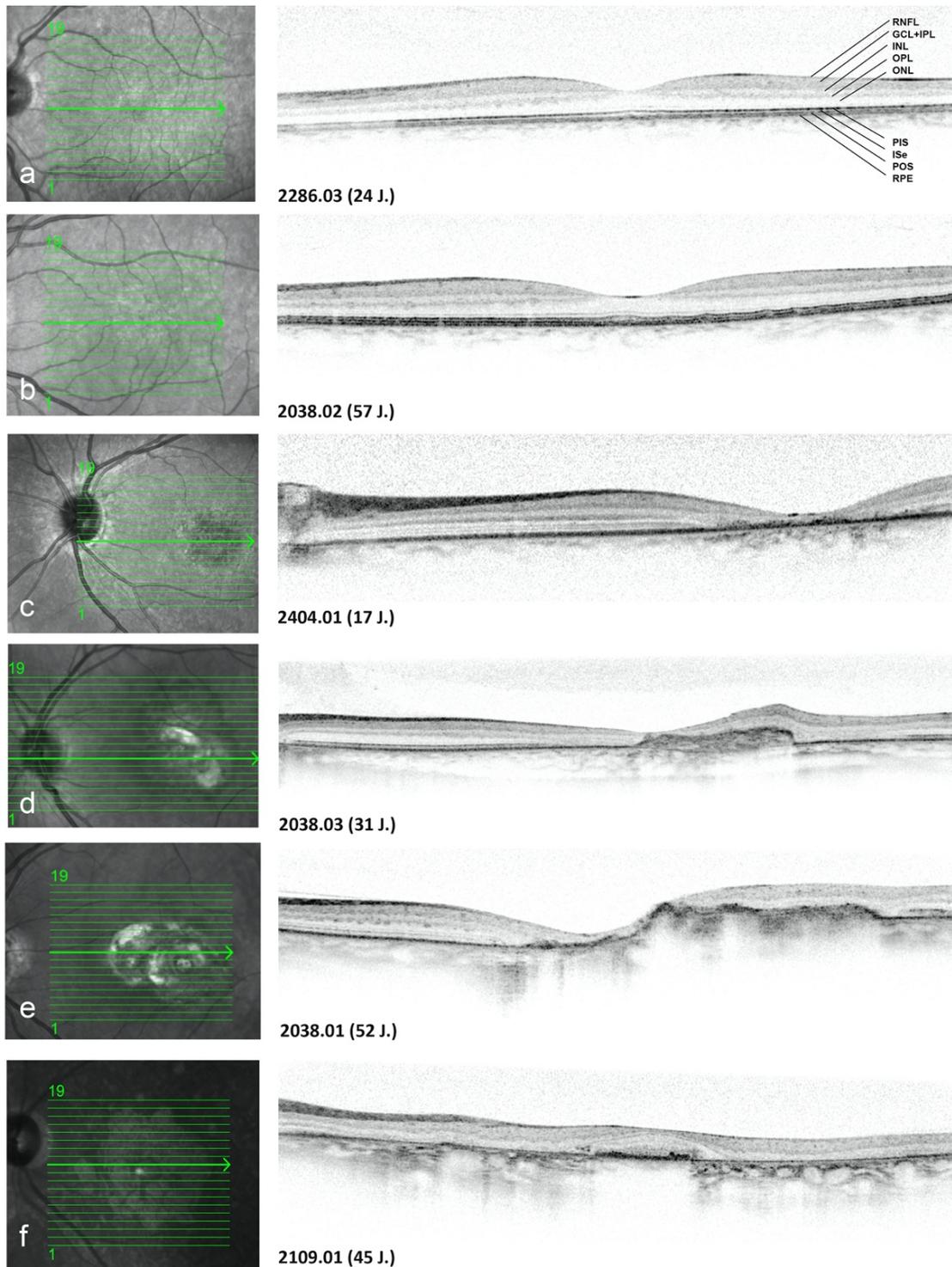


**Abbildung 3-18: Fundusautofluoreszenz (FAF) - Seitenvergleich**

In dieser Abbildung ist die FAF des Patienten 2038.03 von dem rechten Auge (a) dem linken Auge (b) gegenübergestellt. Die makuläre Läsion ist im rechten Auge (a) deutlich geringer ausgeprägt als im linken Auge (b).

### 3.3.3 Optische Kohärenztomographie (SD-OCT)

Die Abbildung 3-19 vermittelt mithilfe der SD-OCT einen Überblick über die verschiedenen Läsionsformen derjenigen Patienten (a) – (f), deren Fundusauto-fluoreszenzen in Abbildung 3-17 bereits dargestellt wurden. Der Patient (a) = 2286.03 mit den Sequenzvarianten M1, M3 und M5 besitzt eine normwertige Netzhautschichtung. Nachfolgend weist Patient (b) = 2038.02 im Unterschied zu (a) leichte foveale Veränderungen zwischen der PIS und ISe auf, wobei die PIS in diesem Bereich angehoben erscheint. Zudem sind punktuelle Verdickungen der RPE-Schicht in Form von Drusen erkennbar. Beim Blick auf die Netzhautschichtung des Patienten (c) = 2404.01 mit der Sequenzvariante M5 sind foveale Verluste von Photorezeptor- und Pigmentepithelzellen sichtbar. In der Folge entstehen makuläre, hypopigmentierte Bereiche, die den Kontrast zu der darunter liegenden Choroidea erhöhen, da die Reflexionen der untergegangenen Netzhautschichten fehlen. Der Patient (d) = 2038.03, der die identischen Sequenzvarianten wie (a) enthält, zeigt in der Makula einen umfassenden Verlust sämtlicher Netzhautschichten. Wiederum wird die Choroidea in der Makula kontrastreicher dargestellt. Beim Patienten (e) = 2038.01 ist die eigentliche Netzhautschichtung kaum noch darstellbar. Dieser Patient trägt im Unterschied zu (d) zusätzlich noch die Sequenzvariante M1 und präsentiert eine ausgeprägte Vernarbung in Form einer relativ homogenen Verdickung mehrerer Netzhautschichten. Der Patient (f) = 2109.01 mit der Sequenzvariante M5 zeigt nicht nur in der Makula, sondern auch in der Peripherie Atrophien des RPE und der Photorezeptorschicht.



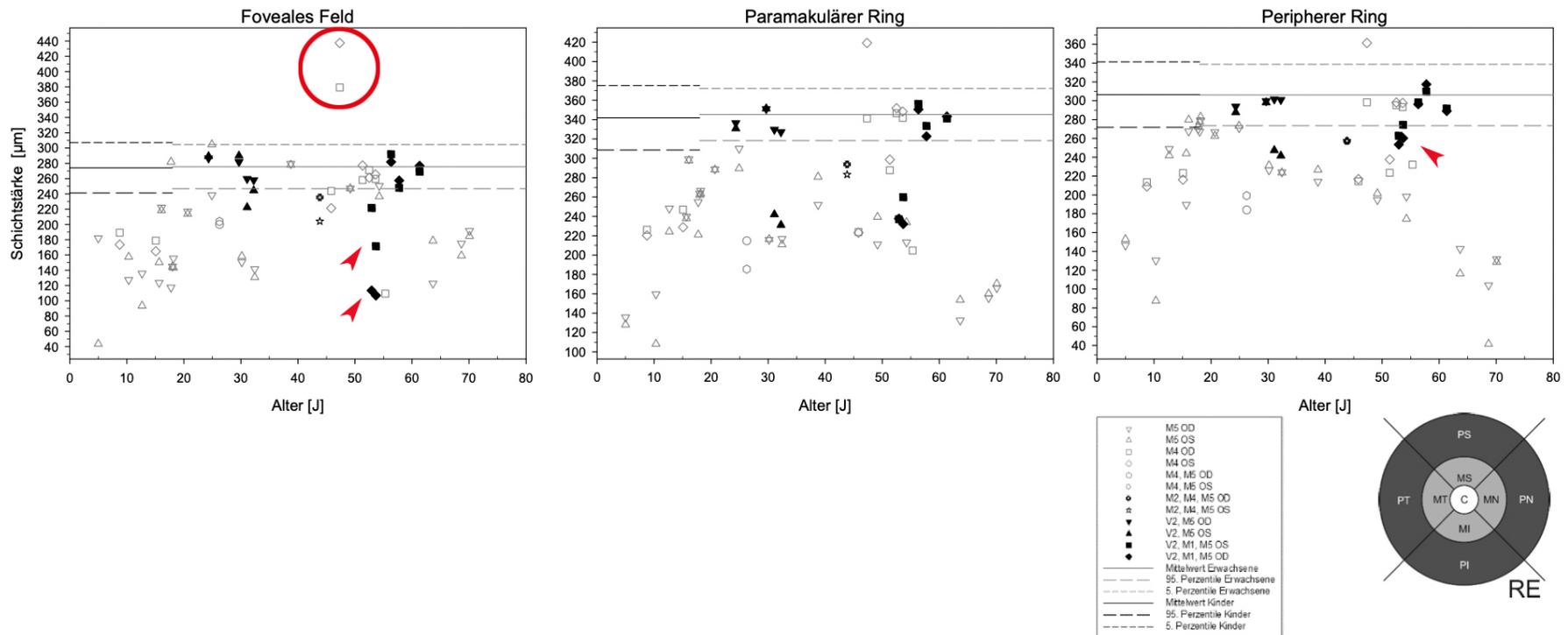
**Abbildung 3-19: Ergebnisse Optische Kohärenztomographie (SD-OCT)**

Die Abbildung zeigt die Bilddaten der optischen Kohärenztomographie (OCT) der unter Tabelle 3-3 gelisteten Patienten im Bereich der linken Makula. Während Patient (a) eine normwertige Netzhautschicht aufweist, besitzt Patient (e) weitgehende Verluste der Netzhautschichten. GCL: Ganglienzellschicht, INL: innere Körnerschicht, IPL: innere plexiforme Schicht, ISe: Elipsoidband, J.: Jahre, ONL: äußere Körnerzellschicht, OPL: äußere plexiforme Schicht, PIS: Photorezeptorschicht - Innensegment, POS: Photorezeptorschicht – Außensegment, RNFL: retinale Nervenfaserschicht, RPE: retinales Pigmentepithel

### 3.3.4 DiOCTA – Auswertung

Gemäß des Kapitels 2.4.4 wurden die Bilddaten der optischen Kohärenztomographie von den Patienten mit den verschiedenen Sequenzvarianten in die Software DiOCTA überführt. Anhand von DiOCTA konnten die Grenzen der einzelnen Netzhautschichten festgelegt werden. Wie in Abbildung 3-19 veranschaulicht, ist je nach Läsionsausprägung die Struktur der Netzhautschichtung gestört. Mithilfe von DiOCTA wurden diese Strukturverluste quantifiziert, indem die Schichtstärken der Netzhautschichten mit Normwerten verglichen wurden (vgl. Abbildung 3-20, Abbildung 3-21). Die Schichtstärken wurden für das foveale Feld, für den paramakulären Ring und für den peripheren Ring einzeln betrachtet und sind in den nachfolgenden Graphiken gegenübergestellt.

### Schichtstärke - gesamte Netzhaut

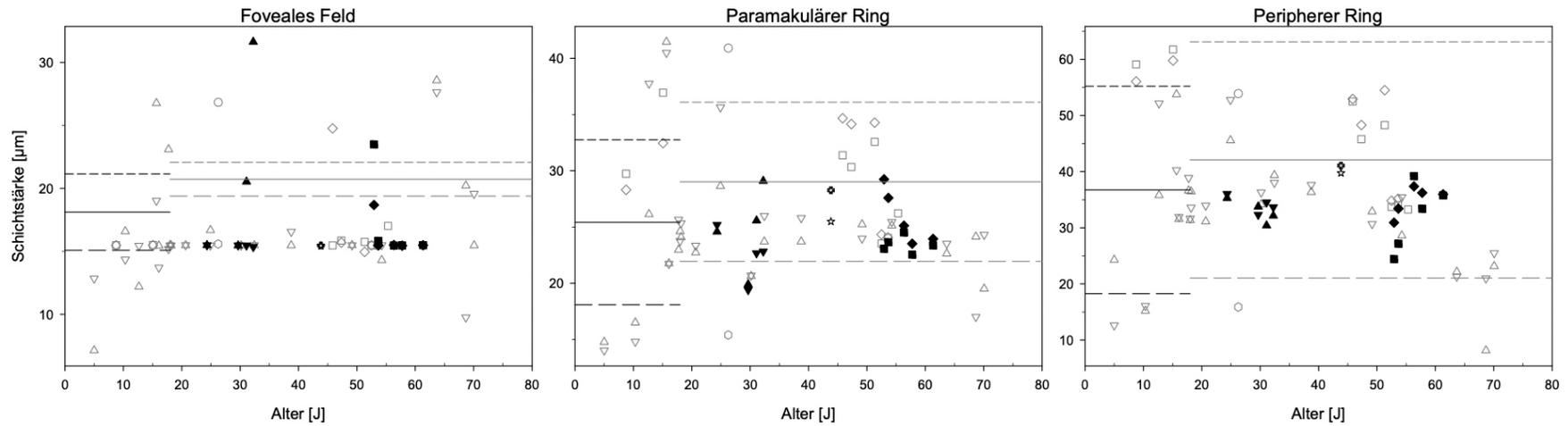


**Abbildung 3-20: Auswertung – gesamte Netzhaut**

Die Diagramme zeigen die Schichtstärken der gesamten Netzhaut der untersuchten Patienten mit Sequenzvariationen M1, M2, V2, M4 und M5 in der Promotor-Kontroll-Region des *PRDM13*. Die Bedeutung der Symbole ist der Legende zu entnehmen und gilt ebenso für die nachfolgenden Abbildungen. Als Referenzwerte dienen die Mittelwerte und die Perzentilen der Messwerte von Normprobanden. Die Perzentilen verlagern sich ab dem Alter von 18 J., da zwei Normwertsätze (0 – 18 J. und >18 J.) verwendet wurden. Insgesamt ist die Stärke der Netzhaut foveal, paramakulär und auch peripher überwiegend reduziert. Lediglich ein Patient mit der Sequenzvariante M4 (47 J., Markierung: roter Ring) zeigt eine verdickte Netzhaut. Zudem fällt bei dem Patienten mit der kombinierten Sequenzveränderung V2, M1, M5 (52 J., Markierung: rote Pfeile) auf, dass die Schichtstärke in dem fovealen Feld signifikant reduziert ist, während sich die Schichtstärke des peripheren Rings nahe der 95. Perzentile befindet.

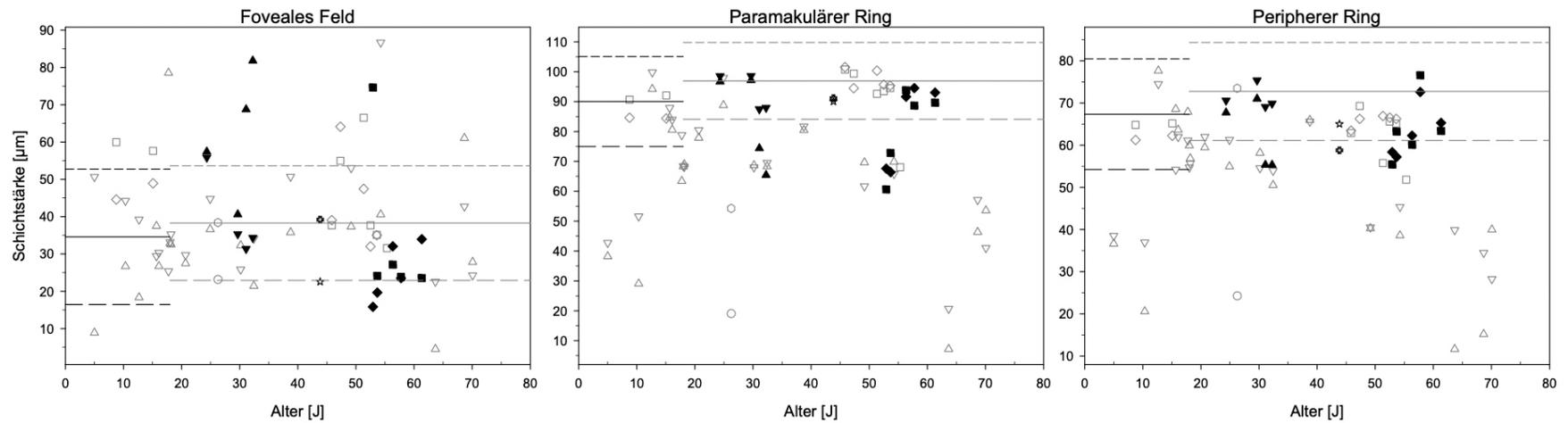
**A**

Schichtstärke - Retinale Nervenfaserschicht



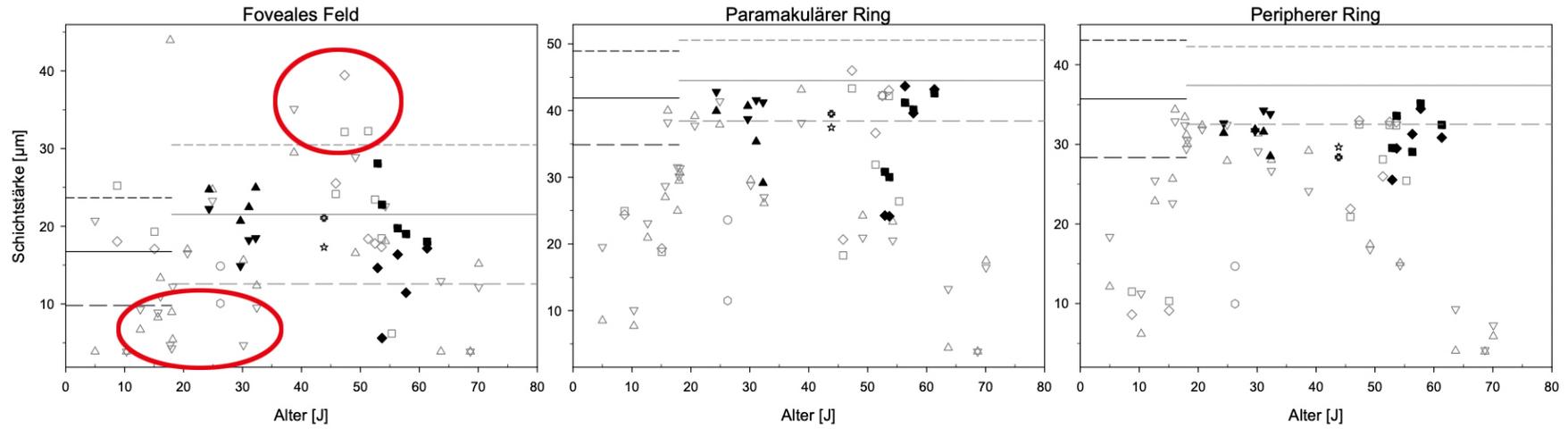
**B**

Schichtstärke - Ganglienzellschicht und Innere Plexiforme Schicht



**C**

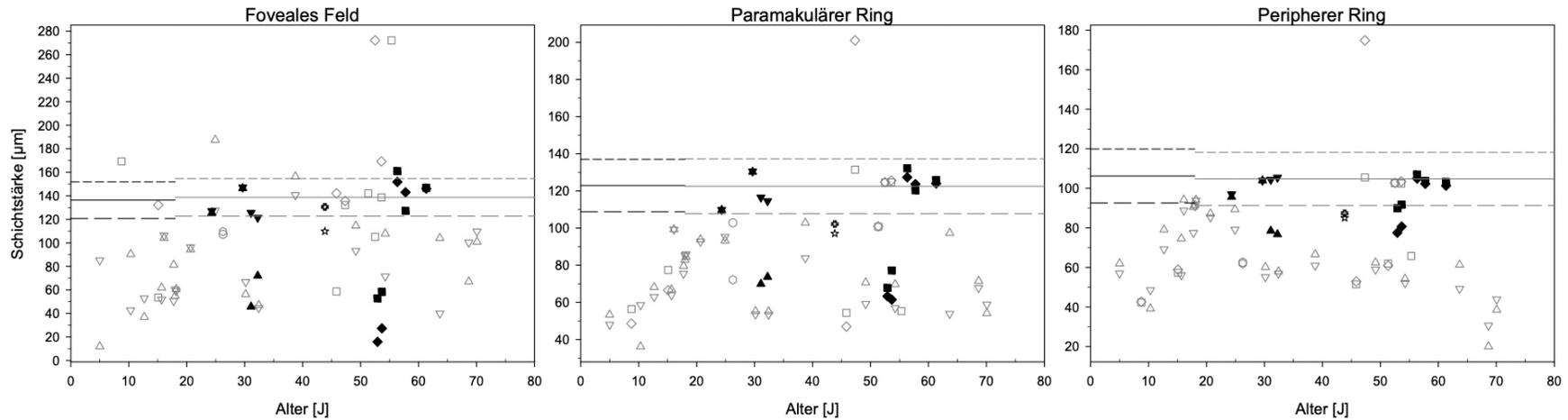
Schichtstärke - Innere Körnerschicht



**D**

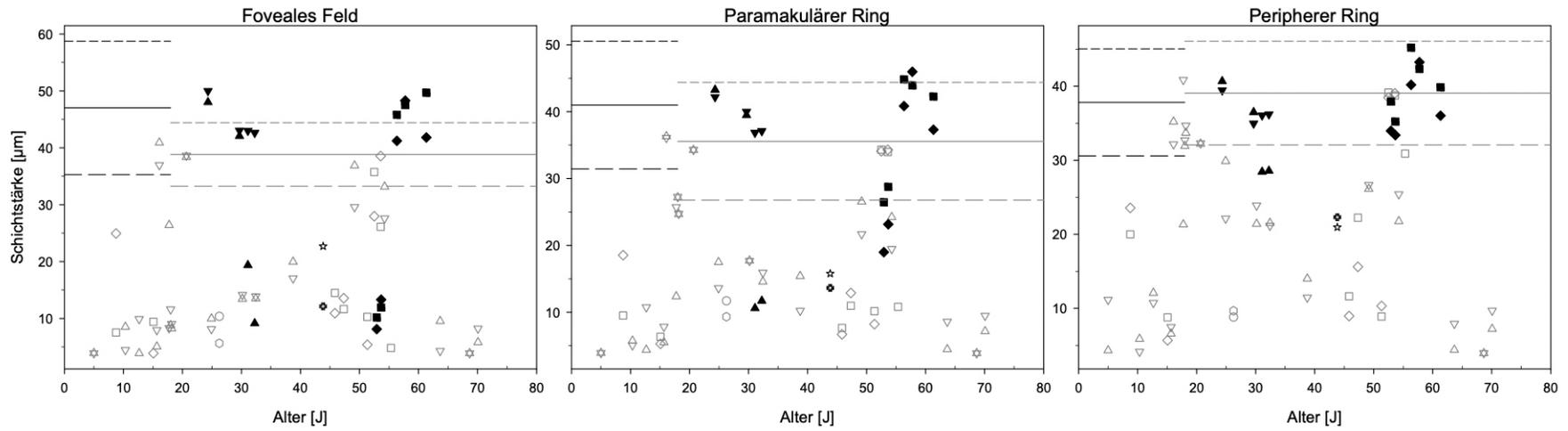
Schichtstärke - Innere Photorezeptorschichten

Äußere Plexiforme Schicht, Äußere Körnerschicht, Membrana Limitans Externa, Photorezeptorinnensegmente



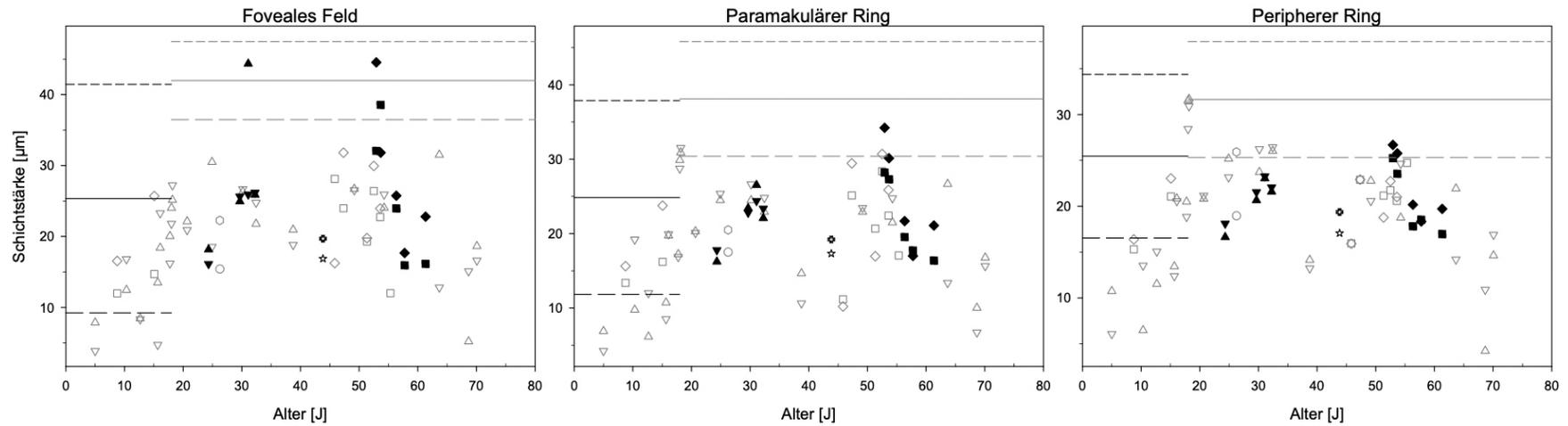
**E**

### Schichtstärke - Photorezeptorinnensegmentelipsoidschicht und Photorezeptoraußensegmente



**F**

### Schichtstärke - Retinales Pigmentepithel



### **Abbildung 3-21: DiOCTA Auswertung – einzelne Netzhautschichten**

Die oben aufgeführten Graphen A – F veranschaulichen die Schichtstärken einzelner Netzhautschichten. Die Bedeutung der Symbole ist der Legende in Abbildung 3-20 zu entnehmen. Besonders das retinale Pigmentepithel (RPE) in F verdeutlicht, dass überwiegend reduzierte Schichtstärken unterhalb der 95. Perzentile erfasst wurden. Im Bereich des paramakulären und peripheren Rings sind nur sehr vereinzelte Messwerte oberhalb der 5. Perzentile vorzufinden (vgl. A, D, E). Die Schichtstärken der inneren Photorezeptorschichten (D) und der Photorezeptoraußensegmente (E) lassen erkennen, dass bereits bei einem Alter unter 18 Jahren erniedrigte Schichtstärken gemessen wurden. Dagegen weisen die Messwerte im fovealen Feld eine größere Streuung auf. Anhand der roten Markierungsringe der inneren Körnerschicht (INL) in C wird ersichtlich, dass im Bereich der Fovea Schichtstärken sowohl oberhalb als auch unterhalb der Perzentilen vorliegen.

### 3.3.5 Elektroretinogramm (ERG)

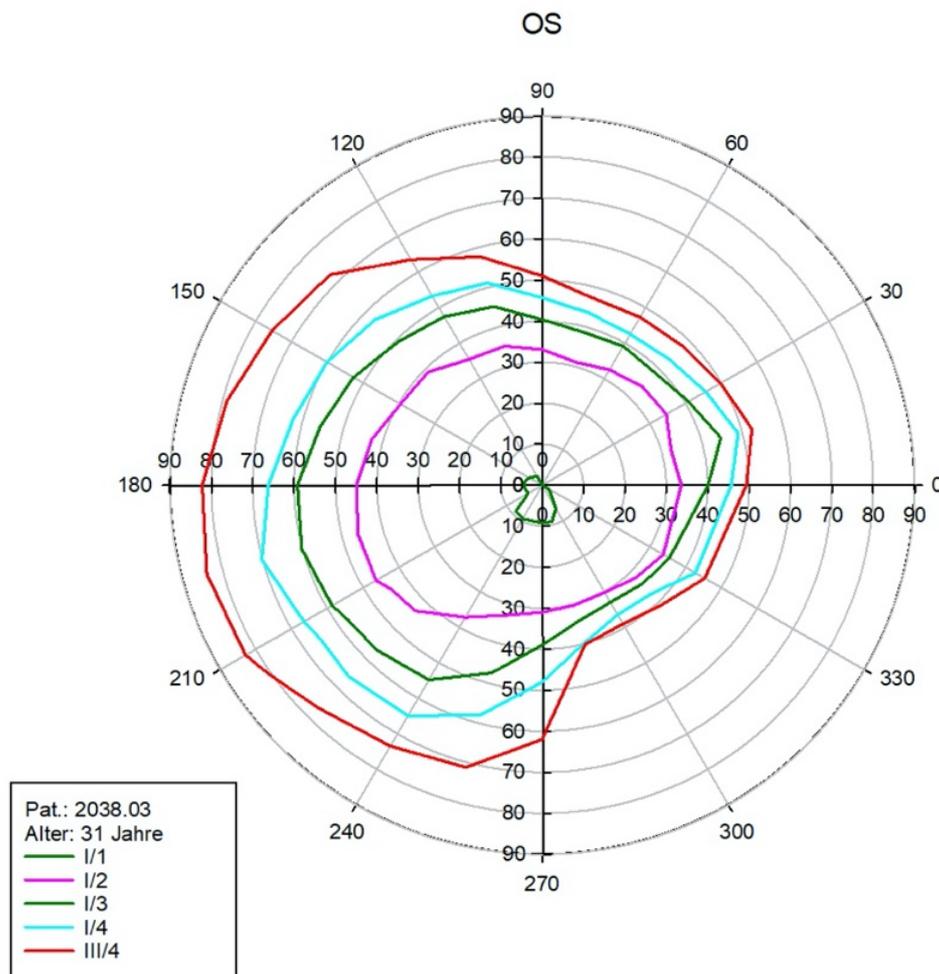
Trotz der zum Teil erheblichen Läsionen der Makula, zeigten die Patienten (vgl. Tabelle 3-3) keine besonders eingeschränkten Defizite in der Elektrophysiologie. Die hierfür aussagekräftigen Parameter der Amplituden und Latenzen im Ganzfeld-ERG wurden im Normbereich vorgefunden. Jedoch wurden im multifokalen-ERG geringfügig herabgesetzte Amplituden gemessen.

### 3.3.6 Farbsehtauglichkeitsprüfung

Bezüglich der Farbsehtauglichkeitsprüfung nach Farnsworth-Munsell scheint eine Korrelation mit dem Ausmaß der makulären Läsion zu bestehen (vgl. Kapitel 2.4.6). Während die Patienten 2286.03 und 2038.01 (beide mit Sequenzvarianten M1, M3, M5) noch einzelne Verwechslungen angaben, traten bei den Patienten 2038.03 (Sequenzvariante M3, M5), 2109.01 (Sequenzvariante M4) und 2404.01 (Sequenzvariante M5) multiple Farbverwechslungen auf. Diese Farbverwechslungen konnten weder der Protan-, noch der Deutan- oder Tritanachsen spezifisch zugeordnet werden.

### 3.3.7 Perimetrie nach Goldmann

Des Weiteren wurden Patienten mit einer nachgewiesenen Sequenzvariation hinsichtlich ihres Gesichtsfelds durch eine Perimetrie nach Goldmann untersucht (vgl. Kapitel 2.4.7). Die Abbildung 3-22 zeigt das typische klinische Gesichtsfeld eines NCMD-Patienten. Insgesamt wurden bei nahezu allen untersuchten Personen keine wesentlichen Einschränkungen oder Ausfälle des Gesichtsfelds entdeckt. Lediglich der Patient 2109.01 mit der Sequenzvariante M5 zeigte als einziger Proband ein Zentralskotom mit der Prüfmarke I/4. Hierbei ist zu erwähnen, dass nicht für jeden Patienten aus den retrospektiven Daten Untersuchungen mit der Prüfmarke I/4, welche eine geringere Leuchtdichte aufweist, vorlagen.

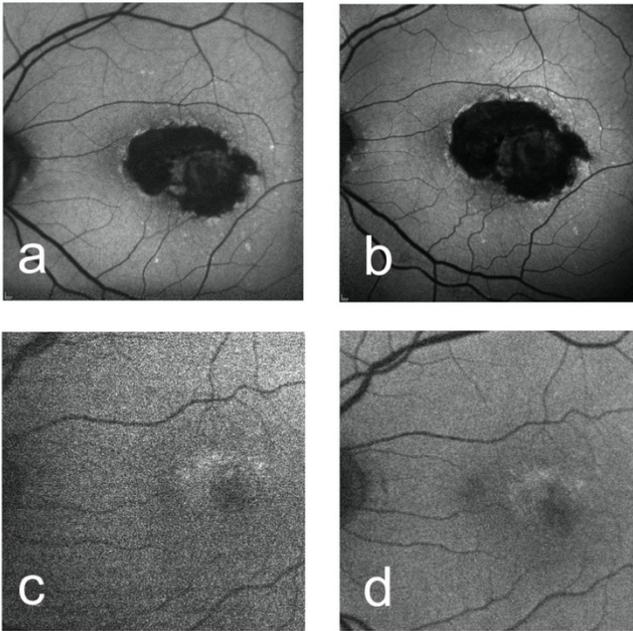


**Abbildung 3-22: Goldmann-Perimetrie**

Die Abbildung zeigt das Gesichtsfeld des linken Auges des NCMD Patienten 2038.03 mit den Sequenzvariationen M3 und M5. In der Legende ist der Farbcode für die Prüfmarken III/4, I/4, I/3, I/2 und I/1 zu entnehmen. Bei den untersuchten Patienten traten in der Regel keine wesentlichen Einschränkungen der Gesichtsfelder auf. Im Vergleich der beiden Augen der Patienten, wurden keine Unterschiede beobachtet.

### 3.3.8 Untersuchung der Progression bei NCMD

Zur Beurteilung einer Progression standen für die Patienten 2038.01 und 2286.01 Bilddaten in Form von Fundusautofluoreszenzen (FAF) und Verläufe der Visusdaten über einen Beobachtungszeitraum von bis zu elf Jahren zur Verfügung (vgl. Abbildung 3-23). Beide Patienten tragen die Sequenzvarianten M1, M3 und M5. Bei der Gegenüberstellung der Daten konnten keine progressiven Tendenzen erfasst werden.



**Abbildung 3-23: Progression – Fundusautofluoreszenz (FAF)**

FAF des Patienten 2038.01, zum Untersuchungszeitpunkt:

(a) = 52 J., Visus logMAR 0,63

(b) = 63 J., Visus logMAR 0,7

FAF des Patienten 2286.01, zum Untersuchungszeitpunkt:

(c) = 56 J., Visus logMAR 0,0

(d) = 63 J., Visus logMAR 0,0

Es waren keine wesentlichen FAF- und Visusveränderungen der Patienten feststellbar.

## 4 Diskussion

Die North-Carolina-Macular-Dystrophy (NCMD) ist eine seltene Erkrankung der Netzhaut, welche autosomal-dominant vererbt wird [22].

Phänotypisch sind von einzelnen fein zerstreuten Drusen bis hin zu ausgeprägten makulären Narben verschiedene Grade einer NCMD dokumentiert [32]. Aktuelle Studien gehen davon aus, dass sich die NCMD bereits zum Zeitpunkt der Geburt manifestiert und nicht progressiv verläuft [7, 13].

In der Literatur wurde von einer Korrelation der NCMD mit dem *MCDR1*-Locus berichtet, der das *PRDM13*-Gen inklusive seiner Promotor-Kontroll-Region (PKR) enthält [113]. Innerhalb dieser PKR wurden in bisherigen Untersuchungen drei verschiedene Sequenzvarianten V1 – V3 beschrieben. Darüber hinaus wurden bei NCMD-Patienten Sequenzvarianten in Form von Copy-Number-Variations (CNV) in dem *MCDR1*-Locus entdeckt [111]. Diese CNV wiesen allesamt eine Duplikation des *PRDM13* auf. Zum Teil wurde das vorgeschaltete *CCNV*-Gen partiell oder im Ganzen dupliziert vorgefunden [72, 13]. Ein weiterer Zusammenhang ergab sich bei der näheren Betrachtung der NCMD mit dem *MCDR3*-Locus und dem dortigen *IRX1*-Gen, wobei auch hier eine CNV verortet werden konnte [22, 111].

Das Ziel dieser Arbeit war es, die in der Literatur beschriebenen Sequenzvariationen in einem Patientenkollektiv aus Deutschland zu evaluieren und darüber hinaus weitere pathogene Sequenzvariationen zu identifizieren.

### 4.1 Bewertung des Patientenkollektivs

Die Datenbank des Labors für Molekulare Ophthalmologie der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Justus-Liebig-Universität (Gießen) wurde auf die Diagnosen Zapfendystrophie (COD), Zapfen-Stäbchen-Dystrophie (CRD), Central-Areolar-Choroidal-Dystrophy (CACD), Makuladegeneration (MD) und North Carolina Macular Dystrophy (NCMD) eingegrenzt. Bei der Auswahl der Patienten wurden gezielt diejenigen Diagnosen gewählt, die einen ähnlichen Phänotyp wie die NCMD aufwiesen. Hierbei wurde auf die in der Literatur beschriebenen Grade der NCMD geachtet (vgl. Kapitel 1.4.1). Patienten mit nachgewiesenen Sequenzvariationen in anderen Genen (z.B. *ABCA4*) wurden ausgeschlossen. Schlussendlich wurden 46 Indexpatienten für die weitere Genotypisierung in *PRDM13* und *IRX1* ausgewählt.

Von den 46 Kandidaten zeigten 23 Indexpatienten Sequenzvariationen in der Promotor-Kontroll-Region des *PRDM13*. Zwei Indexpatienten wiesen dabei die Sequenzvariante M3 auf, die äquivalent zu der in der Literatur beschriebenen Sequenzvariante V2 ist [111]. Demgegenüber konnte in keinem Indexpatienten eine CNV in Form einer Duplikation in *PRDM13* oder *IRX1* nachgewiesen werden (vgl. Kapitel 3.2.2).

Insgesamt wird die Auswahl des Patientenkollektivs als außerordentlich erfolgreich bewertet, da jeder zweite ausgewählte Patient eine Nukleotidsubstitution in der Promotor-Kontroll-Region des *PRDM13* Gens zeigte. Im Detail konnte die V2 ( $\equiv$ M3), die bisher nur in einer Patientenfamilie in Frankreich entdeckt wurde, auch in Patienten des Gießener Kollektivs festgestellt werden.

### 4.2 Bewertung der Genotypisierungen in *PRDM13*

Im Rahmen dieser Arbeit konnten bei den genotypisierten Patienten fünf verschiedene Sequenzvarianten (M1 – M5) in der Promotor-Kontroll-Region (PKR) des *PRDM13*-Gens detektiert werden (Tabelle 3-1). Zwei Indexpatienten wiesen die Sequenzvariante V2 ( $\equiv$ M3) auf, die in der Literatur bereits mit der NCMD in Verbindung gebracht werden konnte [111]. Diese Sequenzvariante V2 konnte in beiden Indexpatienten segregiert werden und dient im Rahmen dieser Arbeit als Referenzwert zur Beurteilung der weiteren identifizierten Sequenzvarianten. Gemäß der Tabelle 1-1 stellt die V2 in bisherigen Veröffentlichungen bezüglich der NCMD die einzige Sequenzvariante der Promotor-Kontroll-Region in *PRDM13* dar, welche bisher in Europa nachgewiesen wurde. Es konnte bei den in diesem Patientenkollektiv aus Deutschland durchgeführten Untersuchungen ebenso lediglich die V2 erfasst werden. Bezüglich der Sequenzanalyse wiesen neun der 23 Patienten mehr als eine Sequenzvariante in ihrer Promotor-Kontroll-Region auf. Die statistisch häufigste Sequenzvariation M5 konnte bei 17 Indexpatienten nachgewiesen werden.

Die Bewertung einer Sequenzvariante in einer Promotor-Kontroll-Region eines Gens wird insgesamt erschwert durch das unvollständige Wissen über die Funktionsweise der Promotor-Kontroll-Region [43, 80]. Es wird angenommen, dass Promotor-Kontroll-Regionen mit ihren Promotoren über chromosomale Loops kommunizieren und dort einen stabilisierenden Effekt ausüben [124, 80]. Promotoren ihrerseits, sind entscheidend für die Regulierung von Genexpression [66]. Promotor-Kontroll-Regionen

üben als regulatorisches Element ihre Funktion erst durch Bindung von Transkriptionsfaktoren und PKR-assoziierten Kofaktoren aus. Eine Sequenzvariante im Bereich einer Promotor-Kontroll-Region kann die Affinität zu ihren Transkriptionsfaktoren verstärken oder vermindern [43, 52]. Generell können Sequenzvariationen in Promotor-Kontroll-Regionen, ähnlich wie Sequenzvariationen in proteinkodierenden Abschnitten, zu erblichen Erkrankungen führen. Dabei wirken Sequenzvariationen in der Promotor-Kontroll-Region über Cis-Effekte, die mit einer Aktivierung oder Inhibierung der Transkription des zugehörigen Gens einhergehen. Klinisch können Sequenzvariationen in Bereichen der Promotor-Kontroll-Region somit zu einer Veränderung des Phänotyps führen [88]. Sequenzvariationen in proteinkodierenden Bereichen können in ihrem Effekt weitaus variabler sein. So kann entweder die Prozessierung der mRNA, die Translation oder auch die Proteinstruktur gestört sein [101].

Mit einer Häufigkeit von 41,5 % aller genotypisierten Patienten in dieser Studie wurde die Sequenzvariante M5 sehr häufig vorgefunden. Unter Berücksichtigung, dass es sich bei der NCMD um eine äußerst seltene, autosomal-dominant vererbte Makulaerkrankung handelt, ist es durch die Häufigkeit dieser Sequenzvariante eher unwahrscheinlich, dass die M5 als Ursache der NCMD gewertet werden kann. Zusätzlich liegt die Sequenzvariante M5 vermehrt in Kombination mit anderen Sequenzvarianten vor. Die M5 Sequenzvariante wird in dieser Arbeit schlussfolgernd als ein Polymorphismus der Promotor-Kontroll-Region im *PRDM13*-Gen gewertet.

### 4.3 Bewertung des Luciferase-Assays

Um eine Bewertung der verschiedenen Sequenzvarianten im *PRDM13*-Gen und ihren Einfluss auf die Genexpression experimentell auszuwerten, wurde ein selbst entwickelter Luciferase-Reporterassay etabliert (vgl. Kapitel 3.2.3).

Bei Betrachtung der Ergebnisse des Luciferase-Assays lässt sich schlussfolgern, dass eine Sequenzvariation innerhalb der Promotor-Kontroll-Region des *PRDM13* zu einer veränderten Transkription des Gens führt. Sämtliche Sequenzvarianten der Promotor-Kontroll-Region, die im Luciferase-Assay getestet wurden, unterschieden sich hinsichtlich ihrer Luciferase-Aktivität im Vergleich zu der Wildtypform. Dabei konnten die Sequenzvarianten allesamt eine Erhöhung der Lumineszenz erzielen (vgl. Abbildung 3-15). Aufgrund dieser Beobachtung wird abgeleitet, dass durch eine Sequenzvariation

in der Promotor-Kontroll-Region, eine verstärkte Genexpression des *PRDM13*-Gens resultiert.

In dieser Arbeit wurde umfassend geprüft, ob es sich bei der Promotor-Kontroll-Region des *PRDM13*-Gens, in welcher die Sequenzvarianten M1-M5 lokalisiert sind, um einen Enhancer oder Silencer handelt. Mit Blick auf die Ergebnisse des Luciferase-Assays, zeigten die Konstrukte mit der Promotor-Kontroll-Region als Wildtyp oder inklusive der Varianten allesamt eine niedrigere Luciferase-Aktivität gegenüber der des Konstrukts pGL4-*PRDM13*-PROM-WT, welches nur die Promotor-Region und keine Promotor-Kontroll-Region beinhaltet. Auf Basis dieser Ergebnislage kann resümiert werden, dass es sich bei der untersuchten Promotor-Kontroll-Region des *PRDM13*-Gens um einen Silencer handelt. Im Detail üben Silencer einen gegenteiligen Effekt zu Enhancer aus und vermindern die Transkription eines Gens [86, 92, 89].

Hinsichtlich der Luciferase-Aktivität verhalten sich die Klone mit den Sequenzvariationen M2 und M4 ähnlich zu dem Referenz-Klon mit der M3 ( $\equiv$ V2) Sequenzvariante. Die Sequenzvariante M4 konnte bei zwei Indexpatienten segregiert werden, daher werden die Sequenzvarianten M2 und M4 in dieser Arbeit unter Einbeziehung des Phänotyps (vgl. Kapitel 4.5) als mögliche genetische Ursache einer NCMD gewertet.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte kein isoliertes Konstrukt der M1 oder M5 Variante für den Luciferase-Assay hergestellt werden. Sequenzierte Klone trugen zusätzliche Sequenzvariationen in ihrer Promotor-Kontroll-Region, welche einen Vergleich zu den anderen Sequenzvarianten im Luciferase-Assay nicht ermöglichte.

Für eine aussagekräftige Interpretation des Luciferase-Assays müssen zudem die Grenzen der verwendeten Methodik berücksichtigt werden. Wie in Abbildung 3-15 erkennbar, weisen die Messwerte zum Teil eine große Streuung auf. Im Vorfeld wurden die acht zu untersuchenden Stichproben auf eine 96 Well-Platte überführt, sodass aus jeder Ausgangsstichprobe 12-Wells besetzt werden konnten. Während der technischen Durchführung wurden HEK-293 Zellen kultiviert und mehrmals passagiert. Hierbei konnten bei der Verteilung der HEK-293 Zellen Messungenauigkeiten auftreten, die eine absolute Quantifizierung der Effekte nicht zuließen. Nichtsdestotrotz lässt sich durch die dreimalige Durchführung des Versuchs und anhand der Luciferase-Aktivität erkennen, dass die Sequenzvarianten Einfluss auf die Genexpression von *PRDM13* nehmen. Die Funktion der Promotor-Kontroll-Region als Silencer wird durch die Sequenzvarianten herabgesetzt, woraus eine verstärkte Genexpression von *PRDM13* resultiert.

#### 4.4 Bewertung der Copy-Number-Variations (CNV) in *PRDM13* und *IRX1*

In der Literatur wurden in zwei Patientenfamilien mit einer NCMD von Copy-Number-Variations (CNV) in *PRDM13* und *IRX1* berichtet. Es handelte sich hierbei um eine Tandem Duplikationen [111]. Duplikationen können hintereinandergeschaltet (Tandem) oder rückwärts (Reverse) zueinander orientiert sein. Dabei kann das Duplikat direkt benachbart, auf einem entfernteren Abschnitt desselben Chromosoms oder sogar auf einem anderen Chromosom lokalisiert sein [42]. Es wird vermutet, dass eine Duplikation in unmittelbarer Nähe durch ein ungleiches Crossing-Over hervorgerufen wird [38]. Das Crossing-Over beschreibt den Austausch genetischer Informationen von homologen Chromosomen während der ersten Reifeteilung der Meiose [41].

Duplikationen gehören insgesamt zu den häufigsten Mutationsformen und führen zu einer veränderten Anzahl an Genkopien [96]. Sie können, ähnlich wie Genmutationen, Auswirkungen auf den Phänotyp eines Individuums haben [42]. Evolutionär betrachtet, stellt die Genduplikation ein wesentliches Anpassungsmerkmal an die Umwelt dar, wodurch eine Varianz an neuen Genen möglich ist, die zudem unterschiedlichste Funktionen mit sich führen [71]. Während vollständige Genduplikationen meist einen Evolutionsvorteil darstellen, können unvollständige Duplikationen zu erheblichen Erkrankungen führen [55].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 46 Indexpatienten auf das Vorhandensein einer Duplikation in *PRDM13* oder *IRX1* getestet. Zur Beurteilung wurden im Vorfeld entsprechende Positivkontrollen etabliert (vgl. Kapitel 3.2.2.1), deren Sequenzen mittels Sanger-Sequenzierung kontrolliert wurden (vgl. Kapitel 2.3.9).

Wie in Abbildung 3-4 und Abbildung 3-5 ersichtlich, zeigte kein Indexpatient eine Duplikation in *PRDM13* oder *IRX1*. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass nur beim Vorhandensein einer Tandem-Duplikation in dem, von den verwendeten Primer eingegrenzten Sequenzabschnitt, ein PCR-Produkt zu erwarten gewesen wäre. Lediglich in diesem Fall sind die Primerpaare DupL bzw. I-DupL (vgl. Tabelle 2-8) zueinander orientiert (vgl. Abbildung 3-3). In Abhängigkeit der Lokalisierung der Duplikation zum ursprünglichen Sequenzabschnitt, würde man eine Anordnung der Banden der PCR-Produkte mit unterschiedlichen Größen erwarten.

Diese Arbeit weist ausdrücklich darauf hin, dass die Ergebnisse der hier durchgeführten Duplikationsanalyse Rückschlüsse über Tandem-Duplikationen in unmittelbarer Nähe zulassen. Sobald die Duplikation weiter entfernt oder sogar auf einem anderen

Chromosom vorliegt, ist sie mittels der hier dargestellten Versuchsreihe nicht zu ermitteln. Hierfür wäre die Distanz für die gewählten Primer zu groß, um ein stabiles PCR-Produkt herstellen zu können. Wenn bei einem Indexpatienten die Duplikation von *PRDM13* oder *IRX1* unvollständig erfolgt ist und Sequenzen im Bereich der Primerhybridisierung fehlerhaft sind, so kann ebenfalls kein PCR-Produkt erwartet werden. Neuere Studien berichteten von partiellen oder ganzen Duplikationen des *CCNV*-Gens, welches vor dem *PRDM13*-Gen lokalisiert ist [72, 13]. In beiden Fällen lag ebenso das *PRDM13*-Gen im Ganzen dupliziert vor. Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch das gewählte Einzugsgebiet der Primer Dup-L (Tabelle 2-8, Abbildung 3-3) nicht geprüft, ob Duplikationen des *CCNV*-Gens vorlagen.

Abschließend lässt sich hinsichtlich der Bewertung der Duplikationsmutationen durch diese Versuchsmethode eruieren, dass die in der Literatur beschriebenen Tandem-Duplikationen in *PRDM13* und *IRX1* bei den Indexpatienten in dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnten. Unter Berücksichtigung, dass eine Copy-Number-Variation (CNV) seltener als eine Nukleotidsubstitution zu erwarten ist, werden diese Ergebnisse als nicht unerwartet gewertet [120].

### 4.5 Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Phänotypisierung

Unter Zuhilfenahme der Ergebnisse aus Kapitel 3.3 zur phänotypischen Ausprägung, ergeben sich vielerlei Rückschlüsse, die im Folgenden erörtert werden. Eine Variabilität an Makuladegenerationen, konnte sowohl in der Literatur als auch in dieser Arbeit beschrieben werden [110]. Die Einteilungsmöglichkeiten der NCMD in drei Grade, konnte durch die Fundusphotographien in dieser Arbeit (vgl. Abbildung 3-16) bestätigt werden [4, 32, 115].

Um pathologische Veränderungen im Bereich der retinalen und choroidalen Gefäße näher zu untersuchen, wurden die Fundusautofluoreszenzen (FAF) eingesetzt [39]. Wie in Abbildung 3-17 dargestellt, zeigten die untersuchten Probanden foveal zunehmende Flächen der reduzierten und verlorenen FAF, die von einem Ring erhöhter FAF umgeben werden. Während in dieser Arbeit erhöhte FAF als Druseneinlagerungen unterhalb des RPEs oder als übermäßige Lipofuszin-Akkumulationen gewertet werden, deuten Hypofluoreszenzen auf einen fortgeschrittenen Verlust des RPEs hin [107].

Eine Klassifizierung der NCMD erfolgte bisher anhand von Fundusphotographien. Dort wurden die Grade 1-3 mit vereinzelt Drusen bis hin zu makulären Atrophien und Vernarbungen beschrieben [4, 32, 115]. Die Ergebnisse dieser Arbeit ermöglichen anhand der Fundusautofluoreszenz in Abbildung 3-17 eine weitere Klassifizierung, welche sich folgendermaßen darstellt:

Im 1. Grad (a) sind im Bereich der Makula kleine punktförmige Bereiche mit erhöhter FAF erkennbar. Der 2. Grad (c) zeigt zentral eine inhomogene Fläche abwechselnder FAF, die von einem Randsaum mit erhöhter FAF umgeben wird. Der 3. Grad (d – f) ist gekennzeichnet durch eine ausgedehnte zentrale Läsion ohne FAF, welcher von einem Ring mit erhöhter FAF begleitet wird.

Insgesamt vergrößert sich der Durchmesser der Läsion von (a) nach (f) sukzessiv. Dabei wird die zunehmende foveale Hypofluoreszenz (als Zeichen der Degeneration des RPEs) von einem hyperfluoreszenten Randsaum (als Zeichen des überlasteten RPEs) begleitet.

Um einzelne Netzhautschichten detaillierter beurteilen zu können, wurde die Optische-Kohärenztomographie (OCT) verwendet. Dabei können pathologische Prozesse wie makuläre Degenerationen durch verschiedene Lichtreflexionen visualisiert werden [1]. Die Abbildung 3-19 lässt bereits im Überblick erkennen, dass unterschiedliche Stadien von Netzhautläsionen vorzufinden sind. Während Patient (a) = 2286.03 eine normwertige Netzhautschicht besitzt, sind die einzelnen Netzhautschichten des Patienten (e) = 2038.01 mit den identischen Sequenzvarianten in der PRDM13-PKR vor allem foveal nicht abgrenzbar. Dieses Ergebnis bestätigt wiederum den bisherigen Annahmen, dass die Patienten einer NCMD eine unterschiedliche Expressivität ihrer Ausprägungsform aufweisen [13].

Verluste von Netzhautschichten wurden in dieser Arbeit näher quantifiziert, indem die in Gießen entwickelte Software DiOCTA benutzt wurde (vgl. 2.4.4). Wie in Kapitel 3.3.4 veranschaulicht, wurde zum einen die Netzhaut insgesamt und zum anderen die Netzhautschichten einzeln ausgewertet. Unter Verwendung der Abbildung 3-20 ergibt sich aus dieser Arbeit, dass Sequenzvariationen in der beschriebenen Promotor-Kontroll-Region des *PRDM13*-Gens zu einer deutlichen Reduzierung der Schichtstärke der gesamten Netzhaut führen kann.

Dessen ungeachtet fällt bei Betrachtung der einzelnen Netzhautschichten in Abbildung 3-21 auf, dass die gemessenen Werte besonders im Bereich der fovealen Region gestreut vorzufinden sind. Diese Ergebnisse können durch die Beobachtung begründet werden, dass die einzelnen Netzhautschichten vor allem foveal nicht klar abgrenzbar waren. Hierdurch wurde die Trennung der einzelnen Schichten bei der automatischen

und manuellen Segmentierung der Netzhautschichten erschwert. Nichtsdestotrotz sollte berücksichtigt werden, dass die Netzhaut physiologischerweise im Bereich der Fovea am dünnsten ist [17]. Es wird in dieser Arbeit geschlussfolgert, dass eine Vernarbung in der Makula aufgrund ihres dünnen Querschnitts zu einer verhältnismäßigen Verdickung der Netzhaut führen kann (vgl. Abbildung 3-21, roter Markierungsring).

In zwei getrennt voneinander zu betrachtenden Studien aus dem Jahre 2003 und 2017 wurde angegeben, dass bei einer NCMD überwiegend beide Augen symmetrisch betroffen sind [22, 79]. Im Rahmen dieser Arbeit wiesen ebenso beide Augen makuläre Degenerationen auf. Jedoch wurden, wie in Abbildung 3-18 belegt, zum Teil erhebliche Unterschiede in der Art der Ausprägung von Makuladegenerationen festgestellt. Mit Verweis auf die Visuswerte von Proband 2038.03 (Tabelle 3-3) wurden zudem unterschiedliche Sehschärfen der beiden Augen ermittelt ( $\text{LogMAR}_{\text{OD}} = 0,67$  /  $\text{LogMAR}_{\text{OS}} = 0$ ). Somit ergibt sich aus den phänotypischen Befunden, dass bei einem Probanden, der Schweregrad der Ausprägung im Vergleich beider Augen variieren kann.

Es wurde berichtet, dass bei Patienten mit einer NCMD trotz auffällig großer makulärer Läsionen, die retinalen Funktionen wie Sehschärfe noch relativ gut erhalten sein können [4]. Bei Betrachtung der FAF in Abbildung 3-17 wäre bei den Patienten (d) – (f) ein vollständiger Verlust der Sehschärfe zu erwarten gewesen. Visuswerte über 1 LogMAR wurden jedoch bei keinem der untersuchten Patienten vorgefunden.

Bezugnehmend auf die Untersuchung der Gesichtsfelder wurden im Rahmen dieser Arbeit keine pathologischen Befunde entdeckt. Dies wird besonders ersichtlich, wenn man für den Patienten 2038.03 inklusive der Sequenzvariationen M3, M5 die Fundusautofluoreszenz (vgl. Abbildung 3-17d) und die Perimetrie nach Goldmann (vgl. Abbildung 3-22) gegenübergestellt. Als Ausnahme anzusehen ist dabei der Patient 2109.01 mit der M4 Sequenzvariante, der ein Zentralskotom der Prüfmarke I/4 aufwies. Normalerweise entwickeln Patienten mit makulären Defekten zentrale Gesichtsfeldausfälle in Form eines Zentralskotoms, da die Makula ca. 10% des Gesichtsfelds ausmacht [59, 45]. Die nicht vorhandenen Zentralskotome der NCMD Patienten in dieser Arbeit lassen sich damit begründen, dass bei den Patienten im Bereich der Makula, trotz der Vernarbungen, noch vereinzelte Photorezeptoren persistieren, die Lichtreize wahrnehmen können.

Bezüglich des Farbsehens traten in der Panel-D15 Diagnostik bei den Patienten mit Sequenzvariationen in der Promotor-Kontroll-Region Verwechslungen der Farbproben

auf, welches als Folge der Degeneration der makulär lokalisierten Zapfen gewertet werden kann [121]. Dabei waren die Verwechslungen keiner der drei spezifischen Achse der Farbsinnstörung (Tritan-, Protan- und Deutanachse) eindeutig zuweisbar. Aus diesem Grund wird in dieser Arbeit angenommen, dass die einzelnen makulären Zapfentypen in gleichem Ausmaß von degenerativen Prozessen aufgrund einer NCMD betroffen sind.

Eine weitere Funktionsprüfung der Netzhautfunktion wurde mithilfe des Elektretinogramms (ERG) getestet. Das Ganzfeld-ERG zeigte bei den Patienten dieser Arbeit keine pathologischen Veränderungen, was auf eine grundsätzlich normwertige Funktionsweise der Netzhaut hindeutet [73]. Jedoch können im Ganzfeld-ERG die Potenziale der Stäbchen, die peripher lokalisiert sind, die Potenziale der Zapfen überlagern [53]. Um vor allem Pathologien zu untersuchen, die sich auf die makuläre Region begrenzen, wird das multifokale ERG diagnostisch hinzugezogen. Hier werden kleinflächige Reize für selektive Netzhautbereiche dargeboten und ermöglichen eine Beurteilung der Funktionsweise des zentralen Gesichtsfelds [54, 24]. Beim multifokalen ERG konnten in dieser Arbeit bei Patienten mit ausgeprägten makulären Narben geringfügige Abschwächungen der Amplituden, wie bei einer Makulopathie, erfasst werden [53]. Es wird aus dieser Beobachtung und unter Berücksichtigung der reduzierten Visuswerte (vgl. Tabelle 3-3) abgeleitet, dass makuläre Vernarbungen in Form einer NCMD zu Funktionsdefiziten der Netzhaut führen, in der Ausprägung aber schwach ausfallen können.

Angesichts der Progression der NCMD gilt zum derzeitigen Wissenstand, dass es sich um eine nicht-progressive Erkrankung handelt [111]. Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte anhand der Fundusautofluoreszenzen und Visusdaten eine Progredienz der Erkrankung nicht belegt werden (vgl. Abbildung 3-23).

Abschließend soll bezüglich der Variabilität der Ausprägung in den Patienten nochmals auf die unterschiedliche Expressivität der Erkrankung verwiesen werden. Die phänotypischen Ergebnisse werden im folgenden Kapitel mit den genotypischen Ergebnissen korreliert und bewertet (vgl. Kapitel 4.6).

#### 4.6 Bewertung des *PRDM13*-Gens im Zusammenhang mit NCMD

In diesem Kapitel soll bewertet werden, ob *PRDM13* und dessen Fehlregulation, unter Berücksichtigung der phänotypischen und genotypischen Ergebnisse dieser Arbeit, als Ursache einer NCMD plausibel erscheint. Wie in Kapitel 1.4.2.1 dargestellt, wird *PRDM13* während der embryonalen Entwicklung mit der neuronalen Verschaltung der Netzhaut in Zusammenhang gebracht [18]. Innerhalb des *MCDR1*-Locus stellt *PRDM13* das einzige Gen dar, welches in der neuronalen Netzhaut exprimiert wird [111, 131]. Hierbei ist *PRDM13* mit der retinalen Entwicklung negativ assoziiert, sodass die Expression des *PRDM13* in den pluripotenten Stammzellen runterreguliert wird [111]. Im Rahmen einer Studie konnte mittels Tierversuch gezeigt werden, dass eine Überexpression des *PRDM13*-Gens zu einer abnormen Netzhautentwicklung führt, während eine Herunterregulation des *PRDM13*-Gens keinen Effekt auf die Augenentwicklung erzeugte [72].

Der in dieser Arbeit entwickelte Luciferase-Assay (vgl. Kapitel 2.3.11) hat ergeben, dass es sich bei der Promotor-Kontroll-Region im *PRDM13*-Gen um einen Silencer handelt. Ebenso konnte im Luciferase-Assay gezeigt werden, dass durch die Sequenzvarianten der Promotor-Kontroll-Region der inhibitorische Einfluss des Silencers auf die Promotorsequenz des *PRDM13*-Gens aufgehoben wird. Als Folge wird *PRDM13* vermehrt exprimiert, welches in der oben genannten Studie zu abnormen Netzhautentwicklungen führt [72]. Somit sind die hier identifizierten Sequenzvarianten in der PKR-Region als Ursache einer NCMD anzusehen.

Hinweise in der Literatur ermöglichen die Annahme, dass sich die NCMD bereits zum Geburtsalter manifestiert und nicht progressiv verläuft [7, 13]. Wie in Kapitel 3.3 dargestellt, konnte in dieser Arbeit ebenfalls keine Progression der Erkrankung oder Korrelation der makulären Läsionen mit dem Alter der Patienten erfasst werden. Unter dem Aspekt, dass *PRDM13* immer wieder mit der embryonalen Entwicklung in Zusammenhang gebracht wird, erlaubt es die Schlussfolgerung, dass sich NCMD klinisch bereits im frühen Alter manifestiert und keine oder nur geringe Progression aufweist [7, 131, 18, 108, 129].

Studien belegen, dass *PRDM13* vorwiegend innerhalb der INL exprimiert wird, derjenigen Netzhautschicht, in welcher die meisten Amakrinen Zellen lokalisiert sind [7, 37, 129, 13]. Es bestehen zahlreiche Subtypen der Amakrinen Zellen, wobei *PRDM13*

vor allem innerhalb der inhibitorischen glycerinergen Zellen exprimieren wird [129]. Im Tierversuch führte ein inaktiviertes *PRDM13* zu einer verringerten Anzahl der Amakrinen Zellen in der INL [13]. Es ergibt sich eine gewisse Schwierigkeit in der Interpretation der Funktion der Amakrinen Zellen, da diese bisher nur unzureichend geklärt sind [75]. Man nimmt an, dass Amakrine Zellen an vertikalen Verschaltungsprozessen der Netzhaut beteiligt sind und die eingehenden Signale der Ganglienzellen inhibieren [64]. Den Amakrinen Zellen wird zudem einen modulierenden Einfluss auf rezeptive Felder zugesprochen, die für die Konvergenz von Photorezeptoren auf Ganglienzellen verantwortlich sind [134]. Rezeptive Felder wiederum sind wichtig für die Sehschärfe und das Gesichtsfeld [26]. Möglicherweise entsteht durch diese Schleife ein Ansatzpunkt, weswegen der Visus und das Gesichtsfeld der NCMD Patienten noch relativ gut erhalten sind, obwohl die Makula eine zum Teil ausgeprägte Läsion aufweist. Angenommen, dass aufgrund einer NCMD die Amakrinen Zellen in der INL ausgedünnt werden (vgl. Abbildung 3-21c), so würde sich die Konvergenz der Photorezeptoren auf die Ganglienzellen verringern [134]. Ebendarum wird in dieser Arbeit geschlossen, dass durch die reduzierte Konvergenz eine verbesserte Funktion persistierender Photorezeptoren resultiert.

Im Gegensatz zu vielen anderen monogenen Erkrankungen, sind es bei der NCMD nicht die Sequenzvariationen in einer kodierenden Sequenz, die diese Erkrankung verursachen, sondern die Veränderungen in der Aktivierung eines Gens. Da die Makulabildung von der Expression einer Reihe von Genen abhängt, ist eine präzise Wechselwirkung von Transkriptionsfaktoren – wie *PRDM13* – mit ihren Zielgenen entscheidend. Es kristallisierte sich in dieser Arbeit heraus, dass je nach Schweregrad der Störung, bezogen auf die Wechselwirkung von Transkriptionsfaktoren und PKR, die Expressivität der Erkrankung variieren kann. Bezogen auf die NCMD sind hierdurch die unterschiedliche Ausprägung der makulären Degeneration in Form und Stärke begründet.

Unter Einbeziehung der aufgeführten Aspekte, erscheint es insgesamt plausibel, dass Sequenzvariationen in den regulatorischen Bereichen von *PRDM13* zu einer Beeinträchtigung der Entwicklung der Makula führen können.

### 4.7 Ausblick

Um eine kausale Therapie oder präventive Maßnahmen für genetische Erkrankungen wie die North-Carolina-Macular-Dystrophy (NCMD) zu ermöglichen, bedarf es zunächst einer evidenzbasierten Diagnostik. Erst im Jahre 2016 wurde von einer Korrelation von Sequenzvariationen des *PRDM13*-Gens in seiner Promotor-Kontroll-Region mit der seltenen NCMD berichtet [111]. Durch nachfolgende Studien und anhand der Ergebnisse dieser Arbeit kann ein kausaler Zusammenhang von *PRDM13* mit der NCMD belegt werden [72, 13, 112].

Basierend auf den Erkenntnissen dieser Arbeit erfolgt in der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde des Justus-Liebig-Universität Gießen bereits standardisiert ein Mutationsscreening des *PRDM13*-Gens an solchen Patienten, die den beschriebenen Phänotyp einer NCMD aufweisen. Hierfür werden die Primer *PRDM13*-DHS-1-5 entsprechend der Tabelle 2-8 verwendet. Patienten mit einer NCMD können durch die Sicherung der Diagnose über die Vererbung der Erkrankung aufgeklärt werden.

In zukünftigen Untersuchungen sollte der pathophysiologische Mechanismus einer NCMD weiter verstanden werden. Es bleibt die Frage offen, weshalb *PRDM13* gerade in Amakrinen Zellen exprimiert vorgefunden wird und welche Funktion es dort ausübt. Abseits der Ophthalmologie wird *PRDM13* mit der Langlebigkeit von Säugetieren, mit Krebszellen, mit Schlafqualitäten und mit Einflüssen auf das Körpergewicht in Zusammenhang gebracht [103, 135]. Diese Aspekte könnten in nachfolgenden klinischen Studien an Patienten mit einer nachgewiesenen NCMD untersucht werden, um das *PRDM13*-Gen ganzheitlicher betrachten zu können.

### 5 Zusammenfassung

Bei der North-Carolina-Macular-Dystrophy (NCMD) handelt es sich um eine seltene autosomal-vererbte Erkrankung der Netzhaut. Die betroffenen Patienten zeigen im Bereich der Makula degenerative bis hin zu vernarbenden Veränderungen, die sich hinsichtlich ihrer Ausprägung auch innerhalb einer Familie unterscheiden.

Bisherige Untersuchungen konnten eine Korrelation der North-Carolina-Macular-Dystrophy (NCMD) mit den Genen *PRDM13* und *IRX1* zeigen. Es wurde von drei verschiedenen Sequenzvarianten V1 – V3 im Promotor-Kontroll-Bereich (PKR) von *PRDM13* berichtet. Des Weiteren wurden Copy-Number-Variations (CNV) in Form von Tandemduplikationen in *PRDM13* und *IRX1* entdeckt.

In Bezug auf die North-Carolina-Macular-Dystrophy (NCMD) wurde die Patientendatenbank des Labors für Molekulare Ophthalmologie der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen phänotypisch und genotypisch ausgewertet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden fünf verschiedene Sequenzvarianten (M1 – M5) innerhalb der Promotor-Kontroll-Region von dem *PRDM13*-Gen ermittelt. Darunter wurde in zwei Indexpatienten die Sequenzvariante V2 ( $\equiv$ M3) vorgefunden. Eine Tandemduplikation in *PRDM13* oder *IRX1* konnte nach Etablierung entsprechender Positivkontrollen in den untersuchten Patienten nicht festgestellt werden.

Um die detektierten Sequenzvarianten in *PRDM13* zu beurteilen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Luciferase-Reporterassay entwickelt. Mehrere Messreihen zeigten auf, dass die Sequenzvarianten eine veränderte Genexpression in *PRDM13* bewirkten, indem sie die Luciferase-Aktivität der Versuchsreihe beeinflussen. Basierend auf den Ergebnissen des Luciferase-Assays wird in dieser Arbeit angenommen, dass es sich bei der Promotor-Kontroll-Region von *PRDM13* um einen Silencer handelt.

Im Rahmen der Phänotypisierung wurden deutliche Unterschiede der makulären Vernarbungen vorgefunden. Die Ergebnisse der Fundusautofluoreszenzen ermöglichen ein weiteres Grading zu der bisherigen Klassifizierung über Fundusphotographien. Durch eine analytische Untersuchung der optischen Kohärenztomographie (OCT) mithilfe der DiOCTA Software konnten die makulären Läsionen quantifiziert werden und den einzelnen Netzhautschichten zugeordnet werden. Hierbei zeigt sich vor allem das retinale Pigmentepithel (RPE) und die innere Körnerschicht (INL) betroffen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen insgesamt die Berichte bisheriger Studien, dass eine Überexpression des *PRDM13*-Gens durch Unterdrückung der Silencer-Funktion der Promotor-Kontroll-Region als Ursache einer North-Carolina-Macular-Dystrophy (NCMD) anzunehmen ist.

## 6 Summary

North-Carolina-Macular-Dystrophy (NCMD) is a rare disease of the retina with autosomal dominant inheritance. Affected patients show degenerative lesions of the macula including retinal scars, which differ in terms of their expressiveness even within a family.

Previous studies suggest a correlation between North-Carolina-Macular-Dystrophy (NCMD) and *PRDM13* and *IRX1*. Recently, three different sequence variants V1 – V3 in the promotor-control-region of *PRDM13* were reported. Furthermore, copy-number-variations (tandem duplications) in *PRDM13* and *IRX1* were discovered.

With regard to North-Carolina-Macular-Dystrophy (NCMD) patients from the Laboratory of Molecular Ophthalmology at the Department of Ophthalmology of the Justus-Liebig-University Giessen were phenotypically and genotypically evaluated. All together five different sequence variants M1 – M5 could be identified within the promotor-control-region of *PRDM13*. Among these, sequence variant V2 ( $\equiv$ M3) could be confirmed in two index patients. To examine tandem duplications in *PRDM13* and *IRX1*, positive controls were established in advance. All in all, tandem duplication in *PRDM13* and *IRX1* could not be detected in the patients studied.

To assess the detected sequence variants in *PRDM13*, a self-developed luciferase reporter assay is presented in this study, which allows to investigate the influence of identified variants on the gene expression of *PRDM13*. Several series of measurements could detect changes in luciferase-activity, which is a quantitative measure of transcription performance. Based on the luciferase reporter assay the promotor-control-region acts as a silencer.

As part of this work, a phenotyping of the NCMD subjects with detected sequence variations was carried out. As described in the literature, significant differences in macular manifestations could be shown among patients. Based on fundus-autofluorescence, the data enable a further grading to the previous fundus-photographs based grading system. Through an analytical examination of optical-coherence-tomography (OCT) using the DiOCTA software, the macular lesions were quantified and assigned to individual retinal layers. Particularly retinal pigment epithelium (RPE) and the inner nuclear layer (INL) appeared to be affected.

All in all the results of this study confirm reports of previous investigations and that dysregulation of *PRDM13* from sequence variants in the promotor-control-region must be considered as a cause of North-Carolina-Macular-Dystrophy (NCMD).

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Aufbau des menschlichen Auges und der Netzhaut. ....	1
Abbildung 2-1: pCR2.1®-TOPO®-TA Klonierungsvektor.....	17
Abbildung 2-2: pGL4.10 [luc2] Reportervektor .....	18
Abbildung 2-3: Reaktionsgleichung des One-Step-Luciferase-Assays .....	35
Abbildung 2-4: SD-OCT – Darstellung der Scan-Richtungen eines Normprobanden .....	38
Abbildung 2-5: Optische Kohärenztomographie (OCT) und DiOCTA – Darstellung der Netzhautschichtung eines Normprobanden im B-Scan .....	38
Abbildung 3-1: Auswahl des Patientenkollektivs.....	41
Abbildung 3-2: PCR-Amplifikation der Promotor-Kontroll-Region von PRDM13 .....	42
Abbildung 3-3: Herstellung der CNV-Positivkontrolle in <i>PRDM13</i> .....	44
Abbildung 3-4: Testung auf <i>PRDM13</i> -Duplikation .....	46
Abbildung 3-5: Testung auf IRX-Duplikation.....	47
Abbildung 3-6: Herstellung des pGL4-PRDM13-P-PKR.....	48
Abbildung 3-7: Klonierung der Basic Promotor Region von PRDM13 .....	49
Abbildung 3-8: pT-PRDM13-PROM.....	50
Abbildung 3-9: Promotor in pGL4 [luc2] Reporterplasmid .....	51
Abbildung 3-10: pGL4-PRDM13-PROM-WT .....	51
Abbildung 3-11: Klonierung Promotor-Kontroll-Region von <i>PRDM13</i> .....	52
Abbildung 3-12: pT-PRDM13-PKR.....	53
Abbildung 3-13: Promotor-Kontroll-Region in pGL4-PRDM13-PROM-WT .....	54
Abbildung 3-14: pGL4-PRDM13-PPKR Plasmid .....	55
Abbildung 3-15: Testung der Aktivität der PRDM13- Promotor-Kontroll-Region.....	57
Abbildung 3-16: Fundusphotographie – NCMD Grade 1-3.....	59
Abbildung 3-17: Fundusautofluoreszenz (FAF) – NCMD .....	60
Abbildung 3-18: Fundusautofluoreszenz (FAF) - Seitenvergleich .....	60
Abbildung 3-19: Ergebnisse Optische Kohärenztomographie (SD-OCT).....	62
Abbildung 3-20: Auswertung – gesamte Netzhaut .....	64
Abbildung 3-21: DiOCTA Auswertung – einzelne Netzhautschichten .....	68
Abbildung 3-22: Goldmann-Perimetrie.....	70
Abbildung 3-23: Progression – Fundusautofluoreszenz (FAF) .....	71

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Überblick Sequenzvarianten in <i>MCDR1</i> und <i>MCDR3</i> [110, 71, 13, 111] .....	10
Tabelle 2-1: Chemikalien .....	14
Tabelle 2-4: Stammlösungen .....	15
Tabelle 2-2: Vektoren und Plasmide.....	16
Tabelle 2-3: Wirtszellen .....	19
Tabelle 2-5: Verbrauchsmaterialien .....	19
Tabelle 2-6: verwendete Geräte .....	20
Tabelle 2-7: Enzyme .....	21
Tabelle 2-8: Primer .....	22
Tabelle 2-9: Ablauf PCR .....	26
Tabelle 2-10: Versuchsbedingungen Agarose-Gel.....	27
Tabelle 3-1: Sequenzvarianten in der Promotor-Kontroll-Region von <i>PRDM13</i> .....	43
Tabelle 3-2: Luciferase-Assay.....	56
Tabelle 3-3: Ergebnisse-Phänotypisierung.....	58

## 9 Abkürzungsverzeichnis

% = Prozent

°C = Grad Celsius

A = Adenin

AMP = Adenosinmonophosphat

ATP = Adenosinmonophosphat

bp = base-pairs

bzw. = beziehungsweise

C = Cytosin

c = Konzentration

C<sub>3</sub> = drittes Kohlenstoff-Atom

cfu = Koloniebildene Einheit (engl. = Colony-forming-units )

CNV = Copy-Number-Variation

CO<sub>2</sub> = Kohlenstoffdioxid

d = destilliert

dd = doppelt-destilliert

ddNTP = Didesoxy-Nukleosidtriphosphat

DNA = Desoxyribonukleinsäure (engl. = Desoxyribonucleic acid)

dNTP = Desoxy-Nukleosidtriphosphat

engl. = englisch

g = Gramm

G = Guanin

g. = genomisch

GABA = Gamma-Aminobuttersäure

G>T = Nukleotidsubstitution Guanin zu Thymin

h = Stunde

H<sub>2</sub>O = Wasser

HEK = menschliche embryonale Nierenzellen (engl. = Human-embryonic-kidney)

J. = Jahre

JLU = Justus-Liebig-Universität

kb = kilo-base

l = Liter

LogMAR = negativer dekadischer Logarithmus des minimalen Auflösungswinkels

m = Milli

M = Molar

## Abkürzungsverzeichnis

M1 - M5 = Mutationen 1 - 5

Mg<sup>2+</sup> = zweifach-positiv geladene Magnesium-Ionen

MgCl<sub>2</sub> = Magnesiumchlorid

min = Minuten

mRNA = messenger ribonucleic acid

N. = Nervus

NCBI = National Center for Biotechnology

nm = Nanometer

O<sub>2</sub> = Sauerstoff

OCT = Optische Kohärenztomographie

PCR = Polymerase-Kettenreaktion

PKR = Promotor-Kontroll Region

PPi = Diphosphat

Prom = Promotor

RT = Raumtemperatur

s = Sekunden

T = Thymin

TBE = Tris, Borsäure, EDTA 2 H<sub>2</sub>O + 2 Na

tRNA = transfer ribonucleic acid

U = Units

WT = Wildtyp

μ = Mikro

## 10 Literaturverzeichnis

1. Adhi M, Duker JS (2013) Optical coherence tomography--current and future applications. *Curr Opin Ophthalmol* 24:213–21
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002) From DNA to RNA. *Garl. Sci.*
3. Ansorge W, Voss H, Wirkner U, Schwager C, Stegemann J, Pepperkok R, Zimmermann J, Erfle H (1989) Automated sanger DNA sequencing with one label in less than four lanes on gel. *J Biochem Biophys Methods* 20:47–52
4. Audere M, Rutka K, Inaskina I, Peculis R, Sepetiene S, Valeina S, Lace B (2016) Genetic linkage studies of a North Carolina macular dystrophy family. *Medicina (B Aires)* 52:180–186
5. Benninghoff A, Drenckhahn D (2002) *Anatomie*. Urban & Fischer, München, ISBN: 978-3-437-42341-3
6. Bernardes R, Serranho P, Lobo C (2011) Digital Ocular Fundus Imaging: A Review. *Ophthalmologica* 226:161–181
7. Bessodes N, Parain K, Bronchain O, Bellefroid EJ, Perron M (2017) Prdm13 forms a feedback loop with Ptf1a and is required for glycinergic amacrine cell genesis in the *Xenopus* Retina. *Neural Dev* 12:16
8. Bhende M, Shetty S, Parthasarathy MK, Ramya S (2018) Optical coherence tomography: A guide to interpretation of common macular diseases. *Indian J Ophthalmol* 66:20–35
9. Bhutto I, Luttly G (2012) Understanding age-related macular degeneration (AMD): Relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex. *Mol Aspects Med* 33:295–317
10. Booij JC, Baas DC, Beisekeeva J, Gorgels TGMF, Bergen AAB (2010) The dynamic nature of Bruch's membrane. *Prog Retin Eye Res* 29:1–18
11. Bordt AS, Perez D, Tseng L, Liu WS, Neitz J, Patterson SS, Famiglietti E V., Marshak DW (2019) Synaptic inputs from identified bipolar and amacrine cells to a sparsely branched ganglion cell in rabbit retina. *Vis Neurosci* 36:E004
12. Bowes Rickman C, Farsiu S, Toth CA, Klingeborn M (2013) Dry age-related macular degeneration: Mechanisms, therapeutic targets, and imaging. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*
13. Bowne SJ, Sullivan LS, Wheaton DK, et al (2016) North Carolina macular dystrophy (MCDR1) caused by a novel tandem duplication of the PRDM13 gene. *Mol Vis* 22:1239–1247

14. Bürglin TR (2008) The Hedgehog protein family. *Genome Biol* 9:241
15. Calabrèse A, Bernard JB, Hoffart L, Faure G, Barouch F, Conrath J, Castet E (2011) Wet versus dry age-related macular degeneration in patients with central field loss: Different effects on maximum reading speed. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 52:2417–2424
16. Calvo-Maroto AM, Cerviño A (2018) Spotlight on fundus autofluorescence. *Clin Optom* 10:25–32
17. Chan A, Duker JS, Ko TH, Fujimoto JG, Schuman JS (2006) Normal macular thickness measurements in healthy eyes using stratus optical coherence tomography. *Arch Ophthalmol* 124:193–198
18. Chang JC, Meredith DM, Mayer PR, Borromeo MD, Lai HC, Ou Y-H, Johnson JE (2013) Prdm13 Mediates the Balance of Inhibitory and Excitatory Neurons in Somatosensory Circuits. *Dev Cell* 25:182–195
19. Cheng C, Shuman S (2000) DNA strand transfer catalyzed by vaccinia topoisomerase: ligation of DNAs containing a 3' mononucleotide overhang. *Nucleic Acids Res* 28:1893–8
20. Cheng CW, Yan CHM, Hui C chung, Strähle U, Cheng SH (2006) The homeobox gene *irx1a* is required for the propagation of the neurogenic waves in the zebrafish retina. *Mech Dev* 123:252–263
21. Choy SW, Cheng CW, Lee ST, Li VWT, Hui MNY, Hui C-C, Liu D, Cheng SH (2010) A cascade of *irx1a* and *irx2a* controls *shh* expression during retinogenesis. *Dev Dyn* 239:3204–3214
22. Cipriani V, Silva RS, Arno G, et al (2017) Duplication events downstream of *IRX1* cause North Carolina macular dystrophy at the *MCDR3* locus. *Sci Rep* 7:7512
23. Cook PB, McReynolds JS (1998) Lateral inhibition in the inner retina is important for spatial tuning of ganglion cells. *Nat Neurosci* 1:714–719
24. Creel DJ (2011) Multifocal Electroretinograms. *J Vis Exp*. <https://doi.org/10.3791/3176>
25. Díaz-Hernández ME, Bustamante M, Galván-Hernández CI, Chimal-Monroy J (2013) *Irx1* and *Irx2* are coordinately expressed and regulated by retinoic acid, TGF $\beta$  and FGF signaling during chick hindlimb development. *PLoS One* 8:e58549
26. Dreyer V (1974) Visual acuity. *Ophthalmologica* 169:61–69
27. Duong TQ, Pardue MT, Thulé PM, Olson DE, Cheng H, Nair G, Li Y, Kim M, Zhang X, Shen Q (2008) Layer-specific anatomical, physiological and functional MRI of the retina. *NMR Biomed* 21:978–96
28. Durfee T, Nelson R, Baldwin S, et al (2008) The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: Insights into the biology of a laboratory workhorse. *J*

- Bacteriol 190:2597–2606
29. Ehnes A, Wenner Y, Friedburg C, Preising MN, Bowl W, Sekundo W, Bexten EM zu, Stieger K, Lorenz B (2014) Optical Coherence Tomography (OCT) Device Independent Intraretinal Layer Segmentation. *Transl Vis Sci Technol* 3:1
  30. Eitinger T (2017) *Allgemeine Mikrobiologie*, 10. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, ISBN: 9783132418882
  31. Eom KS, Cheong JS, Lee SJ (2016) Structural analyses of zinc finger domains for specific interactions with DNA. *J Microbiol Biotechnol* 26:2019–2029
  32. Frank HR, Landers MB, Williams RJ, Sidbury JB (1974) A new dominant progressive foveal dystrophy. *Am J Ophthalmol* 78:903–916
  33. Fritsche O (2016) *Mikrobiologie*, 1st ed. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, ISBN: 9783662497296
  34. Fu Y (1995) Phototransduction in Rods and Cones. Univ. Utah Heal. Sci. Center, J. Webvision Organ. Retin. Vis. Syst. PMID 21413414
  35. Fujimoto JG, Pitris C, Boppart SA, Brezinski ME (2000) Optical coherence tomography: an emerging technology for biomedical imaging and optical biopsy. *Neoplasia* 2:9–25
  36. Gaastra W, Hansen K (1984) Ligation of DNA with T4 DNA Ligase. In: *Nucleic Acids*. Humana Press, New Jersey, pp 225–230
  37. Goodson NB, Nahreini J, Randazzo G, Uruena A, Johnson JE, Brzezinski JA (2018) Prdm13 is required for Ebf3+ amacrine cell formation in the retina. *Dev Biol* 434:149–163
  38. Graw J (2015) *Lehrbuch der Genetik*, 6 Auflage. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, ISBN: 978-3-662-44816-8
  39. Grehn F (2012) *Augenheilkunde*, 31. Auflage. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, ISBN: 13 978-3-642-11332-1
  40. Griffiths AJ, Gelbart WM, Miller JH, Lewontin RC (1999) The Molecular Basis of Mutation. NCBI Bookshelf ID NBK22074
  41. Griffiths AJ, Gelbart WM, Miller JH, Lewontin RC (1999) The Mechanism of Crossing-Over. *Mod. Genet. Anal.* New York, ISBN-10 0-7167-3118-5
  42. Griffiths AJ, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM (2000) Duplications.
  43. Grossman SR, Zhang X, Wang L, et al (2017) Systematic dissection of genomic features determining transcription factor binding and enhancer function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:E1291
  44. Guo X, Liu W, Pan Y, et al (2010) Homeobox gene IRX1 is a tumor suppressor gene in gastric carcinoma. *Oncogene* 29:3908–3920
  45. Hageman GS, Gehrs K, Johnson L V., Anderson D (2008) Age-Related Macular

- Degeneration (AMD). Webvision Organ. Retin. Vis. Syst.
46. Hamel C (2006) Retinitis pigmentosa. Orphanet J Rare Dis 1:40
  47. Hamel CP (2007) Cone rod dystrophies. Orphanet J Rare Dis 2:7
  48. Hanotel J, Bessodes N, Thélie A, et al (2014) The Prdm13 histone methyltransferase encoding gene is a Ptf1a-Rbpj downstream target that suppresses glutamatergic and promotes GABAergic neuronal fate in the dorsal neural tube. Dev Biol 386:340–357
  49. Heather JM, Chain B (2016) The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. Genomics 107:1–8
  50. Helling RB, Goodman HM, Boyer HW (1974) Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. J Virol 14:1235–44
  51. Hermsen VM, Judisch GF (1984) Central areolar pigment epithelial dystrophy. Ophthalmologica 189:69–72
  52. Herz H-M (2016) Enhancer deregulation in cancer and other diseases. Bioessays 38:1003–15
  53. Hood DC, Bach M, Brigell M, Keating D, Kondo M, Lyons JS, Marmor MF, McCulloch DL, Palmowski-Wolfe AM, International Society For Clinical Electrophysiology of Vision the ISFCE of (2012) ISCEV standard for clinical multifocal electroretinography (mfERG) (2011 edition). Doc Ophthalmol 124:1–13
  54. Hood DC, Odel JG, Chen CS, Winn BJ (2003) The multifocal electroretinogram. J Neuroophthalmol 23:225–35
  55. Hu X, Worton RG (1992) Partial gene duplication as a cause of human disease. Hum Mutat 1:3–12
  56. Jansohn M, Aigner A (2007) Gentechnische Methoden - Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. Elsevier, Spektrum, Akad. Verl., München, ISBN: 9783827415370
  57. Jimenez-Sierra JM, Ogden TE, Van Boemel GB (1989) Inherited Retinal Diseases. St. Louis
  58. Julià A, Blanco F, Fernández-Gutierrez B, et al (2016) Identification of *IRX1* as a Risk Locus for Rheumatoid Factor Positivity in Rheumatoid Arthritis in a Genome-Wide Association Study. Arthritis Rheumatol 68:1384–1391
  59. Kedar S, Ghate D, Corbett JJ (2011) Visual fields in neuro-ophthalmology. Indian J Ophthalmol 59:103–9
  60. Keilhauer CN, Meigen T, Weber BHF (2006) Clinical findings in a multigeneration family with autosomal dominant central areolar choroidal dystrophy associated with an Arg195Leu mutation in the peripherin/RDS gene. Arch Ophthalmol

- 124:1020–1027
61. Kim SJ, Woo SJ, Yu HG (2006) A Korean Family with an Early-Onset Autosomal Dominant Macular Dystrophy Resembling North Carolina Macular Dystrophy. *Korean J Ophthalmol* 20:220
  62. Klein R, Bresnick G (1982) An inherited central retinal pigment epithelial dystrophy. *Birth Defects Orig Artic Ser* 18:281–96
  63. Klevering BJ, Van Driel M, Van Hogerwou AJM, Van de Pol DJR, Deutman AF, Pinckers AJLG, Cremers FPM, Hoyng CB (2002) Central areolar choroidal dystrophy associated with dominantly inherited drusen. *Br J Ophthalmol* 86:91–96
  64. Kolb H (1995) Roles of Amacrine Cells. University of Utah Health Sciences Center
  65. Kolovos P, Knoch TA, Grosveld FG, Cook PR, Papantonis A (2012) Enhancers and silencers: An integrated and simple model for their function. *Epigenetics and Chromatin* 5:1
  66. Latchman DS. (2015) Gene Control, second Edition. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, United Kingdom, ISBN: 9780815345039
  67. Lee PY, Costumbrado J, Hsu C-Y, Kim YH (2012) Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *J Vis Exp*. <https://doi.org/10.3791/3923>
  68. Lefler WH, Wadsworth JAC, Sidbury JB (1971) Hereditary macular degeneration and amino-aciduria. *Am J Ophthalmol* 71:224–230
  69. Lim LS, Mitchell P, Seddon JM, Holz FG, Wong TY (2012) Age-related macular degeneration. *Lancet* 379:1728–1738
  70. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J (2000) DNA Cloning with Plasmid Vectors. In: *Mol. Cell Biol.* 4th Ed. p New York, W. H. Freeman, ISBN: 10 0-7167-3706
  71. Magadum S, Banerjee U, Murugan P, Gangapur D, Ravikesavan R (2013) Gene duplication as a major force in evolution. *J Genet* 92:155–61
  72. Manes G, Joly W, Guignard T, et al (2017) A novel duplication of PRMD13 causes North Carolina macular dystrophy: overexpression of PRDM13 orthologue in drosophila eye reproduces the human phenotype. *Hum Mol Genet* 26:4367–4374
  73. Marmor MF, Fulton AB, Holder GE, Miyake Y, Brigell M, Bach M, Vision) (for the International Society for Clinical Electrophysiology of (2009) ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2008 update). *Doc Ophthalmol* 118:69–77
  74. Masland RH (2012) The tasks of amacrine cells. *Vis Neurosci* 29:3–9
  75. Masland RH (2012) The tasks of amacrine cells. *Vis Neurosci* 29:3–9
  76. Massari ME, Murre C (2000) Helix-Loop-Helix Proteins: Regulators of Transcription in Eucaryotic Organisms. *Mol Cell Biol* 20:429–440

77. Mathenge W (2014) Age-related macular degeneration. *Community eye Heal* 27:49–50
78. Maugeri A, Klevering BJ, Rohrschneider K, Blankenagel A, Brunner HG, Deutman AF, Hoyng CB, Cremers FPM (2000) Mutations in the ABCA4 (ABCR) gene are the major cause of autosomal recessive cone-rod dystrophy. *Am J Hum Genet* 67:960–966
79. Michaelides M, Johnson S, Tekriwal AK, Holder GE, Bellmann C, Kinning E, Woodruff G, Trembath RC, Hunt DM, Moore AT (2003) An early-onset autosomal dominant macular dystrophy (MCDR3) resembling North Carolina macular dystrophy maps to chromosome 5. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 44:2178–2183
80. Miguel-Escalada I, Pasquali L, Ferrer J (2015) Transcriptional enhancers: functional insights and role in human disease. *Curr Opin Genet Dev* 33:71–6
81. Mona B, Uruena A, Kollipara RK, Ma Z, Borromeo MD, Chang JC, Johnson JE (2017) Repression by PRDM13 is critical for generating precision in neuronal identity. *Elife* PMID 28850031
82. Murray IA, Stickel SK, Roberts RJ (2010) Sequence-specific cleavage of RNA by Type II restriction enzymes. *Nucleic Acids Res* 38:8257–68
83. Niemeyer G, Schaefer A (2002) Sehstörung bei unauffälligem Fundus und pathologisch verändertem Elektroretinogramm: Differenzialdiagnosen. *Klin Monbl Augenheilkd* 219:259–263
84. Noble KG (1977) Central Areolar Choroidal Dystrophy. *Am J Ophthalmol* 84:310–318
85. Nong E, Lee W, Merriam JE, Allikmets R, Tsang SH (2014) Disease progression in autosomal dominant cone-rod dystrophy caused by a novel mutation (D100G) in the GUCA1A gene. *Doc Ophthalmol* 128:59–67
86. Ogbourne S, Antalis TM (1998) Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochem J* 331:1–14
87. Panwar N, Huang P, Lee J, Keane PA, Chuan TS, Richhariya A, Teoh S, Lim TH, Agrawal R (2016) Fundus Photography in the 21st Century--A Review of Recent Technological Advances and Their Implications for Worldwide Healthcare. *Telemed J E Health* 22:198–208
88. Pennacchio LA, Bickmore W, Dean A, Nobrega MA, Bejerano G (2013) Enhancers: five essential questions. *Nat Rev Genet* 14:288–95
89. Petrykowska HM, Vockley CM, Elnitski L (2008) Detection and characterization of silencers and enhancer-blockers in the greater CFTR locus. *Genome Res* 18:1238–46
90. Pingoud A, Jeltsch A (2001) Structure and function of type II restriction

- endonucleases. *Nucleic Acids Res* 29:3705–27
91. Prokofyeva E, Troeger E, Bernd A, Zrenner E (2012) Visual acuity changes in cone and cone-rod dystrophies. *Ophthalmic Physiol Opt* 32:53–59
  92. Qi H, Liu M, Emery DW, Stamatoyannopoulos G (2015) Functional validation of a constitutive autonomous silencer element. *PLoS One* 10:e0124588
  93. Ransom M, Dennehey BK, Tyler JK (2010) Chaperoning Histones during DNA Replication and Repair. *Cell* 140:183–195
  94. Rassow J, Hauser K, Roland N, Deutzmann R (2006) *Duale Reihe, Biochemie*. Stuttgart, ISBN: 3-13-125351-7
  95. Ravasi T, Huber T, Zavolan M, Forrest A, Gaasterland T, Grimmond S, Arakawa T, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y (2003) Systematic characterization of the zinc-finger-containing proteins in the mouse transcriptome. *Genome Res* 13:1430–1442
  96. Reams AB, Roth JR (2015) Mechanisms of gene duplication and amplification. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7:a016592
  97. Rodman J, Black G, Woods A (2013) Central areolar choroidal dystrophy with associated dominant drusen. *J Optom* 6:114–122
  98. Rosenberg T, Roos B, Johnsen T, Bech N, Scheetz TE, Larsen M, Stone EM, Fingert JH (2010) Clinical and genetic characterization of a Danish family with North Carolina macular dystrophy. *Mol Vis* 16:2659–2668
  99. Rossi R, Montecucco A, Ciarrocchi G, Biamonti G (1997) Functional characterization of the T4 DNA ligase: a new insight into the mechanism of action. *Nucleic Acids Res* 25:2106–13
  100. Sachsenweger M (2003) *Duale Reihe - Augenheilkunde*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, ISBN: 313-1283122
  101. Sakabe NJ, Savic D, Nobrega MA (2012) Transcriptional enhancers in development and disease. *Genome Biol* 13:238
  102. Sanger F, Nicklen S, Coulson A (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci, U S A*, Vol. 74, No. 12, pp 5463-5367, ISBN 74:5463-5467
  103. Satoh A, Brace CS, Rensing N, Imai SI (2015) Deficiency of Prdm13, a dorsomedial hypothalamus-enriched gene, mimics age-associated changes in sleep quality and adiposity. *Aging Cell* 14:209–218
  104. Schaffner W (2015) Enhancers, enhancers – from their discovery to today's universe of transcription enhancers. *Biol Chem* 396:311–327
  105. Schmidt O (2017) *Genetik und Molekularbiologie*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg

106. Schoenberger, Scott D., Agarwal A et. al. (2013) Intrachoroidal Cavitation in North Carolina Macular Dystrophy. *JAMA Ophthalmol* 131:1073
107. Sepah YJ, Akhtar A, Sadiq MA, Hafeez Y, Nasir H, Perez B, Mawji N, Dean DJ, Ferraz D, Nguyen QD (2014) Fundus autofluorescence imaging: Fundamentals and clinical relevance. *Saudi J Ophthalmol* 28:111
108. Silva RS, Arno G, Cipriani V, et al (2019) Unique noncoding variants upstream of PRDM13 are associated with a spectrum of developmental retinal dystrophies including progressive bifocal chorioretinal atrophy. *Hum Mutat* 40:578–587
109. Smailhodzic D, Fleckenstein M, Theelen T, et al (2011) Central Areolar Choroidal Dystrophy (CACD) and Age-Related Macular Degeneration (AMD): Differentiating Characteristics in Multimodal Imaging. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 52:8908
110. Small KW (1998) North Carolina macular dystrophy: clinical features, genealogy, and genetic linkage analysis. *Trans Am Ophthalmol Soc* 96:925–61
111. Small KW, DeLuca AP, Whitmore SS, et al (2016) North Carolina Macular Dystrophy Is Caused by Dysregulation of the Retinal Transcription Factor PRDM13. *Ophthalmology* 123:9–18
112. Small KW et. al. (2017) North Carolina macular dystrophy: mutations found in 12 additional families | IOVS | ARVO Journals. Issue 8, Volume 58
113. Small KW, Weber JL, Roses A, Lennon F, Vance JM, Pericak-Vance MA (1992) North Carolina macular dystrophy is assigned to chromosome 6. *Genomics* 13:681–685
114. Small KW, Weber J, Roses A, Pericak-Vance P (1993) North carolina macular dystrophy (MCDR1). *Ophthalmic Genet* 14:143–150
115. Small KW, Killian J, Mclean WC (1991) North Carolina's dominant progressive foveal dystrophy: how progressive is it? *British Journal of Ophthalmology*
116. Smith DR (1993) Restriction Endonuclease Digestion of DNA. In: *Transgenes. Tech.* Humana Press, New Jersey, ISBN: 978-0-89603-245-3, pp 427–432
117. Spaide RF, Curcio CA (2011) ANATOMICAL CORRELATES TO THE BANDS SEEN IN THE OUTER RETINA BY OPTICAL COHERENCE TOMOGRAPHY. *Retina* 31:1609–1619
118. Staurenghi G, Sadda S, Chakravarthy U, Spaide RF (2014) Proposed Lexicon for Anatomic Landmarks in Normal Posterior Segment Spectral-Domain Optical Coherence Tomography: The IN•OCT Consensus. *Ophthalmology* 121:1572–1578
119. Stepanenko AA, Dmitrenko VV (2015) HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution. *Gene* 569:182–190

120. Thapar A, Cooper M (2013) Copy number variation: What is it and what has it told us about child psychiatric disorders? *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 52:772–774
121. Thiadens AAHJ, Hoyng CB, Polling JR, Bernaerts-Biskop R, van den Born LI, Klaver CCW (2013) Accuracy of Four Commonly Used Color Vision Tests in the Identification of Cone Disorders. *Ophthalmic Epidemiol* 20:114–122
122. Thomas P, Smart TG (2005) HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods* 51:187–200
123. Trepel M (2012) *Neuroanatomie: Struktur und Funktion*, 5. Auflage. Elsevier, Urban & Fischer, 2011, München
124. Vernimmen D, Bickmore WA. (2015) The Hierarchy of Transcriptional Activation: From Enhancer to Promoter. *Trends Genet* 31:696–708
125. Vision NRC (US) C on (1981) Procedures for Testing Color Vision: Report of Working Group 41. Natl Acad Press Bookshelf ID: NBK217823
126. Vogt D, Overesch G, Endimiani A, Collaud A, Thomann A, Perreten V (2014) Occurrence and Genetic Characteristics of Third-Generation Cephalosporin-Resistant *Escherichia coli* in Swiss Retail Meat. *Microb Drug Resist* 20:485–494
127. Walter P (2017) *Basiswissen Augenheilkunde*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, ISBN: 978-3-662-52800-6
128. WANG Y, LIU J, HUANG B, et al (2015) Mechanism of alternative splicing and its regulation. *Biomed Reports* 3:152–158
129. Watanabe S, Sanuki R, Sugita Y, Imai W, Yamazaki R, Kozuka T, Ohsuga M, Furukawa T (2015) Prdm13 regulates subtype specification of retinal amacrine interneurons and modulates visual sensitivity. *J Neurosci* 35:8004–8020
130. Watson J (2011) *Molekularbiologie*. Pearson Studium, München, ISBN: 9783868940299
131. Weleber RG (2016) Dysregulation of Retinal Transcription Factor PRDM13 and North Carolina Macular Dystrophy. *Ophthalmology* 123:2–4
132. Western LM, Rose SJ (1991) A novel DNA joining activity catalyzed by T4 DNA ligase. *Nucleic Acids Res* 19:809–13
133. Yao S, Hart DJ, An Y (2016) Recent advances in universal TA cloning methods for use in function studies. *Protein Eng Des Sel* 29:551–556
134. Zhang AJ, Wu SM (2010) Responses and receptive fields of amacrine cells and ganglion cells in the salamander retina. *Vision Res* 50:614–622
135. Zhang L, Cao H, He T, Yang J, Tao H, Wang Y, Hu Q (2018) Overexpression of PRDM13 inhibits glioma cells via Rho and GTP enzyme activation protein. *Int J Mol Med* 42:966–974

136. TFClass: a classification of human transcription factors and their rodent orthologs.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4383905/>. Accessed 1 May 2020

## **11 Publikationsverzeichnis**

Preising MN, Platschek MP, Lorenz B, Testing for North Carolina Macular Dystrophy (NCMD) Variations. Invest Ophthal Vis Sci 2019 60:395, Poster Presentation

## **12 Ehrenwörtliche Erklärung**

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

Datum

Unterschrift

### 13 Danksagung

Bei Frau Prof. Dr. Birgit Lorenz und Prof. Dr. Dr. Knut Stieger bedanke ich mich für die Bereitstellung der Laborräume.

Mein ausgesprochener Dank gilt vor allem Herrn PD Dr. rer. medic. Markus Preising für die stets freundliche und zuverlässige Unterstützung meiner Doktorarbeit während des gesamten Studiums. Insbesondere möchte ich mich für die außerordentliche Hilfsbereitschaft und Geduld während der Laborarbeiten bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt dem gesamten Laborteam, allen voran Frau Annabella Janise und Herrn Dr. Tobias Wimmer für die schönen Momente und Ermutigungen während meiner Tätigkeit.

Außerdem möchte ich meiner geliebten Familie und meinen Freunden danken, die mich zu jeder Zeit unterstützt und mir den nötigen Rückhalt für die Vollendung der Doktorarbeit gegeben haben.