

AUS DER ABTEILUNG FÜR KINDERAUGENHEILKUNDE, STRABISMOLOGIE UND
OPHTHALMOGENETIK IN DER KLINIK UND POLIKLINIK FÜR AUGENHEILKUNDE
PROF. DR. BIRGIT LORENZ
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

GENOTYP/PHÄNOTYP KORRELATION BEI PATIENTEN MIT MUTATIONEN IN GENEN DES RETINOLZYKLUS

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät der
Universität Regensburg

vorgelegt von
Christoph Gerd Eckstein

2010

AUS DER ABTEILUNG FÜR KINDERAUGENHEILKUNDE, STRABISMOLOGIE UND
OPHTHALMOGENETIK IN DER KLINIK UND POLIKLINIK FÜR AUGENHEILKUNDE
PROF. DR. BIRGIT LORENZ
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

GENOTYP/PHÄNOTYP KORRELATION BEI PATIENTEN MIT MUTATIONEN IN GENEN DES RETINOLZYKLUS

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät der
Universität Regensburg

vorgelegt von
Christoph Gerd Eckstein

2010

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Weber
Referent:	Prof. Dr. med. Birgit Lorenz
Koreferent:	Prof. Dr. med. Thomas Kühnel
Tag der mündlichen Prüfung:	07. Mai 2010 und 12. Mai 2010

„Prüfet alles und behaltet das Gute“

Paulus, I Thess. 5, 21

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	4
1.1 Signaltransduktion des Sehvorganges und Regeneration des Sehpigmentes	4
1.1.1 Aufnahme und Metabolisierung von Vitamin A.....	4
1.1.2 Der visuelle Transduktionsprozess	5
1.1.3 Der Retinolzyklus in den Stäbchen	6
1.1.4 Der Retinolzyklus in den Zapfen	8
1.2 Retinitis pigmentosa (RP).....	9
1.3 Early-onset severe retinal dystrophy (EOSRD).....	10
1.4 Leber´sche Congenitale Amaurose (LCA)	10
1.5 Fundus albipunctatus (FA)	11
1.6 Aufgabenstellung.....	12
2 Material und Methoden.....	13
2.1 Patientenkollektiv	13
2.2 Materialnachweis.....	13
2.3 Stammlösungen	14
2.3.1 Gerätenachweis für experimentelle Daten	14
2.3.2 Gerätenachweis für klinische Daten.....	15
2.4 Verarbeitung der Patientenproben.....	16
2.4.1 Probengewinnung.....	16
2.4.2 DNA-Isolation aus Lymphozyten des peripheren Blutes	16
2.4.3 Photometrie zur quantitativen Bestimmung.....	18
2.4.4 DNA-Isolation aus Mucosazellen der Mundschleimhaut	18
2.4.5 Ethanolfällung.....	19
2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)	19
2.5.1 Auflistung der Primer für das Gen <i>RDH12</i>	21
2.5.2 Auflistung der Primer für das Gen <i>RDH5</i>	21
2.6 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren und deren Nachweis	22
2.6.1 Agarose-Gelelektrophorese.....	23
2.6.2 DNA-Färbung in Agarosegelen mit Ethidiumbromid.....	23
2.6.3 Single-Strand-Conformation-Polymorphismus-Analyse (SSCP)	24
2.6.4 Bedingung der SSCP-Analyse	26

2.6.4.1 Bedingungen der SSCP-Analyse für das RDH12-Gen.....	26
2.6.4.2 Bedingungen der SSCP-Analyse für das RDH5-Gen.....	26
2.6.5 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen.....	26
2.7 Sequenzierungen und weitere Analyseverfahren.....	27
2.7.1 Template-Präparation.....	27
2.7.2 Sequenzierreaktion.....	27
3 Ergebnisse.....	29
3.1 Untersuchte Patienten und deren Verwandte.....	29
3.2 Ergebnisse im <i>RDH12</i> -Gen.....	29
3.2.1 Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchung.....	29
3.2.2 Zusammenfassung der klinischen Untersuchungsergebnisse der oben genannten Patienten.....	31
3.3 Ergebnisse im <i>LRAT</i> -Gen.....	34
3.3.1 Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchung.....	34
3.3.2 Zusammenfassung der klinischen Untersuchungsergebnisse des Patienten mit <i>LRAT</i> -Mutationen.....	35
3.4 Ergebnisse im <i>RDH5</i> -Gen.....	36
3.4.1 Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchung.....	36
3.4.2 Zusammenfassung der klinischen Untersuchungsergebnisse der Patienten mit <i>RDH5</i> -Mutationen.....	37
3.5 Vergleich der Visuswerte der verschiedenen Patientenkollektive.....	40
4 Diskussion.....	41
4.1 Auswirkungen der Mutationen im <i>RDH12</i> -Gen.....	41
4.1.1 Pathologisches Potential der Mutationen im <i>RDH12</i> -Gen.....	41
4.1.2 Vergleich des Phänotyps der <i>RDH12</i> -Patienten mit der Literatur.....	41
4.2 Auswirkungen der Mutationen im <i>LRAT</i> -Gen.....	43
4.2.1 Krankheitsauslösendes Potential von Mutationen im <i>LRAT</i> -Gen.....	43
4.2.2 Vergleich des Phänotyps unseres Patienten mit der Literatur.....	43
4.3 Auswirkungen der Mutationen im <i>RDH5</i> -Gen.....	43
4.3.1 Krankheitsauslösendes Potential von Mutationen im <i>RDH5</i> -Gen.....	43
4.3.2 Vergleich des Phänotyps der Patienten mit der Literatur.....	44
4.4 Vergleich der Merkmalsausprägungen in den verschiedenen Genen.....	45

5 Zusammenfassung und Ausblick.....	48
6 Literaturverzeichnis	50
7 Verzeichnis der verwendeten Software	58
8 Anhang	59
8.1 Klinische Daten der Patienten mit Mutationen im <i>RDH12</i> -Gen	59
8.2 Klinische Daten des Patienten mit Mutationen im <i>LRAT</i> -Gen	64
8.3 Klinische Daten der Patienten mit Mutationen im <i>RDH5</i> -Gen	65
9 Abkürzungsverzeichnis	69
9.1 Allgemein	69
9.2 Aminosäuren	73
10 Lebenslauf	74
11 Danksagungen	75

1 Einleitung

1.1 Signaltransduktion des Sehvorganges und Regeneration des Sehpigmentes

Der Retinolzyklus oder Sehzyklus besteht aus mehreren enzymatischen Reaktionen, deren Aufgabe es ist, ausreichend Vitamin A, in Form von 11-cis-Retinal, zur Verfügung zu stellen.

1.1.1 Aufnahme und Metabolisierung von Vitamin A

Vitamin A wird in Form von β -Caroten und Retinylestern über den Dünndarm aufgenommen. Die Ester werden im Dünndarmlumen durch pankreatische Lipasen gespalten. Das Caroten wird in den Enterozyten aufgespalten. Das entstehende Retinol wird an das zelluläre retinolbindende Protein II (CRBP-II) gebunden. Dann wird das Retinol durch das Enzym Lecithin-Retinol-Acyltransferase (LRAT) mit langkettigen Fettsäuren verestert. Die entstandenen Ester werden in Chylomikronen gespeichert. Diese gelangen über den Ductus lymphaticus in den Blutkreislauf und werden, nach mehreren Abbauschritten, als Remnants von den Parenchymzellen der Leber aufgenommen. Hier werden die Retinylester wieder hydrolysiert. Ein Teil des entstandenen Retinols wird unverestert an die hepatischen Sternzellen weitergegeben und dort gespeichert. Der andere Teil des Retinols wird an das retinolbindende Protein (RBP) gebunden und in das Plasma abgegeben. Über das Plasma werden dann die extrahepatischen Vitamin A-Speicher aufgefüllt. Einen solchen „Speicher“ stellt auch das retinale Pigmentepithel (RPE) da, wo Retinol in veresteter Form gespeichert wird⁵. Die Aufnahme in die Zelle geschieht über den spezifischen Membranrezeptor STRA6, der in bovinen RPE-Zellen entdeckt wurde^{30,73}.

1.1.2 Der visuelle Transduktionsprozess

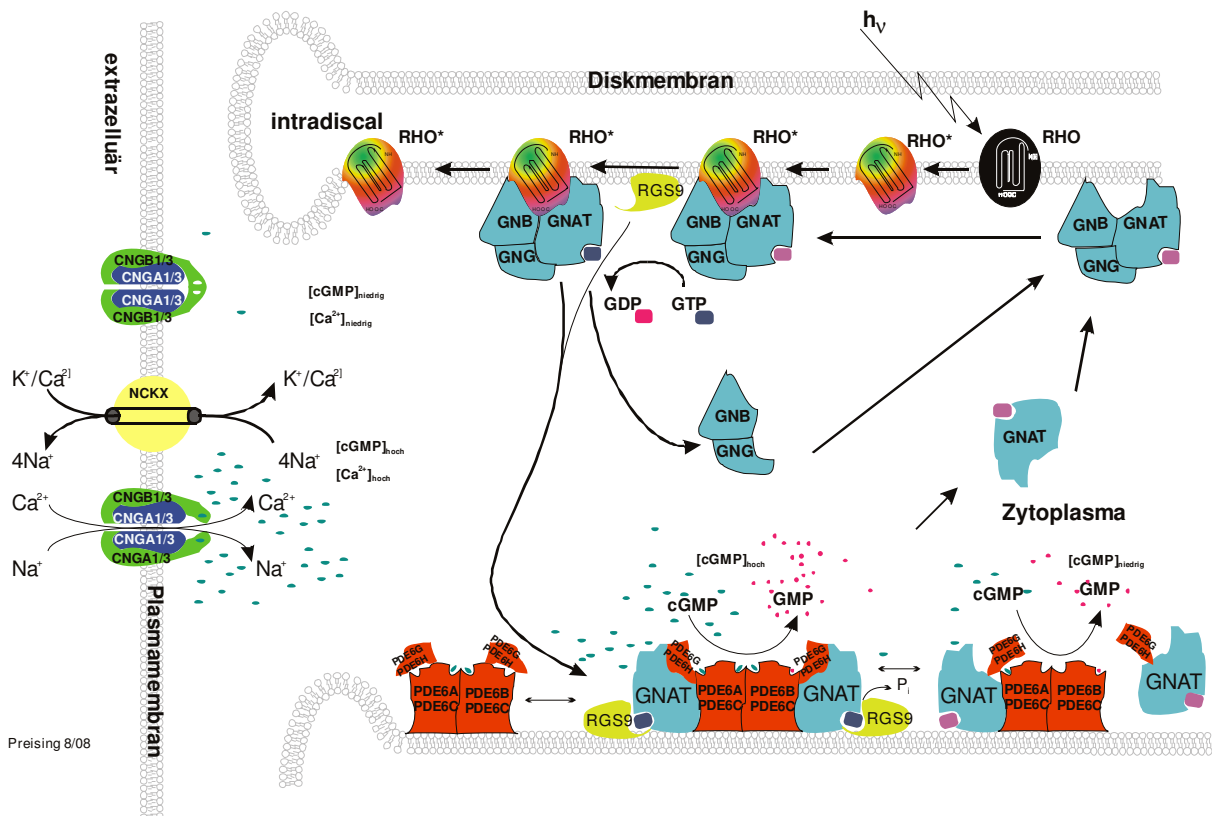


Abbildung 1: Biochemische Zyklen der Phototransduktion [Abkürzungen: Calcium (Ca^{2+}), zyklisches 3'5'-Guanosin-Monophosphat (cGMP), Guanosindiphosphat (GDP), Transducin α -Untereinheit (GNAT), Transducin β -Untereinheit (GNB), Transducin γ -Untereinheit (GNG), Guanosin triphosphat (GTP), Kalium (K^+), Natrium (Na^+), Phosphodiesteraseuntereinheiten im Stäbchen (katalytisch: PDE6A, PDE6B, inhibitorisch: PDE6G), Phosphodiesteraseuntereinheiten im Zapfen (katalytisch: PDE6C, inhibitorisch: PDE6H), Rhodopsin (RHO), regulator of G-Protein signalling 9 (RGS9), α -Untereinheit des retinalen Ca^{2+} -Kanals (im Stäbchen bzw. Zapfen CNGA1/3), β -Untereinheit des retinalen Ca^{2+} -Kanals (im Stäbchen bzw. Zapfen CNGB1/3)]. (Mit freundlicher Genehmigung von Dr. M. Preising.)

Die Umwandlungen des Lichtsignals in ein elektrisches Signal geschieht über den Prozess der Phototransduktion (siehe Abbildung 1). In der Dunkelheit ist 11-cis-Retinal kovalent über eine Schiff'sche Base an das Apo-Protein Opsin, bzw. die Zapfenpigmente, gebunden. Dies wird als Rhodopsin bezeichnet. Fällt Licht auf die Retina, wird 11-cis-Retinal zu all-trans-Retinal isomerisiert. Durch die Konfigurationsänderung des Retinals verschiebt sich die Bindung über die Schiff'sche Base⁵. Damit ändert sich die Konfiguration des Rhodopsins zum Metarhodopsin II⁶¹.

Dieses aktiviert den G-Protein-Komplex Transducin ($T_{\alpha\beta\gamma}$ -Guanosindiphosphat (GDP)), der nun einen T_{α} -GTP-Komplex - unter Phosphorylierung (Phosphat stammt aus der Spaltung eines Guanosin-Triphosphat-Moleküls (GTP)) - abspaltet.

Der T_{α} -GTP-Komplex aktiviert ein Phosphodiesterasedimer (PDE6A/B) durch Bindung an eines seiner beiden regulatorischen γ -Untereinheiten (PDE6G). Die so aktivierte PDE6 hydrolysiert zyklisches 3'5'-Guanosin-Monophosphat (cGMP), das intrazellulär die Kalziumkanäle offen hält. Durch den daraus folgenden Abfall der cGMP-Konzentration schließen sich die Ca^{++} Kanäle und es findet eine lichtinduzierte Hyperpolarisation statt. Diese hat eine abnehmende Ausschüttung von Glutamat am „Fuß“ der Photorezeptoren zur Folge und stellt die Antwort auf den Lichtreiz dar ¹⁵.

Der $Na^{+}/K^{+}/Ca^{++}$ -Ionentauscher bleibt von diesem Vorgang unberührt und pumpt weiterhin Ca^{++} -Ionen nach extrazellulär. Dadurch fällt die Ca^{++} -Konzentration im Photorezeptor von 500 nM auf 50 nM. Dieser Abfall stimuliert das Guanylyl-cyclase-aktivierende Protein (GCAP). Das GCAP aktiviert die retinale Guanylatzyklase RetGC-1, die den intrazellulären cGMP-Spiegel wieder erhöht, nämlich durch Bildung von cGMP aus GTP. Dadurch öffnen sich die cGMP-gesteuerten Kanäle und Na^{+} und Ca^{++} können wieder in die Zelle strömen ³³. Die Rezeptorzellen depolarisieren.

1.1.3 Der Retinolzyklus in den Stäbchen

Die Photoisomerisierung von 11-cis zu all-trans-Retinal liegt energetisch auf der Seite des all-trans-Isomers. Deshalb muss sie auf enzymatischem Wege rückgängig gemacht werden. Dies geschieht über den Retinolzyklus, der in Abbildung 2 grafisch dargestellt ist und nachfolgend erläutert wird.

Nach der Photoisomerisierung liegt das all-trans Retinal in den Photorezeptordisks an Phosphatidylethanolamin gebunden vor und wird mit Hilfe der ABCA4-Flippase auf die zytoplasmatische Seite gebracht ⁷⁴. Es bestand die Vermutung, dass im Photorezeptor selbst all-trans-Retinal durch das Enzym Retinoldehydrogenase 12 (RDH12) zu all-trans-Retinol (Vitamin A) reduziert wird. Die Ausschaltung des RDH12-Enzymes zeigte jedoch keine Beeinträchtigung des Retinolzyklus, deshalb ist davon auszugehen, dass andere Retinoldehydrogenasen für diesen Schritt zuständig sind und RDH12 eine detoxifizierende Funktion wahrnimmt ⁴⁴.

Alle weiteren Schritte des Retinolzyklus finden dann im retinalen Pigmentepithel statt. Dazu wird das Vitamin A zum retinalen Pigmentepithel transportiert ⁶¹. Dabei spielt das in der Interphotorezeptormatrix vorkommende Protein IRBP (interstitial retinoid-binding protein) eine wichtige Rolle ⁷⁴.

Das Enzym Lecithin-Retinol-Acyl-Transferase (LRAT) katalysiert die Veresterung des all-trans-Retinols mit der Acylgruppe an der sn1-Position (meistens Palmitinsäure) des Moleküls Phosphatidylcholin^{48,61}.

Daneben gibt es noch ein weiteres Enzym, die Acyl-CoA-Retinol-Acyltransferase (ARAT), welches ebenfalls all-trans Retinylester produziert. Allerdings dient diesem Enzym Palmitoyl-CoA als Acyldonor und nicht Phosphatidylcholin. Der K_M -Wert dieses Enzymes ist zehnfach höher als der von LRAT, deswegen kann man annehmen, dass ARAT dazu dient, hohe all-trans Retinolspiegel zu senken²⁹.

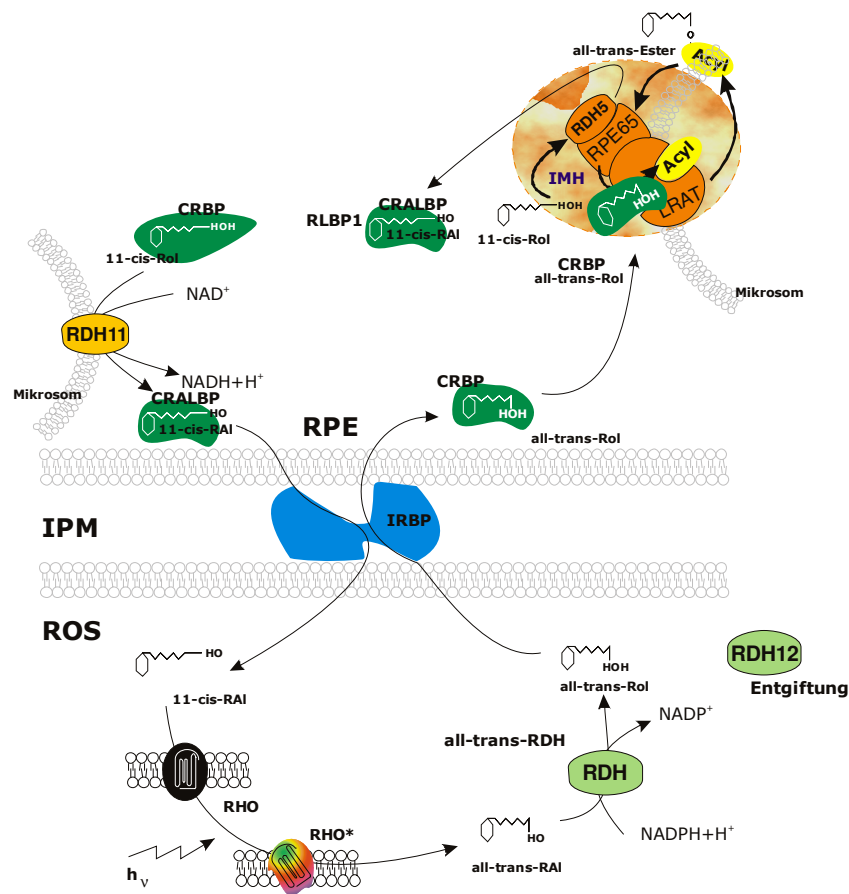


Abbildung 2: Der Retinolzyklus (Abkürzungen: cellular retinal binding protein (CRALBP), cellular retinol binding protein (CRBP), interphotoreceptor retinoid binding protein (IRBP), Lecithin-Retinol-Acyl-Transferase (LRAT), Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH), Retinal (RAL), Retinoldehydrogenase (RDH), Rhodopsin (RHO), Retinol (ROL), retinales Pigmentepithel (RPE), serum retinol-binding protein (SRBP)) (Mit freundlicher Genehmigung von Dr. M. Preisung.)

Die entstehenden all-trans-Retinylester werden durch die Isomerohydrolase *RPE65* (retinal pigment epithelium-specific 65-kDa protein) wieder hydrolysiert und das all-trans-Retinol in ein 11-cis-Retinol isomerisiert⁴⁹. Durch die Esterspaltung wird die notwendige Energie frei, mit der das Vitamin A von der all-trans- in die 11-cis-Form umgewandelt werden kann⁵. Anschließend wird das 11-cis-Retinol durch das Cellular-Retinaldehyde-Binding-Protein (CRALBP) gebunden

und an die 11-cis-Retinaldehydrogenase (RDH5) weitergegeben. Dieses Enzym steht am Ende des Retinolzyklus und oxidiert einen Großteil des 11-cis-Retinol zu 11-cis-Retinal³². Daneben scheint das RPE über alternative Wege der Herstellung von 11-cis-Retinal zu verfügen, die für die verzögerte Dunkeladaptation bei Patienten mit inaktiverter 11-cis-Retinaldehydrogenase verantwortlich sind^{10,17}.

11-cis-Retinal wird durch das CRALBP - in Interaktion mit ERM (ezrin, radixin, mosin) bindenden Phosphoprotein 50 (EBP50) - zur RPE-Plasmamembran transportiert³⁵. Dort wird es von den Photorezeptorzellen wieder aufgenommen und mit Opsin kovalent verbunden. Der Sehzyklus kann von neuem beginnen.

1.1.4 Der Retinolzyklus in den Zapfen

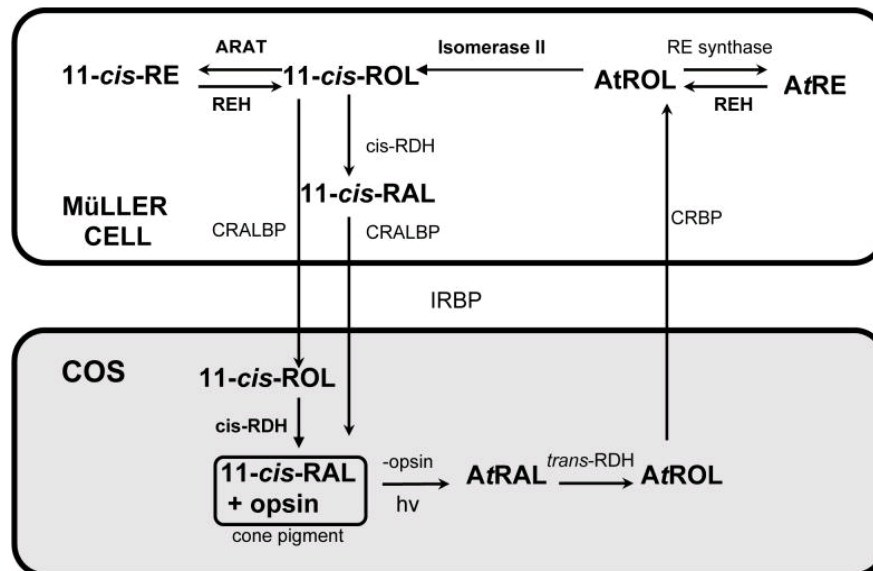


Abbildung 3: Hypothetischer eigenständiger Retinolzyklus der Zapfen nach Muniz et al. 2007 (Abkürzungen: 11-cis acyl CoA retinol acyl transferase (ARAT), all-trans retinyl ester (AtRE), all-trans retinal (AtRAL), all-trans retinol (AtROL), cellular retinal binding protein (CRALBP), cellular retinol binding protein, Type I (CRBP), interphotoreceptor retinoid binding protein (IRBP), retinal (RAL), retinol dehydrogenase (RDH), retinyl ester (RE), all-trans retinyl ester hydrolase (REH), retinol (ROL))⁵¹.

Neuere Forschungen legen den Schluss nahe, dass es einen eigenen Retinolzyklus für die Zapfen gibt. Dies wurde bei Tieren (Huhn / Zebrafisch), deren Retina vorwiegend aus Zapfen besteht, untersucht. In Abbildung 3 ist die derzeitige Hypothese zu einem solchen Retinolzyklus für Zapfen grafisch dargestellt. Als lichtsensitives Element dient auch hier 11-cis-Retinal, das durch die Lichtabsorption zu all-trans-Retinal isomerisiert wird. Dieses wird im Außensegment

des Zapfens durch ein unbekanntes Enzym zu all-trans-Retinol reduziert und anschließend in die Müller-Zellen transportiert. Dabei scheint das IRBP eine wichtige Rolle zu spielen. In den Müller-Zellen wird das all-trans-Retinol an CRBP gebunden und dann durch eine für die Müller-Zellen spezifische Isomerase II zu 11-cis-Retinol isomerisiert (RPE-Zellen und Müller-Zellen exprimieren jeweils unterschiedliche Formen dieses CRBPs). Daneben scheint es noch einen zweiten Weg zu geben, auf dem das all-trans-Retinol zunächst zu all-trans-Retinylester verestert wird. Dies geschieht durch ein anderes Enzym als ARAT oder LRAT. Dann findet die Isomerisierung durch die Isomerase I zu 11-cis-Retinol statt.

Dieses wird nun auf zwei Wege verstoffwechselt. Der erste Weg dient der Speicherung. 11-cis-Retinol wird durch das Enzym 11-cis-ARAT zu 11-cis-Retinylester verestert und bei Bedarf durch die 11-cis-Retinylesterhydrolase wieder freigesetzt. Über den anderen Weg wird 11-cis-Retinol gleich durch eine Retinoldehydrogenase zu 11-cis-Retinal oxidiert. Ob dieser enzymatische Schritt in den Müller-Zellen oder in den Zapfen stattfindet, ist nicht geklärt. Sollte dieser Schritt in den Müller-Zellen stattfinden, kann man davon ausgehen, dass 11-cis-Retinal, wie übrigens auch das 11-cis Retinol, von CRALBP gebunden wird. Im Zapfen wird 11-cis-Retinal dann an eines der Zapfenopsine gebunden und der Retinolzyklus kann von neuem beginnen

19,51

1.2 Retinitis pigmentosa (RP)

Retinitis pigmentosa ist eine erbliche Netzhautdegeneration, die höchst variabel ausgeprägt ist. Die Krankheit kann autosomal-dominant (30%-40% der Fälle), autosomal-rezessiv (50%-60%) oder x-chromosomal (5%-15%) vererbt werden.

20% bis 30% der Patienten haben zusätzliche Erkrankungen, die nicht das Auge betreffen. Besonders häufig sind das Usher-Syndrom und das Bardet-Biedl-Syndrom.

Klassischerweise beginnt die Krankheit im Jugendalter mit Störungen der Dunkeladaptation und Nachtblindheit. Im jungen Erwachsenenalter stellt sich dann auch ein Verlust des peripheren Gesichtsfeldes ein, bis sich schließlich ein Tunnelblick entwickelt. Mit dem Alter von ungefähr 60 Jahren haben die Patienten auch die Fähigkeit des zentralen Sehens verloren. Morphologisch liegt diesen Symptomen ein Untergang der Stäbchen und Zapfen zugrunde, wobei die Beeinträchtigung der Stäbchenfunktion diejenige der Zapfen meist übertrifft.

Histologisch zeigt sich eine deutliche Verdünnung des Stratum nucleare externum der Retina. Im späteren Verlauf der Erkrankung degenerieren dann auch die Zellen, deren Kerne im Stratum nucleare externum (Amakrine-, Bipolar- und Horizontalzellen) liegen.

Die Ursache für diese Degenerationen ist meist monogenetisch. Jedoch sind bisher über 54 Loci entdeckt, die eine Retinitis pigmentosa hervorrufen (<http://www.retina-international.org/sci-news/disloci.htm>). Diese Loci erklären aber nur gut 50% der RP-Fälle. Die meisten dieser Gene sind nur für einen kleinen Teil der Fälle verantwortlich. Die Ausnahmen bilden das *Rhodopsin* (*RHO*), das *Usher-Syndrom Typ 2A-Gen* (*USH2A*) und das *Gen für den Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator* (*RPGR*). Das *Rhodopsin* ist für 25% der autosomal dominanten Fälle, das *USH2A-Gen* für etwa 20% der rezessiven Fälle und das *Gen für den Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator* (*RPGR*) für 70% der x-chromosomalen RPs verantwortlich²⁴.

1.3 Early-onset severe retinal dystrophy (EOSRD)

Diese Erkrankung wird autosomal rezessiv vererbt und hat ihre Ursache in Mutationen des *RPE65*-Gens. Die Patienten mit dieser Erkrankung haben vom Säuglingsalter an eine absolute Nachtblindheit und meistens auch einen Nystagmus. Dieser kann verschiedene Formen annehmen. Ein „Roving-Eye-Nystagmus“, der für LCA-Patienten typisch wäre, wurde bei den EOSRD-Patienten jedoch nicht beobachtet. Eine Photophobie wird in der Kindheit nicht festgestellt, kann sich aber im Erwachsenenalter entwickeln. Charakteristisch ist auch die anfangs starke Visusbeeinträchtigung, die in den ersten Lebensjahren eine Besserung erfährt. Der Visus liegt dann bei ungefähr 0,3, ist jedoch stark beleuchtungsabhängig. Die Kinder können in der Regel eine normale Schule besuchen. Das Farbsehvermögen ist in der Kindheit vorhanden. Charakteristisch sind Schwierigkeiten in der Blau-Grün-Diskriminierung. Der Fundus dieser Patienten ist im jungen Alter weitgehend unauffällig, was ein besonderes Charakteristikum dieser Erkrankung ist. Die Ausnahme stellt das Fehlen der Fundusautofluoreszenz dar. Bei erwachsenen Patienten entwickeln sich dann Makularveränderungen, peripapilläre Hypopigmentierung, aber keine Knochenbälkchen^{56,60}.

1.4 Leber´sche Congenitale Amaurose (LCA)

Die Leber´sche Congenitale Amaurose (LCA) stellt die schwerste Ausprägungsform im Spektrum aller erblichen Netzhautdegenerationen dar. Diese Krankheit tritt mit einer Prävalenz von drei auf 100.000 Neugeborenen auf. Sie ist charakterisiert durch eine bilaterale Blindheit, die seit Geburt besteht oder kurz nach dieser auftritt. Gewöhnlicherweise werden bereits vor dem Alter von sechs Monaten Auffälligkeiten beobachtet. Nach der Definition von Foxman und Kol-

legen sollte das ERG bis zu dem Alter von einem Jahr erloschen sein ²⁰. Weitere Diagnosekriterien für die LCA sind Nystagmus, amaurotische Pupillen und eine Retinopathie.

Unter dem Begriff LCA werden mehrere unterschiedliche Erkrankungen zusammengefasst. Diese kann man im Wesentlichen in drei Arten unterteilen: in eine Aplasie, die auf einer gestörten embryologischen Formation der Photorezeptoren beruht, eine Degeneration, die sehr früh und progressiv zum Untergang der Photorezeptoren führt und in eine Dysfunktion, wobei die Anatomie unauffällig bleibt, jedoch ein biochemischer Schlüsselmechanismus fehlt ³³. Nachfolgend (**Abbildung 4**) ist eine Übersicht aufgeführt über Gene, die ursächlich für erbliche Netzhautdegenerationen, wie z. B. LCA, sind.

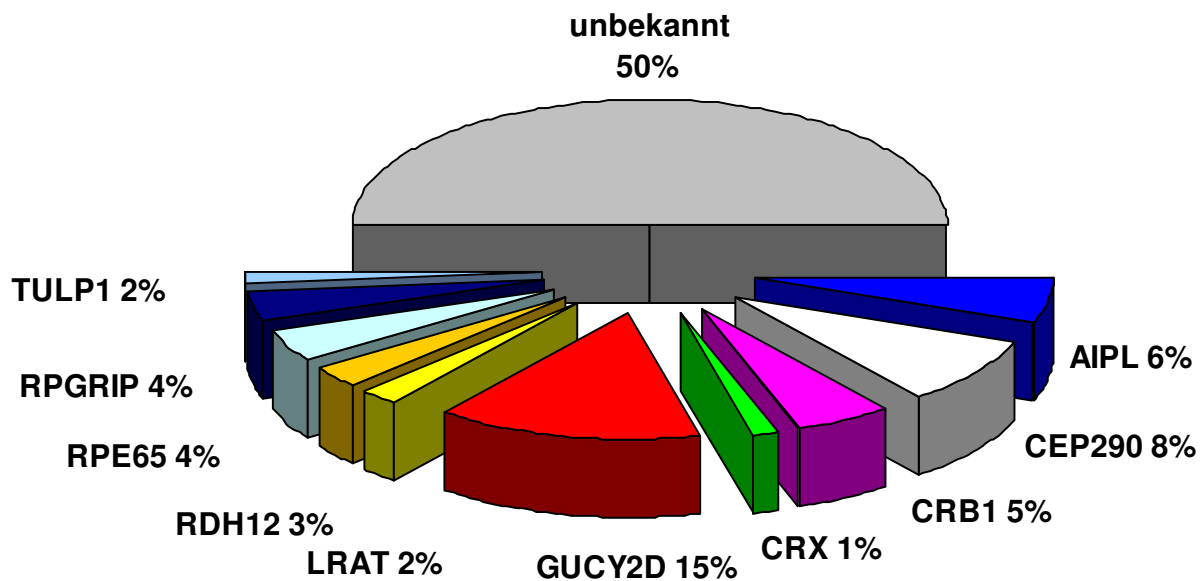


Abbildung 4: Übersicht der Gene, die frühkindliche Netzhautdegenerationen verursachen. Unter die 50% „unbekannt“ fallen auch Gene wie das *Lebercilin*, *IMPDH* und *C10RF36*. Zu diesen wurden bislang nur wenige Studien veröffentlicht. Mutationen in diesen Genen sind, im Zusammenhang mit frühkindlichen Netzhautdegenerationen, extrem selten (akkumuliert aus ^{4,11-14,22,23,26,38,39,50,57,59,63,66,69,76-78}).

1.5 Fundus albipunctatus (FA)

Fundus albipunctatus ist eine stationäre Form der kongenitalen Nachtblindheit und wird autosomal rezessiv vererbt. Klinisch imponieren zahlreiche gelb/weiße Flecken, die über die gesamte Retina verstreut sind ⁷. Sie zeigen sich typischerweise in einem radialen Muster außerhalb der Makula. Dieses Fundusbild wird von einer abnormal langsamen Regeneration des Sehpigments begleitet. Im Elektroretinogramm (ERG) zeigen sich signifikant reduzierte Stäbchenant-

worten, die, nach einer Dunkeladaptationsperiode von über zwei Stunden, normale Werte annehmen können⁷. Die photopischen Antworten im ERG liegen meist im normalen Bereich^{54,55}. Die Sehschärfe, das Gesichtsfeld und die Farbwahrnehmung sind normal⁵³.

Untersuchungen haben gezeigt, dass Fundus albipunctatus u. a. durch Mutationen im *RDH5*-Gen verursacht ist. Dieses Gen kodiert für die 11-cis-Retinaldehydrogenase, deren Funktion unter 1.1.3 beschrieben ist^{21,75}. Daneben werden in der Literatur regelmäßig Fälle von Zapfendystrophie beschrieben, die zusammen mit FA und *RDH5*-Mutationen auftreten und sich auch als Makuladystrophie äußern können. Dies betrifft meist ältere männliche Patienten jenseits des 40. Lebensjahres. Bei diesen Patienten waren die photopischen ERGs signifikant erniedrigt⁵². Niwa et al. konnten zeigen, dass in einem solchen Patientenkollektiv 38% eine ausgeprägte Zapfendystrophie hatten⁵⁵.

1.6 Aufgabenstellung

Patienten mit schweren frühkindlichen Netzhautdegenerationen (EOSRD), Leber'sche kongenitale Amaurose (LCA), Retinitis pigmentosa (RP) oder Fundus albipunctatus (FA) wurden auf Mutationen in zwei Retinaldehydrogenase-Genen (*RDH5*, *RDH12*) untersucht und mit dem Phänotyp von *LRAT*- und *RPE65*-Mutationen verglichen. Das *RDH5*-Gen wurde gezielt bei Patienten mit FA und wenigen Patienten mit EOSRD überprüft.

Für die Patienten mit nachgewiesenen Mutationen wurde eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation erstellt.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Die untersuchten Personen hatten die Diagnosen Retinitis pigmentosa, Leber´sche kongenitale Amaurose (LCA), early-onset severe retinal dystrophy (EOSRD), Stäbchen-Zapfen Dystrophie (RCD), Zapfen-Stäbchen Dystrophie, kongenitale stationäre Nachtblindheit (CSNB) oder Fundus albipunctatus. Eine Zusammenfassung der ophthalmologischen Daten für ausgewählte Patienten findet sich im Anhang.

Die klinischen Daten der Patienten wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht neu erhoben, sie stammen von früheren Konsultationen in der Abteilung für Kinderophthalmologie, Strabismologie und Ophthalmogenetik des Klinikums der Universität Regensburg, oder aus anderen medizinischen Einrichtungen. Diese Daten sind unter Punkt 8 im Anhang zusammengefasst.

2.2 Materialnachweis

Die verwendeten Chemikalien wurden in p. a. Qualität eingesetzt und waren Produkte der Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen), BioRad (München), Biozym (Hess. Oldendorf).

Die Taq-DNA-Polymerase wurde von der Firma Promega (Mannheim), die dNTP´s von der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen. Bei der long range-PCR (lrPCR) kam die Phusion Polymerase (Finnzymes im Vertrieb durch New England Biolabs NEB, Frankfurt a.M.) zum Einsatz. Die Elektrophoresemedien wurden von den Firmen Roth (Acrylamid) und Biozym (Agarose) bezogen.

Das Papier und die Folien zur Fixierung der SSCP-Gele kamen ebenfalls von der Firma Biozym.

Die Firma New England BioLabs (Frankfurt a. M.) lieferte die Restriktionsendonukleasen. Als Molekulargewichtsmarker für die Agarose-Gelelektrophorese wurde ein GeneRuler - DNA Ladder Mix von der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet.

Außerdem kamen noch folgende kommerzielle Systeme zum Einsatz:

Promega (Mannheim), PCR-CleanUp-System, Nr. A9282

Macherey-Nagel (Düren), NucleoSpin Extract II

2.3 Stammlösungen

Die eingesetzten Lösungen und Puffer wurden als hochkonzentrierte Stammlösungen ange-
setzt. Sie werden in diesem Abschnitt aufgeführt, sofern sie nicht den Versuchsbeschreibungen
vorangestellt sind.

Die Gebrauchskonzentrationen wurden durch Verdünnung mit Aqua dest. erreicht.

Wenn für eine Lösung oder ein Medium ein bestimmter pH-Wert angegeben war, so wurden die
genannten Stoffe in 80% des Endvolumens Aqua bidest. gelöst und der pH-Wert - je nach Diffe-
renz - mit Natronlauge oder Salzsäure eingestellt. Danach füllte man die Lösung auf das Endvo-
lumen des jeweiligen Ansatzes mit Aqua bidest. auf.

Die Sterilisation der Lösungen geschah entweder durch Filtration mit Filtern der Firma Corning,
Bodenheim (Nr. 431161) oder durch Autoklavieren bei 120°C und 1,2 bar Überdruck für 20 min.

10 x TBE-Puffer

1 M Tris
0,83 M Borsäure
0,01 M EDTA*2Na
pH 8
Ansatz autoklavieren

5 x Entwickler für die Silberfärbung

2,8 M Na₂CO₃
Paraformaldehyd
Ansatz autoklavieren

1 x TE-Puffer

10 mM Tris
5 mM EDTA*2NA
pH 8
Ansatz autoklavieren

2.3.1 Gerätenachweis für experimentelle Daten

Blockthermostat	QBT2	Grant Instruments
Gelelektrophoresekammern:	Horizon 11-14	Life Technologies
Geltrockner:	Minidry	Biometra, Göttingen
Gradient:	Cyclone Gradient	Peqlab, Erlangen

Thermostat für SSCP-Kammern:	C10, K15	Haake, Thermo Electron, Karlsruhe
PCR-Geräte:	Cyclone 96	Peqlab, Erlangen
	Cyclone 96 Gradient	Peqlab, Erlangen
	Cyclone 25	Peqlab, Erlangen
	PTC 100	MJ-Research
Photometer:	Gene Quant II	Pharmacia Biotech, Freiburg
Pipetten:	Reference 1000, 100, 10	Eppendorf, Hamburg
	Research 20	Eppendorf, Hamburg
	Easypet	Eppendorf, Hamburg
Rüttler:		Stovall, Greensboro, USA
Spannungsgeräte:	PS 305 T	Biometra, Göttingen
	PS 305	Life Technologies, Gaithersburg, USA
	200/2.0	BioRad, München
SSCP-Kammern:	Multigel Long	Biometra, Göttingen
Geldokumentation:	TFX-20.M	MWG-Biotech, Ebersberg
Vortex:	Vortex genie 2	IKA, Staufen
Waage:	BP 1200	Sartorius, Göttingen
Wasserbad:		GFL, Burgwedel
Zentrifugen:	Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
	4K15	Sigma, Osterode

2.3.2 Gerätenachweis für klinische Daten

Funduskamera:	TOPCON TRC 50X	Topcon Optical, Tokyo, Ja- pan
Gesichtsfeld:	Goldmann Perimeter	Haag-Streit, Bern, Switzerland
2 Farbenperimetrie:	Humphrey-Field-Analyzer (HFA, model 640 modified by F. Fitzke)	Institute of Ophthalmology, London, GB
Ganzfeld-ERG:	Nicolet	Madison, WI, USA
Funudsautofluoreszenz:	Heidelberg Retina Angiograph (HRA) I	Heidelberg Engineering, Heidelberg, Germany

OCT:	STRATUS OCT System	Carl Zeiss Meditec Inc., Dublin, USA
Multifokales ERG:	VERIS™ Multifocal System	Electro-Diagnostic Imaging Inc. Redwood City, CA, USA

2.4 Verarbeitung der Patientenproben

2.4.1 Probengewinnung

Die Patienten wurden nach den Vorgaben der „Deklaration von Helsinki“ über die Studie aufgeklärt. Ein genehmigter Ethikantrag der Ethikkommission des Klinikums der Universität Regensburg lag vor. Für die Untersuchungen wurden den Probanden 10 ml peripheres Venenblut entnommen. Die Entnahmeröhrchen enthielten Ethylendiamintetraacetat (EDTA), um die Blutgerinnung zu unterbinden.

Wenn eine Blutentnahme nicht möglich war, so wurde ein Mundschleimhautabstrich vorgenommen. Dazu wurde ein Wattestäbchen mehrmals unter leichtem Druck für einige Sekunden im Mund des Probanden unter Schleimhautkontakt gedreht und in einem sterilen Eppendorfgefäß bis zur DNA-Isolation aufbewahrt.

2.4.2 DNA-Isolation aus Lymphozyten des peripheren Blutes

Lysis Puffer:

155 mM NH_4Cl
10 mM KHCO_3
0,1 mM $\text{EDTA} \cdot 2\text{Na}$
dH₂O
pH = 7.4

SE Puffer:

75 mM NaCl
25 mM $\text{EDTA} \cdot 2\text{Na}$
dH₂O
pH = 8

NaCl 6 M

KCl 0,15 M

SDS 20% w/v

Pronase 10 mg/ml

Pronasepuffer

Tris pH 7,8, 2 ml 1M

EDTA 4 ml 0,5 M

ad 100 ml Aqua bidest.

200 mg Pronase E Merck (Darmstadt), Bestellnummer 1.07433.0001, 1g

10 ml Tris-EDTA-Lösung

1 ml 10% SDS

9 ml Aqua bidest.

Die DNA-Isolierung wurde in Anlehnung an die Methode nach Miller et al. durchgeführt⁴⁷. Diese Methode hat den Vorteil, dass sie ohne gesundheitsschädliche organische Lösungsmittel auskommt und kostengünstig durchführbar ist.

Mehrere 10 ml-Proben Patientenblut wurden zunächst mit 30 ml Lysis-Puffer in einem Falcon vermischt und 30 min auf Eis lysiert. Dabei wurden o. g. Proben alle 5 min gut durchmischt. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation der Lösungen bei 281 g. Der Überstand wurde dekantiert und wieder 10 ml Lysispuffer zugegeben. Nach der Resuspendierung des Pellets erfolgte die oben geschilderte Zentrifugation ein zweites Mal. Der Überstand wurde wieder verworfen. Im Pellet waren nun die kernhaltigen Zellen (Lymphoblastoide, Fibroblasten) konzentriert. Deren Resuspendierung geschah mit 10 ml 0,15 M KCl. Anschließend folgte die erneute Abzentrifugierung. Der Überstand wurde dekantiert und derselbe Schritt nochmals ausgeführt. Dem entstandenen Pellet wurden nun 5 ml SE-Puffer, 25 µl Pronase (Merck (Darmstadt), Pronase E, Bestellnummer 1.07433.0001, 1g) und 250 µl 20% SDS hinzugegeben und auf dem Vortex gemischt. Die Inkubierung des Ansatzes erfolgte über Nacht bei 37°. Dabei wurden die Proteine verdaut, die kernhaltigen Zellen aufgelöst und die DNA freigesetzt.

Am nächsten Tag wurden 1,4 ml 6 M NaCl-Lösung zugegeben und die Mischung auf dem Vortex gemischt. Anschließend erfolgte eine 20 minütige Zentrifugation der Proben bei 5525 g auf der Sigma-Zentrifuge 4K15. Der Überstand mit der DNA wurde, soweit er klar war, in ein neues Falcon überführt. In den Fällen, in denen das nicht der Fall war, erfolgte eine nochmalige Zentrifugation des Überstandes für 20 min bei 5525 g. Der Lösung mit der DNA wurde dann das 2,5 fache des eigenen Volumens an absolutem, eiskaltem Ethanol (EtOH abs.) zugegeben.

Diese Lösung wurde 20 min bei 5525 g abzentrifugiert und bildete so ein Pellet, bestehend aus der DNA, am Boden des Falcons. Der Überstand wurde dekantiert und die DNA 2 bis 3 Stunden an der Luft getrocknet. Danach erfolgte die Lösung der DNA mit 500 µl sterilen TE-Puffern. Dies fand bei Raumtemperatur statt und dauerte einige Stunden. Die DNA-Konzentration der Lösung konnte durch Photometrie (siehe 2.4.3) bestimmt werden.

2.4.3 Photometrie zur quantitativen Bestimmung

Um die DNA-Konzentration einer Lösung zu bestimmen, wurde die Photometrie angewandt. Das Prinzip der photometrischen Messung beruht auf der Ausnutzung der Lichtabsorption gelöster DNA in einem Puffer bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren). Es wird die Lichtabsorption (optische Dichte = OD) bei 260 nm (OD_{260nm}) bestimmt. Eine Messung bei 230 und 280 nm kann zur Beurteilung der Reinheit von Nukleinsäure-Lösungen herangezogen werden. In der Lösung vorhandene Salze und Lösungsmittel haben bei 230 nm ein Absorptionsmaximum, das der Proteine liegt bei 280 nm. Bei Ratio-Werten (Verhältnis OD_{260nm}/OD_{280nm} von +/- 1,8) kann von einer ausreichenden Reinheit der DNA-Probe ausgegangen werden. Die Messung erfolgte in einer Verdünnung im Verhältnis 1:2, wobei 5 µl Probe mit 5 µl 1x TE-Puffer vermischt wurden. Anschließend konnten werden 7 µl in die Messküvette pipettiert und die Absorption gegen TE-Puffer gemessen. DNA-Konzentration konnte direkt vom Photometer berechnet werden. Dabei wurde folgende Gleichung zugrunde gelegt:

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = OD_{260nm} * \text{molarer Extinktionskoeffizient } \mu\text{g/ml} * \text{Verdünnungsfaktor}$$

Der molare Extinktionskoeffizient gibt die DNA-Konzentration der Lösung bei $OD_{260nm}=1$ an.

2.4.4 DNA-Isolation aus Mucosazellen der Mundschleimhaut

NaOH	50 mM
Tris	1 M, pH 7,6

Der Watteträger mit den Zellen wurde in 600 µl 50 mM NaOH eingelegt und 5 min bei 90 °C inkubiert. Nach der Entfernung des Wattekopfes wurden 50 µl 1 M Tris-Lösung dazugegeben und diese 10 min bei maximaler Umdrehung zentrifugiert, der Überstand für die PCR eingesetzt.

2.4.5 Ethanolfällung

Bei einigen Proben ließ sich, aufgrund der niedrigen DNA-Konzentration, keine PCR durchführen. In diesen Fällen musste die Probe aufkonzentriert werden. Dies geschah durch Ausfällung mit absolutem Ethanol und anschließender Resuspendierung.

Der DNA-Lösung wurden zunächst 3M NaAc zugegeben. Das Volumen entsprach etwa einem Zehntel des Probevolumens. Danach wurde das 2 - 2,5-fache des Probevolumens an absolutem EtOH (-20°C) dazugegeben, die Lösung gut gemischt und 20 min bei maximaler Umdrehung zentrifugiert. Die DNA befand sich nun im Pellet und der Überstand konnte dekantiert werden. Um die Salze auszuwaschen, wurde 70 % Ethanol dazugegeben und bei max. Umdrehung 10 min zentrifugiert, der Überstand wiederum dekantiert. Die DNA befand sich im Pellet und wurde anschließend bei Raumtemperatur getrocknet. Nach der Trocknung erfolgte die Lösung der DNA in 1 x TE-Puffer. Dabei wurde das Endvolumen niedriger gewählt, um die Konzentration der Probe zu erhöhen.

2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR war Grundlage für zwei grundlegende Techniken dieser Arbeit: (I.) Die mit der PCR vervielfältigten Genabschnitte wurden in der SSCP untersucht und (II.) gegebenenfalls sequenziert.

dNTP-Mischung

1,25 mM dATP

1,25 mM dCTP

1,25 mM dGTP

1,25 mM dTTP

ad 1 ml 1x TE-Puffer

Die PCR ist eine Methode, um bestimmte DNA-Abschnitte in vitro zu vervielfältigen. Dabei legen zwei flankierende Oligonukleotide, sog. Primer, fest, welche Basensequenz des Vorbildstranges (Template) „kopiert“ werden soll. Diese Primer sind komplementär zu den Sequenzabschnitten, die zu Beginn und am Ende des zu vervielfältigenden DNA-Abschnittes liegen.

Damit die Primer binden konnten, musste zunächst die DNA denaturiert werden. Dies geschah bei 94 °C. Dann wurde die Temperatur auf einen primerspezifischen Wert gesenkt, so dass sich die Primer an das Template anlagern (Annealing) konnten. Welche Temperatur genau gewählt werden musste, hing von der Sequenz der Primer ab und konnte unter Zuhilfenahme einer Gradienten-PCR bestimmt werden.

Die Primer bildeten mit dem Template einen kurzen doppelsträngigen Abschnitt, an dem die DNA-Polymerase angreifen konnte. Sie begann am freien 3'-OH-Ende der Primer mit der Elongation, dem Kopieren des Templates. Dies fand bei einer Temperatur von 72° C statt, dem Temperaturoptimum der eingesetzten Taq-Polymerase. Die entstandene Doppelstrang-DNA wurde wieder denaturiert und der Zyklus konnte von neuem beginnen. Nun lagen vier Templates vor, an denen sich die Primer anlagern konnten und eine Elongation stattfand. Durch zyklische Wiederholungen dieser Arbeitsschritte wurde so die Anzahl der kopierten DNA-Abschnitte exponentiell (2^n) erhöht. Voraussetzung war eine thermostabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase), die durch das Denaturieren bei 94° nicht zerstört wurde ⁴¹.

Die der jeweiligen Taq-Polymerase zugehörigen Reaktionspuffer wurden von den Herstellern geliefert. Die Primer wurden, nach unseren Vorgaben, von der Firma Metabion (Planegg, Martinsried) hergestellt und mittels sterilem Aqua bidest. auf eine Konzentration von 10 pmol/μl eingestellt.

Als DNA-Vorlage (Template) diente genomische DNA aus Kapitel 2.4.2, die auf eine Konzentration von 20 ng/μl mit Aqua bidest. eingestellt wurde.

Ein PCR-Ansatz wurde wie folgt pipetiert:

Template (20ng/μl)	5 μl
Reaktionsmix	
Taq-Polymerase (Promega, 5U/μl)	0,1 μl
Reaktionspuffer	7,0 μl
Je Primer (10pmol/μl)	1,0 μl
MgCl ₂	2/1 μl
dNTP	4,0 μl
<u>Aqua bidest.</u>	<u>7,0 μl</u>
	26,0 μl

Der PCR-Ansatz wurde zusammen mit dem Reaktionsmix in einem 0,5 μl Reaktionsgefäß vermischt und nach Zugabe von 0,5 μl Go Taq-Polymerase (5U/μl) kurz zum Reaktionsstart in das PCR-Gerät gestellt. Die primerabhängigen Amplifikationsbedingungen sind in den nachfolgenden Tabellen aufgeführt. Nach Start der Reaktion mit einer Denaturierung der DNA für 5 Minuten bei 94°C erfolgte das Hybridisieren der strangspezifischen Primer bei einer Temperatur zwischen 50°C und 65°C. Für jedes Primerpaar wurden die letztgenannten Temperaturwerte für 30 oder 60 Sekunden optimiert. Die Elongation erfolgte entsprechend der Annealingzeit für 30 oder 60 Sekunden bei 72°C. Anschließend konnte der Zyklus mit einer Denaturierung bei 94°C abgeschlossen werden. Dieser Reaktionszyklus (Annealing-Elongation-Denaturierung) wurde 35-

mal wiederholt und mit einer Elongation für 10 Minuten beendet. Nach Beendigung der Reaktionszyklen wurden 6 µl des Ansatzes mit 4 µl Gel-juice vermischt und auf einem Agarosegel (s. 2.6.1 und 2.6.2) gegen einen Molekulargewichtsmarker aufgetrennt.

2.5.1 Auflistung der Primer für das Gen *RDH12*

Primernamen:	Sequenz:	Produkt [bp]:	Fragment:	Designer:
RD12-1a	CAGGACGGAGAGGAGCAGAGAA	273	RDH12 Gene Exon 1 sense	Diese Arbeit mit Vector NTI 10.0
RD12-1b	TTCTTTCAGCAGCTGAGAACCG	273	RDH12 Gene Exon 1 antisense	
RD12-2a	CTTAGTGTGAGCTCGTGAAGGATGG	225	RDH12 Gene Exon 2 sense	
RD12-2b	AAGAAGGGTGGGAGGCATGG	225	RDH12 Gene Exon 2 antisense	
RD12-3a	CCTTTATAGCCTAGGATATGAACATA CTGC	253	RDH12 Gene Exon 3 sense	
RD12-3b	CCATACCCAATTTCTGCTTTTCTAC	253	RDH12 Gene Exon 3 antisense	
RD12-4a	GCAGCTAGGGGACTCCTTGCTA	254	RDH12 Gene Exon 4 sense	
RD12-4b	AAGGCCCTGGACATTCTCC	254	RDH12 Gene Exon 4 antisense	
RD12-5a	ACATGCTGAGCCTGGGCTGT	325	RDH12 Gene Exon 5 sense	
RD12-5b	GGACCTCTAATTTGGTCTGAGGACC	325	RDH12 Gene Exon 5 antisense	
RD12-6a	TGTCCCTGATCTAATTGTGCC	338	RDH12 Gene Exon 6 sense	
RD12-6b	AAACCTGGATTGCATCATCAGG	338	RDH12 Gene Exon 6 antisense	
RD12-6c	GTGTATTTTGCTGCAGGAGATAAGC	357	RDH12, Exon 6, sense	
RD12-6d	ACTCAGCTTCTCAGGATGAACAGC	357	RDH12, Exon 6, antisense	
RD12-7a	TCCAGACTGCTAATTCTCATTCTG	201	RDH12 Gene Exon 7 sense	
RD12-7b	TTATGGCATGGATTGGGCCT	201	RDH12 Gene Exon 7 antisense	

2.5.2 Auflistung der Primer für das Gen *RDH5*

Primernamen:	Sequenz:	Produkt [bp]:	Fragment:	Designer:
RD5-2/2c	GCTCTGGGGATCAGTGATATCCAA	258	RDH5, Exon 2, 3' part sense	Diese Arbeit mit Vector NTI 10.0
RD5-2/2d	CTGCCTCTTCTGCTGGGTGCCTTA	258	RDH5, Exon 2, 3' part, antisense	
RD3/1a	CCCCAGCATCCTTTTCATCT	250	RDH5, exon 3, 5' part, sense	(58)

RD3/1b	GACGCTGGTGATGTTGATCA	250	RDH5, exon 2, 5' part, antisense	
RD5-3/2f	GTTTGTTGAGTGGGCTGCTGTT	232	RDH5, Exon 3, 3' part antisense	Diese Arbeit mit Vector
RD5-3/2e	GGGTGCTGAATGTGAACACAATG	232	RDH5, Exon 3, 3' part sense	NTI 10.0
RD4a	AAGAACCCAGCAACTTCGCT	277	RDH5, exon 4, sense	(58)
RD4b	TTCCCTTCATGTGCCCT	277	RDH5, exon 4, antisense	(58)
RD5-5c	GGAAGGGAAACTGATTGCAACC	322	RDH5, exon 5, sense	Diese Arbeit mit Vector
RD5-5d	GGGCAGAAATAAATCAAAGTCCTTG	322	RDH5, exon 5, antisense	NTI 10.0

2.6 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren und deren Nachweis

Diese Methode wurde zur Überprüfung der PCR-Produkte und zur Mutationsanalyse verwendet. Bei der Elektrophorese werden Moleküle innerhalb einer festen Matrix entlang eines elektrischen Feldes, nach der Größe der Moleküle, aufgetrennt. Handelt es sich bei den Molekülen um Nukleinsäuren, wie bei den hier durchgeführten Untersuchungen, sind Agarose und Polyacrylamid als Matrix geeignet.

Wegen der Phosphatmoleküle im Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA sind die Nukleinsäuren innerhalb eines großen pH-Bereiches negativ geladen. Sie wandern deshalb in Richtung der Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit richtet sich dabei allein nach der Molekülgröße. Je mehr Basenpaare ein Nukleinsäureabschnitt hat, desto kleiner die Wanderungsgeschwindigkeit. Dies führt man auf zwei Erklärungsmuster zurück.

1. Der Ogston-Sieffekt beruht auf der Annahme, dass die DNA-Moleküle in wässriger Lösung eine kugelförmige Struktur annehmen. Diese Struktur stößt bei der Wanderung durch das Trägermaterial immer wieder an die Gelmatrix und wird dabei abgebremst. Je größer das Molekül, desto größer auch das Volumen der Kugel und desto stärker wird das Molekül bei seiner Wanderung abgebremst.
2. Die Reptationstheorie besagt, dass die Moleküle auch ihre kugelförmige Struktur aufgeben können und sich so durch die Gelmatrix „schlängeln“. Je größer die Nukleinsäureabschnitte, desto länger brauchen sie, um durch die Poren zu kommen ⁴⁰.

2.6.1 Agarose-Gelelektrophorese

Agarose-Gel:

2% w/v Agarose

1 x TBE

Gel-Ladepuffer:

40% w/v Sucrose

0,05% Bromphenolblau

0,05% Xylene Cyanol

in 1 x TBE

In dieser Arbeit wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet, um das Ergebnis der PCR zu überprüfen und um die Templates für die Sequenzierung vorzubereiten. Die Agarose, bestehend aus glykosidisch verbundener D-Galaktose und 3,6-Anhydrogalaktose, dient als Matrix für die größenabhängige Auftrennung der DNA-Moleküle. Sie wandern, aufgrund der negativen Ladung der Phosphatgruppen im Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat, im elektrischen Feld zur Anode. Die Wanderungsdistanz von doppelsträngigen, linearen DNA-Fragmenten ist indirekt proportional zu deren Länge. Zusammen mit einem Marker kann man so die Länge der PCR-Produkte überprüfen und damit das Ergebnis der PCR.

Als Gel- und Laufpuffer wurde 1 x TBE verwendet. Die Agarosegele enthielten im Regelfall 2% Agarose und eine Pipettenspitze Ethidiumbromid. Die Produkte der IrPCR liefen in einem Gel mit 1% Agarose. Nach dem Gießen wurden die Gele in den Elektrophoresekammern mit Laufpuffer überschichtet (submerged), dann jeweils 5 µl Probe einpipetiert. Der Reaktionspuffer der Go-Taq beinhaltet bereits ausreichende Mengen Glycerin als Ladepuffer. Bei der IrPCR musste Gelladepuffer zusätzlich hinzu gegeben werden. Die Mischung bestand aus 3 µl PCR-Produkt und 2 µl Ladepuffer.

Anschließend konnten die Proben, bei 90 V für 90 min (mittlere Kammer, Horizon 58) oder bei 120 V für 90 min (große Kammer, Horizon 20,25), aufgetrennt werden. Die Trennstrecken betragen - sowohl bei der mittleren als auch bei der größeren Kammer - in etwa 7 cm.

Die Länge der PCR-Produkte wurde durch Vergleich mit dem 100 bp-Marker (DNA Ladder Mix – Gene Ruler, von Fermentas) ermittelt.

2.6.2 DNA-Färbung in Agarosegelen mit Ethidiumbromid

Ethidiumbromid-Stammlösung

1% w/v Ethidiumbromid in Aqua bidest.

Ethidiumbromid ist ein heterozyklischer Stoff, der bei 302 nm Anregungswellenlänge Eigenfluoreszenz zeigt. Interkaliert Ethidiumbromid mit doppelsträngiger DNA, wird diese Eigenfluoreszenz verstärkt. Dabei werden einzelsträngige Nukleinsäuren nur sehr schlecht durch Ethidiumbromid dargestellt, da nur gepaarte Bereiche dieser Moleküle eine Fluoreszenzverstärkung bewirken. Die Stärke der Fluoreszenzverstärkung ist abhängig von der Molekülgröße - sehr kleine Moleküle können entsprechend schlechter dargestellt werden⁷².

Dies kann zum Nachweis von DNA in Agarosegelen genutzt werden, indem diese mit 2 µl Ethidiumbromid-Stammlösung in Aqua bidest. versetzt werden. Nach der Elektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht photographiert.

2.6.3 Single-Strand-Conformation-Polymorphismus-Analyse (SSCP)

SSCP-Puffer:

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

Polyacrylamidgel:

Die Lösungen für das Polyacrylamidgel enthielten 8% bzw. 10% Polyacrylamid aus einer 40%-igen Stammlösung (19:1 Acrylamid/Bisacrylamid) (Roth, Karlsruhe). Dieser wurden optional 10% bzw. 5% Glycerin zugegeben und in 0,5 x TBE angesetzt. 15 ml dieser Lösung wurden zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit 0,1% TEMED und 1% APS zum Auspolymerisieren gebracht.

Denaturierte DNA hat die Tendenz, eine doppelsträngige Form einzunehmen. Bei ursprünglich doppelsträngigen PCR-Produkten ist zu erwarten, dass die DNA-Einzelstränge mit ihren komplementären Partnersträngen reassoziieren. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Assoziation komplementärer Bereiche desselben DNA-Stranges (Self-Annealing). Beide Stränge der Doppelhelix nehmen dabei eine identische, partiell doppelsträngige Reassoziationsform (Konformation) des einzelsträngigen Moleküls an, die durch Zahl, Länge und Lage der doppelsträngigen Bereiche definiert ist. Dadurch nimmt das Molekül ein konformationsabhängiges Volumen ein, das durch seinen Stokes'schen Radius und eine äußere Ladung definiert ist. Die Zahl der stabilen Konformationen eines PCR-Produktes ist abhängig von der Basensequenz und den denaturierenden Bedingungen der Gelelektrophorese. Jede Konformation führt nach der Polyacrylamidgelelektrophorese zu einer eigenen Bande und definiert ein vom PCR-Produkt und den

Elektrophoresebedingungen abhängiges Bandenmuster. Da primär die Basensequenz die Konformation definiert, kann bereits eine einfache Punktmutation ausreichend für eine Konformationsänderung sein. Diese kann die Parameter, die die elektrophoretische Auftrennung beeinflussen (Stokes'scher Radius und Molekülladung), verändern. Damit kann bereits durch eine Punktmutation eine Änderung im elektrophoretischen Verhalten eintreten. Sie äußert sich in der Verschiebung einer oder aller Banden oder dem Verlust oder Zugewinn einer Bande. Damit wird das PCR-produktspezifische Bandenmuster verändert.

Obwohl die SSCP einfach und empfindlich genug ist, so hat sie durchaus Nachteile. Das Bandenmuster hängt stark von den Versuchsbedingungen ab, die für jedes Exon durch mehrere Versuche bestimmt wurden. Zudem ist die Nachweissicherheit einer Mutation abhängig von der Position und Art der Mutation, sowie der Größe des Amplimers^{27,64}. Sie eignet sich nicht optimal für Fragmente über 200 bp und zeigt weder Art noch Position einer nachgewiesenen Mutation an. Bei sehr großen Molekülen werden zu viele Konformationen gebildet, die identisch stabil oder instabil sind. Die Banden werden deshalb unscharf. Zudem steigt mit zunehmender Größe auch die Ladung des Moleküls an. Ab einer bestimmten Größe ist aber die Differenz zwischen nach außen präsentierter Ladung und der wirklichen Ladung innerhalb des Moleküls nicht mehr so groß, dass eine exakte Auftrennung möglich ist.

Aus einem PCR-Ansatz wurden 2,5 µl, zusammen mit 6 µl SSCP-Puffer, in ein Gefäß pipetiert. Diese Proben wurden, nach gutem Durchmischen, auf einem Thermoblock bei 94 °C für 10 min denaturiert, anschließend die Proben schnell auf Eis heruntergekühlt und in die Taschen des Polyacrylamidgeles pipetiert.

Die Elektrophorese lief in der Regel zwischen 840 und 990 Minuten bei 120V bis 200V ab. Die Bedingungen dieses Ablaufes hingen von den PCR-Produkten ab.

PCR-Produkte mit einer Größe von weniger als 230 Basenpaaren liefen auf 10%igen Polyacrylamidgelen (PAA). Fragmente mit einer Größe zwischen 230 und 250 Basenpaaren konnten sowohl auf 10%igen als auch auf 8%igen Gelen aufgetragen werden. Waren die Produkte größer als 250 bp, wurde immer 8%iges PAA als Medium verwendet.

Da das Reassoziationsverhalten der Einzelstränge – und somit die Ausbildung stabiler Konformation – von der Geltemperatur abhängig ist, wurde diese standardmäßig auf 10 °C reduziert. Nach der elektrophoretischen Auftrennung konnten die Gele einer Silberfärbung unterzogen werden.

2.6.4 Bedingung der SSCP-Analyse

2.6.4.1 Bedingungen der SSCP-Analyse für das RDH12-Gen

Exon	Themperatur	Spannung	Dauer	Gelkonzentration
1	10 °C	120 V	16 h	8% PAA, 5% / 10% Glycerin, 0,5 TBE
2	10 °C	120 V	15 h	10% PAA, 5% / 10% Glycerin, 0,5 TBE
3	10 °C	120 V	15 h	8% PAA, 5% / 10% Glycerin, 0,5 TBE
4	10 °C	120 V	14 h	8% PAA, 5% / 10% Glycerin, 0,5 TBE
5	10 °C	120 V	14 h	8% PAA, 5% / 10% Glycerin, 0,5 TBE
6	10 °C	120 V	15 h	8% PAA, 5% / 10% Glycerin, 0,5 TBE
7	10 °C	120 V	14 h	10% PAA, 5% / 10% Glycerin, 0,5 TBE

/ = „sowohl als auch“

2.6.4.2 Bedingungen der SSCP-Analyse für das RDH5-Gen

Exon	Themperatur	Spannung	Dauer	Gelkonzentration
22c/d	10 °C	120 V	15 h	8% PAA, 5% / 10% Glycerin, 0,5 TBE
31	10 °C	120V	15 h	10% PAA, 5% / 10% Glycerin, 0,5 TBE
32e/f	10 °C	200V	16 h	10% PAA, 0,5 TBE
32e/f	10 °C	120V	15 h	10% PAA, 5% Glycerin, 0,5 TBE
4	10 °C	120 V	15 h	10% PAA, 5% / 10% Glycerin, 0,5 TBE
52c/d	10 °C	120 V	15 h	8% PAA, 5% / 10% Glycerin, 0,5 TBE

/ = „sowohl als auch“

2.6.5 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Fixierer:	10% Ethanol (vergällt)
Oxidierer:	1% HNO ₃
Silberlösung:	0,012 M AgNO ₃
Entwickler:	0,28 M Na ₂ CO ₃ 0,5% w/v Paraformaldehyd
Stopplösung:	5% v/v Essigsäure

Auf Polyacrylamidgelen aufgetrennte DNA konnte mittels der schnellen Silberfärbung nach Budowle et al. ⁶ nachgewiesen werden. Die Silberfärbung ist ein sehr sensitiver Nachweis für

Proteine und Nukleinsäuren. Im Gegensatz zur Ethidiumbromidfärbung werden durch die Silberfärbung auch einzelsträngige Nukleinsäuren, wie sie in der SSCP (s. 2.6.3) entstehen, gefärbt. Alle Schritte wurden unter gleichmäßigem Schütteln bei Raumtemperatur durchgeführt, die Gele nach der Elektrophorese in 10% Ethanol (vergällt) überführt und 10 min fixiert. Nach Austausch des Ethanols gegen 1% HNO₃ wurden die Gele 3 min oxidiert und nach 20-minütiger Inkubation in der Silberlösung 1 min in Ionenaustauscherwasser gewaschen. Der Entwickler reduzierte das an die DNA gebundene Silber. Bei ausreichender Kontrastierung erfolgte die Abstopfung der Reaktion mit 5%iger Essigsäure. Je nach Intensität verblieben die Gele 15 min bis mehrere Stunden in der Lösung. Danach konnten sie mit Ionenaustauscherwasser gewaschen und zwischen Cellophan-Folie für die Dokumentation getrocknet werden.

2.7 Sequenzierungen und weitere Analyseverfahren

PCR-Produkte, die in der SSCP-Analyse ein abweichendes Bandenmuster zeigten, wurden sequenziert. Diese Sequenzierung erfolgte durch die Firma Seqlab (Göttingen) nach der Chain-Termination-Methode von Sanger, mit dem BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit von Applied Biosystems (Darmstadt), durchgeführt.

2.7.1 Template-Präparation

Die PCR-Produkte, die in SSCP-Analyse ein abweichendes Bandenmuster gezeigt haben, wurden als Templates für die Sequenzierung eingesetzt. Zunächst erfolgte die Aufreinigung in einem 2%-igen Agarosegel. Anschließend wurden die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und aus dem Gel ausgeschnitten, die PCR-Produkte dann mit dem Promega PCR-CleanUp-System oder dem Macherey-Nagel (Düren), NucleoSpin Extract II aufgereinigt, in 25 µl nuklease-freiem Wasser gelöst und als Template eingesetzt.

2.7.2 Sequenzierreaktion

Dieses Template wurde an die Firma SEQLAB (Göttingen) geschickt, die den eigentlichen Sequenziervorgang, nach der Chain-Termination Methode von Sanger, ausführte.

Die oben genannte Methode beruht grundsätzlich auf der PCR. Allerdings wird hier nur ein Primer verwendet (nur lineare Vermehrung der Produkte). Als Nukleotide werden den normalen 2'-Desoxynukleotiden, in einer bestimmten Konzentration, 2',3'-Didesoxynukleotide beigefügt, die zum Abbruch der Polymerisierung führen. Die Didesoxynukleotide werden farblich fluoreszent markiert und können so vom Sequencer detektiert werden. Bei jedem „PCR-Schritt“ bindet sich

der Primer an die DNA, die Taqpolymerase kann den Tochterstrang so lange verlängern, bis ein Didesoxynukleotid eingebaut wird. In diesem Fall kommt es zum Abbruch der Polymerisierung. Abhängig davon, an welcher Stelle diese Nukleotide eingebaut werden, erhält man so unterschiedlich lange Produkte. Diese werden, der Länge nach, auf einem Elektropherogramm dargestellt. Abhängig davon, welches Didesoxynukleotid am Ende des synthetisierten Stranges ist, gibt es eine nukleotidabhängige Fluoreszenzmarkierung. Anhand dieser kann das terminale Nukleotid des betreffenden DNA-Stückes bestimmt werden. Dieses entspricht, je nach seiner Position auf dem Elektropherogramm, einem Nukleotid auf dem zu sequenzierenden Strang.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchte Patienten und deren Verwandte

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 129 Patienten nach Mutationen im *RDH12*-Gen untersucht. Bei fünf Personen konnten wir eine homozygote oder compound heterozygote Mutation in diesem Gen feststellen. Das *RDH5*-Gen wurde bei 15 Patienten nach Mutationen untersucht. Drei Patienten waren homozygot oder compound heterozygot für eine solche. Des Weiteren wird hier das Ergebnis einer Untersuchung des *LRAT*-Genes dargestellt. Diese wurde im Molekulargenetischen Labor der Abteilung für Kinderophthalmologie, Strabismologie und Ophthalmogenetik des Klinikums der Universität Regensburg bei 258 Personen durchgeführt und identifizierte eine compound heterozygote Mutation⁶⁰. Zu Vergleichszwecken wurden diese Daten mit in die Arbeit aufgenommen.

3.2 Ergebnisse im *RDH12*-Gen

3.2.1 Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchung

Aminosäureänderung	Nukleotidänderung	Exon	RFLP	Referenz
	IVS1+182G>A			diese Arbeit
	IVS1-80delTTTTTT			diese Arbeit
p.T155I	c.464C>T	5		66
p.S175P	c.523T>C	5		58
p.S203R	c.609C>A	5		diese Arbeit
p.Y226C	c.677A>G	6		26
p.A269fs1X	c.806delCCCTG	6		26

Die genomische Untersuchung von Patientin **78.1** ergab eine heterozygote Punktmutation (IVS1+182G>A) im Intron 1. An Position 182 befindet sich ein Adenin an Stelle eines Guanins. Dies führt nach Berechnungen der „The Splice Sequences Finder“-Software mit einer Wahrscheinlichkeit von 56,9% zu einer neuen Spliceseite und damit zu einer Verschiebung des Leserasters. Anstatt des Exons 2 werden nun 11 andere Aminosäuren eingebaut und dann ein

Stoppcodon. Es entsteht ein malformiertes Protein, das, aufgrund des „nonsense-mediated decay“ (NMD) Mechanismus, abgebaut wird.

Im Intron 1 konnten wir noch die heterozygote Deletion IVS1-80del5bp nachweisen. Diese führt, nach Berechnungen der „The Splice Sequences Finder“-Software, ebenfalls zu einer neuen Spliceseite und einer Leserasterverschiebung. Jedoch ist diese Aussage kritisch zu hinterfragen, da bei dieser Sequenzvariation (IVS1-80del5p) die Splicesites nicht direkt betroffen sind und eine Vorhersage über die Auswirkungen schwierig zu treffen ist.

Sollten diese Berechnungen des „The Splice Sequences Finder“ zutreffen, wäre das von diesem Allel kodierte RDH12-Protein ebenfalls malformiert. Damit läge bei Patient 78.1 kein funktionsfähiges RDH12-Protein vor.

Der gleiche Befund konnte bei dessen Bruder (Patient **209.2**) festgestellt werden.

Patientin **107.1** weist eine homozygote Mutation – p.S203R (c.609C>A) - im Exon 5 auf. Dies hat zur Folge, dass Codon 203 statt für Serin, wie im Wildtyp, nun für Arginin kodiert. Arginin hat, im Vergleich zu Serin, eine viel größere Masse, ist stark basisch, und positiv geladen. Dies wird mit hoher Wahrscheinlichkeit die Enzymstruktur und damit die Funktion beeinträchtigen. Bestätigt wurde diese Vermutung durch Berechnungen mit der Software „PolyPhen“. Damit können die Auswirkungen des Nukleotidaustausches auf die Enzymstruktur abgeschätzt werden. „PolyPhen“ ermittelte einen Score von 2,585 und bewertete das mutierte Protein als instabil. Das Programm „SIFT“ (eine ähnliche Software wie „Polyphen“) ermittelte einen Score von 0.00, damit wertete dieses Programm die Mutation ebenfalls als funktionsschädigend.

Im Exon 5 fand sich, neben der gerade erläuterten Sequenzvariation, noch ein Polymorphismus, der ebenfalls homozygot auftrat. Auf Position c.482 der cDNA des *RDH12*-Genes fand ein Austausch von Adenin nach Guanin statt. Damit änderte sich das dritte Nukleotid des Codons 161, so dass ein Arginin anstelle eines Glutamins eingebaut wurde. Perrault et al. bewerten diese Sequenzvariation als Polymorphismus⁵⁸.

Im Rahmen unserer Untersuchungen wurde auch die Schwester (**107.2**) der oben genannten Patientin untersucht. Bei ihr konnten wir die oben beschriebene Sequenzvariation p.S203R (c.609C>A) in heterozygoter Form finden.

Patientin **1181.1** war compound heterozygot. Innerhalb von Exon 5 führte die Punktmutation c.523T>C zur Umkodierung von Codon 175. Anstatt eines Prolins wird nun ein Serin in das Protein eingebaut. Diese Mutation konnte schon von Perrault et al. Beschrieben werden, die mittels Segregationsanalyse auf deren Pathogenität schlossen⁵⁸.

Innerhalb des Exon 6 konnten wir die Mutation p.Y226C (c.677A>G) nachweisen. Janecke et al. zeigten experimentell, dass eine Aktivität des *RDH12* kodierten Enzyms mit der c.677A>G-Mutation praktisch nicht vorhanden war²⁶.

Patient **1358.1** ist compound heterozygot für zwei pathogene Mutationen in *RDH12*. Innerhalb des Exons 5 liegt die Mutation p.T155I (c.464C>T). Thompson et al. untersuchten die *in-vitro*-Aktivität dieses veränderten Proteins und stellten eine stark erniedrigte Fähigkeit fest, all-trans-retinal zu all-trans-retinol zu reduzieren und umgekehrt ⁶⁶.

Diese Sequenzvariation hatten wir ebenfalls bei der Mutter (1358.2) nachgewiesen. Im Exon 5 konnten wir bei der Mutter auf dem zweiten Allel zusätzlich den bereits bei Patientin 107.1 beschriebenen Polymorphismus p.R161Q (c.482G>A) feststellen ⁵⁸.

Im Exon 6 des Patienten fanden wir an Nukleotidposition c.806 eine Deletion von fünf Nucleotiden (CCCTG). Laut Janecke et al. führt diese Deletion zu einem vorzeitigen Stoppkodon an Position 269, wodurch entweder ein „verstümmeltes“ Protein entsteht oder die mRNA zerfällt. In beiden Fällen ist die Enzymaktivität nicht mehr vorhanden ²⁶. Die gleiche Mutation konnten wir beim Vater (1358.3) nachweisen. Damit ist gesichert, dass Patient 1358.1 auf beiden Allelen eine Mutation trägt.

3.2.2 Zusammenfassung der klinischen Untersuchungsergebnisse der oben genannten Patienten

Die einzelnen Ergebnisse der klinischen Untersuchungen der oben genannten Patienten sind im Anhang unter Punkt 8.1 aufgeführt und werden hier in zwei Gruppen zusammengefasst.

Die drei Patienten 107.1, 1181.1 und 1358.1 zeigten einen Nystagmus und berichteten eine Photophobie. Bei 1358.1 und 107.1 lagen auch Dunkeladaptationschwierigkeiten vor.

Die Gesichtsfeldperimetrie wurde bei 107.1 und 1181.1 nicht durchgeführt, da sie nur noch Lichtscheinprojektionen wahrnahmen. Beide Personen waren im Alter von 14 bzw. 15 Jahren hochgradig sehbehindert bzw. blind (Patientin 1181.1). Bei Patient 1358.1 lag bereits im Alter von 7 Jahren eine konzentrische Einschränkung des Gesichtsfeldes auf 5° für III/4 und auf 15° für V/4 vor. Die Entwicklung der Sehschärfe in Abhängigkeit vom Alter wurde in Abbildung 5 dargestellt.

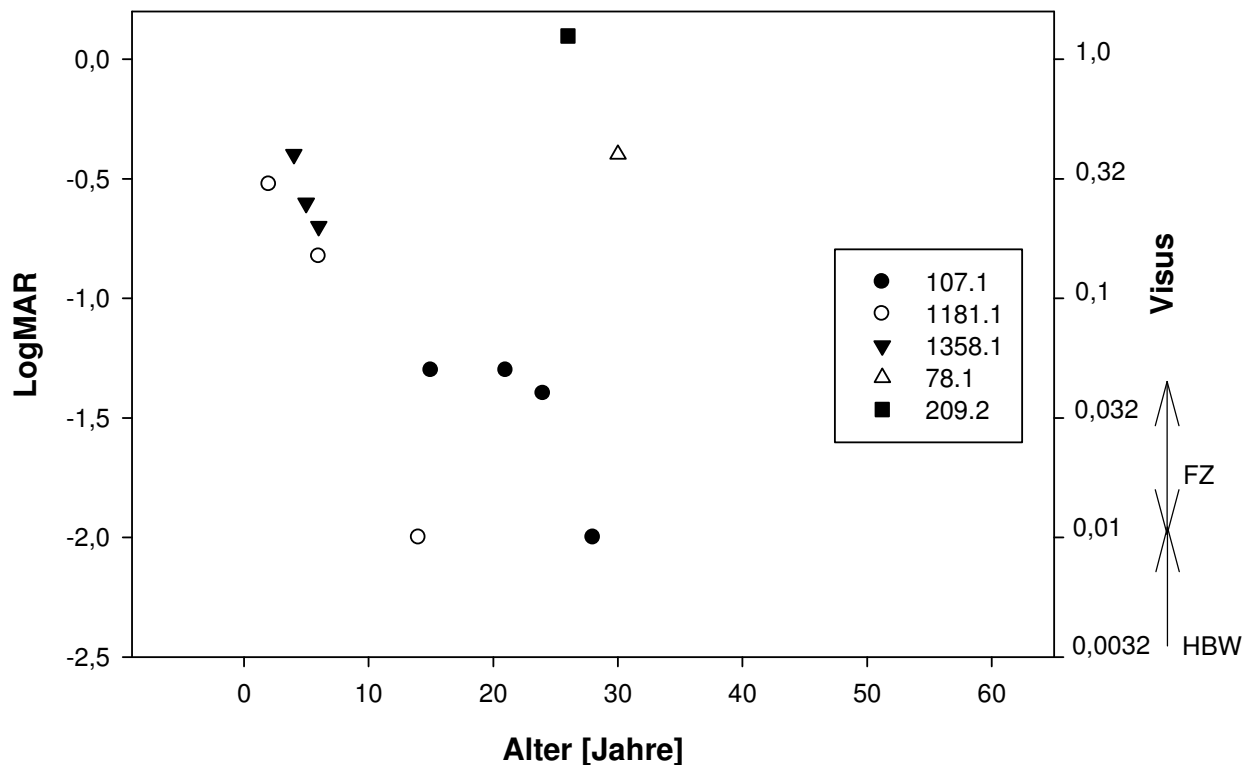


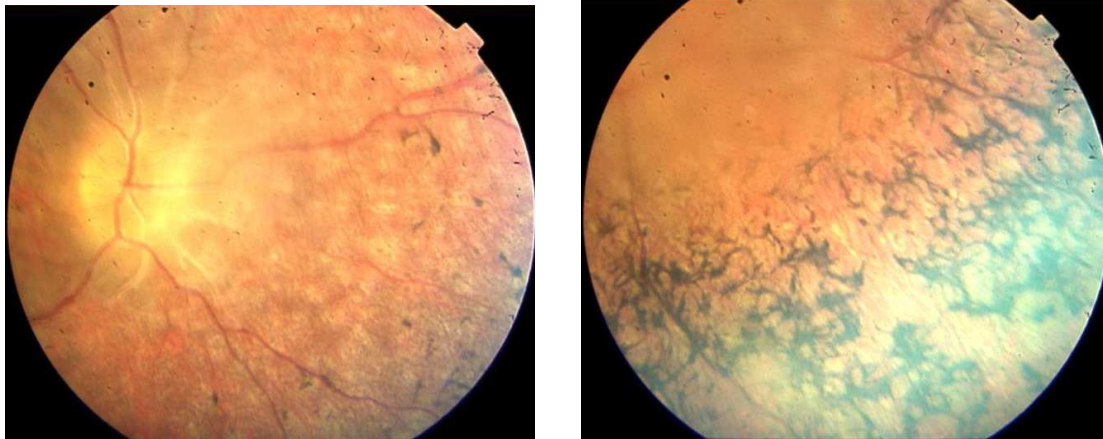
Abbildung 5: Die Entwicklung des Visus bei Patienten mit *RDH12*-Mutationen

(FZ: Fingerzählen, HBW: Handbewegung)

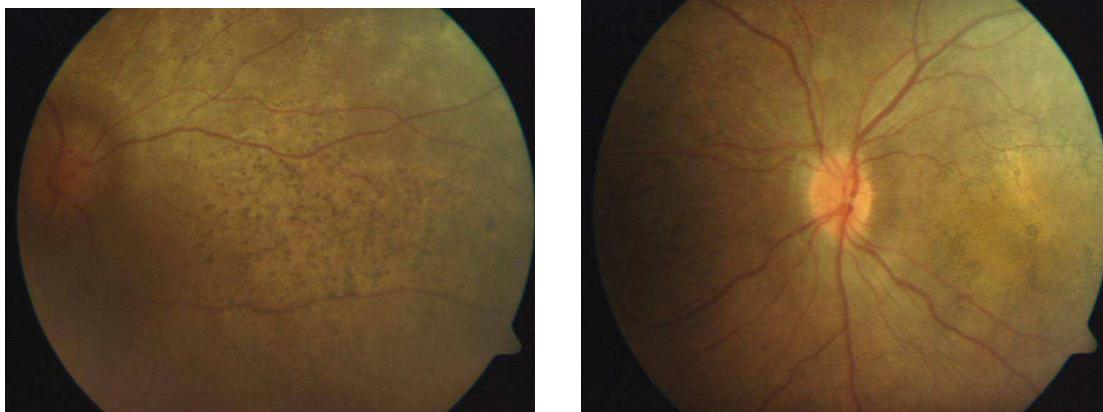
Der Panel D15-Test wurde lediglich bei Patient 1358.1 durchgeführt. Anfangs konnten nur leichte Verwechslungen entlang der Tritanachse festgestellt werden, später, im Alter von sieben Jahren, dann mehrfache Verwechslungen entlang verschiedener Achsen.

Die ERG-Untersuchung zeigte bei Patient 107.1 und 1181.1 keine nennenswerten Aktivitäten mehr. Bei Pat. 1358.1 waren, im Alter von fünf Jahren, die Zapfen- um 85% und die Stäbchenantworten um 67% reduziert. Diese Untersuchung wurde, aufgrund mangelnder Compliance, nur am rechten Auge durchgeführt. Zwei Jahre später war dann die ERG-Antwort sowohl skotopisch als auch photopisch erloschen.

Im Fundus zeigte sich bei allen drei Patienten, dass die Makula von RPE-Veränderungen betroffen war. Es wurden enge Arterien und Pigmentverschiebungen beschrieben. Die Patienten 107.1 und 1181.1 hatten Knochenkörperchen im peripheren Fundus (siehe Abbildung 6). 1358.1 wies keine Knochenkörperchen (siehe Abbildung 7) auf (Alter: 7 Jahre).



**Abbildung 6: Fundus der Patientin 1181.1 (*RDH12*: p.S175P (c.523T>C) und p.Y226C (c.677A>G) im Alter von 23 Jahren.
(Mit freundlicher Genehmigung von Frau Prof. Dr. B. Lorenz.)**



**Abbildung 7: Fundus des Patienten 1358.1 (*RDH12*: p.T155I (c.464C>T) und p.A269fs1X (c.806delCCCTG)) im Alter von 7 Jahren.
(Mit freundlicher Genehmigung von Frau Prof. Dr. B. Lorenz.)**

Des Weiteren ergab die Funduskopie noch einen Fall von chorioretinaler Atrophie, ein Makulakolobom und eine areoläre Makulaatrophie. Die Gefäße waren bei allen drei Patienten attenuiert. Die Autofluoreszenz zeigte bei Patient 1358.1 einen hyperfluoreszenten Ring perimakulär. Eine OCT-Untersuchung wurde bei keinem dieser Patienten durchgeführt, da sie entweder zu jung waren oder die Degeneration ein Ausmaß erreicht hatte, das eine solche Untersuchung unmöglich machte.

Anders stellte sich die Situation bei den Patienten **78.1** und **209.2** dar. Letztgenannter hatte mit 26 Jahren noch keine subjektiven Beschwerden. Die ophthalmologischen Untersuchungen ergaben bei ihm einen Visus von 1,25p und nur leichte makuläre Pigmentepithelverschiebungen am rechten Auge. Lediglich sein photopisches und skotopisches ERG waren beeinträchtigt.

Seine Schwester, Patientin 78.1, die über die gleichen Mutationen verfügte, hatte eine stärkere Merkmalsausprägung. Bei ihr konnten, im Alter von 31 Jahren, ein eingeschränktes Gesichtsfeld und ein Visus von 0,4 bzw. 0,5 festgestellt werden. Das ERG war bei Patientin 78.1 bereits erloschen. Im Fundus zeigten sich Knochenbälkchen (siehe Abbildung 8). Beide Patienten hatten keinen Nystagmus.

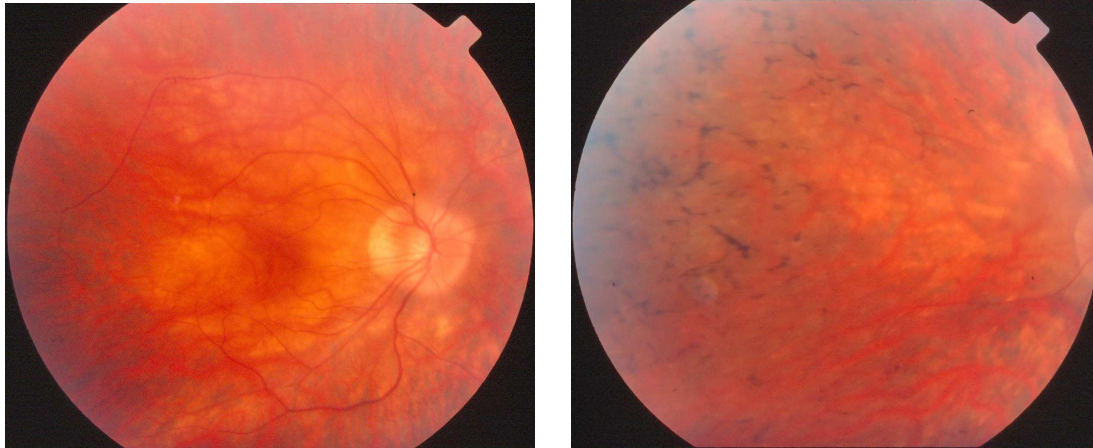


Abbildung 8: Fundus der Patientin 78.1 (*RDH12*: IVS1-80delTTTTTTT und IVS1+182G>A) im Alter von 30 Jahren.

(Mit freundlicher Genehmigung von Frau Prof. Dr. B. Lorenz.)

3.3 Ergebnisse im *LRAT*-Gen

3.3.1 Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchung

Aminosäureänderung	Nukleotidänderung	Exon	RFLP	Referenz
p.R109C	c.325C>T	2		⁶⁰
p.R190H	c.589G>A	3		⁶⁰

Die Untersuchung der 258 Patienten auf Mutationen im *LRAT*-Gen durch Preising et al. identifizierte jedoch nur einen compound heterozygoten Mutationsstatus bei Patient 293.1. Letzgenannter hatte die Mutationen p.R109C (c.325C>T) im Exon 2 und p.R190H (c.589G>A) im Exon 3. Dies wurde bereits im Jahr 2007 veröffentlicht und als pathogen eingestuft. Eine molekulargenetische Untersuchung der Eltern konnte nicht durchgeführt werden ⁶⁰.

3.3.2 Zusammenfassung der klinischen Untersuchungsergebnisse des Patienten mit *LRAT*-Mutationen

Die einzelnen Ergebnisse der klinischen Untersuchungen der oben genannten Patienten sind im Anhang unter Punkt 8.2 aufgeführt.

Patient 293.1 berichtete über Dunkeladaptierungsschwierigkeiten und hatte eine Photophobie. Ein Nystagmus lag nicht vor. Die Außengrenzen der Gesichtsfelder zeigten keine Einschränkungen. Allerdings wies unser Patient rechts und links ein großes Skotom in der oberen Hemisphäre auf und hatte subjektiv den Eindruck einer Gesichtsfeldeinschränkung. Der Visus lag im Alter von 64 Jahren am rechten Auge bei 0,6 und am linken Auge bei 0,4. Ferner war er hyperop. Im ERG zeigten die Zapfen Restantworten, während die Stäbchenantworten moderat erniedrigt waren. Funduskopisch konnten bei Patient 293.1 eine RPE-Atrophie, –verschiebungen und Knochenbälkchen nachgewiesen werden (siehe **Abbildung 9**).

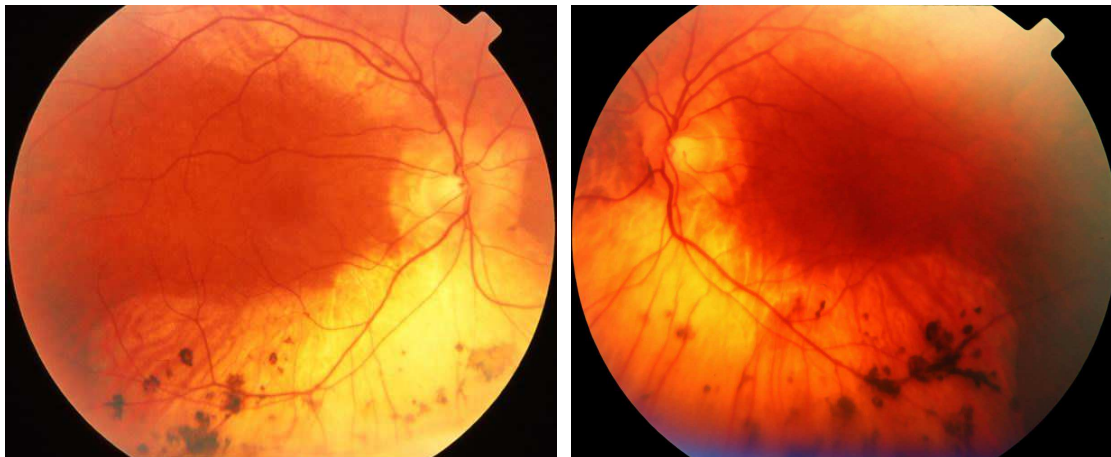


Abbildung 9: Fundus Patient 293.1 (*LRAT*: p.R109C (c.325C>T) und p.R190H (c.589G>A) im Alter von 64 Jahren.
(Mit freundlicher Genehmigung Frau Prof. Dr. B. Lorenz.)

3.4 Ergebnisse im *RDH5*-Gen

3.4.1 Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchung

Aminosäureänderung	Nukleotidänderung	Exon	RFLP	Referenz
p.F32fs29X	c.95delT	2		Diese Arbeit
p.G35S	c.103G>A	2		⁷¹
p.G238W	c.712G>T	4		⁷⁵
p.R209X	c.625C>T	4		Diese Arbeit
p.R280X	c.839G>A	5		²¹

Patient **494.1** ist compound heterozygot für zwei Mutationen im Exon 2 und Exon 4. In Exon 2 ist an der Nukleotidposition 95 ein Thymin deletiert (c.95delT). Aufgrund dieser Deletion kommt es zum Frameshift, 29 Codons später entsteht ein Stoppcodon. Dadurch ändert sich das Aminosäureprodukt in zweifacher Hinsicht. Zum einen ist, durch die Rasterverschiebung, die Primärstruktur des zukünftigen Proteins verändert. Zum anderen kommt es, durch das vorzeitige Stoppcodon, zu einem verkürzten Aminosäureprodukt und wahrscheinlich einem Abbau der mRNA durch das Prinzip des „nonsense mediated decay“ (NMD).

Die zweite Mutation, p.G238W (c.712G>T), befindet sich im Exon 4. Yamamoto et al. verglichen die Aktivität des mutierten Genprodukts mit dem Wildtyp-Enzym. Die Basalaktivität des mutierten Enzyms war um 88-92%, im Vergleich zum Wildtyp, erniedrigt ⁷⁵. Damit kodieren beide Allele für ein fehlerhaftes Genprodukt und es ist kein intaktes Enzym 11-cis-Retinol-Dehydrogenase bei Patient 494.1 vorhanden.

Die Patientin **494.2** ist die Mutter von Patient 494.1. Bei ihr konnte, im Exon 2, die gleiche Mutation wie bei Ihrem Sohn nachgewiesen werden. Der Vater wurde nicht untersucht.

Bei Patientin **1162.1** wurde ein Nukleotidaustausch, Guanodin nach Adenosin, in Exon 2 an Nukleotidposition 103 nachgewiesen. Dadurch ändert sich das erste Nukleotid des Codon 35 und die kleinere, unpolare Aminosäure Glycin wurde durch die größere, polare Aminosäure Serin ersetzt. Laut Wada et al. verändert dies die Bindungsstelle des Kofaktors am Protein 11-cis-Retinol-Dehydrogenase und es ist davon auszugehen, dass diese Mutation pathogen ist ⁷¹. Diese Ansicht wird von der „Swissprot“-Datenbank geteilt, die diese Sequenzvariation als pathogen einstufte.

Die zweite Nonsense-Mutation p.R280X (c.839G>A) liegt im Exon 5 des Patienten. Die Arbeitsgruppe um Gonzalez-Fernandez et. al stufte diese Sequenzvariation als pathogen ein ²¹.

Damit verfügt Patient 1162.1 höchstwahrscheinlich über kein funktionsfähiges RDH5-Enzym.

Eine neue Mutation, p.R209X (c.625C>T), konnte bei Patient **1785.1** auf beiden Allelen des Exon 4 festgestellt werden. Durch diese Veränderung wird Codon 209 zu einem Stoppkodon und es kommt zum Abbruch der Translation. Das entstehende Protein ist mit großer Wahrscheinlichkeit funktionsunfähig. Da diese Mutation homozygot vorliegt, verfügt Patient 1785.1 über kein funktionsfähiges RDH5-Enzym.

3.4.2 Zusammenfassung der klinischen Untersuchungsergebnisse der Patienten mit *RDH5*-Mutationen

Die einzelnen Ergebnisse der klinischen Untersuchungen der oben genannten Patienten sind im Anhang unter Punkt 8.3 aufgeführt und nachfolgend zusammengefasst.

Alle Patienten beklagten eine Dunkeladaptationsstörung, jedoch keine Photophobie.

Die Ergebnisse im Goldmann-Gesichtsfeld zeigten bei Patient 494.1 anfangs eine konzentrische Einschränkung, die bei einer späteren Messung nicht bestätigt werden konnte. Bei Patient 1162.1 wurde diese Untersuchung nicht durchgeführt, Patient 1785.1 hatte ein regelrechtes Gesichtsfeld.

Der Visus (siehe Abbildung 10) unserer Patienten lag durchweg über 0,9, Farbsehstörungen waren bei ihnen nicht nachweisbar.

Patient 494.1 zeigte im ERG eine deutliche Reduktion der Stäbchenantworten, während die Zapfenantworten nur mäßig herabgesetzt waren. Im Vergleich zur Voruntersuchung, die ein Jahr zuvor stattfand, hatten sich beide Werte verschlechtert. Bei Patient 1785.1 war das skotopische ERG im Normbereich. Eine 24-stündige Dunkeladaptation führte noch zu einer Verbesserung der Amplitude um 19%. Das ERG mit der kombinierten Stäbchen-Zapfenantwort war nur leicht erniedrigt, während jenes mit 30-Hz-Flicker eine verringerte Amplitude und eine verzögerte Latenzzeit der Zapfenantwort zeigte. Die Dunkeladaptationsschwellen waren normal. In der Dunkeladaptometrie nach „Goldmann-Weeker“ konnte eine triphasische Zapfen-Adaptationskurve nachgewiesen werden. Das multifokale ERG zeigte für den Patienten 1785.1 subnormale Werte.

Die Fundusautofluoreszenz konnte bei letztgenanntem Patienten nicht nachgewiesen werden. Bei Patient 494.1 war diese erniedrigt.

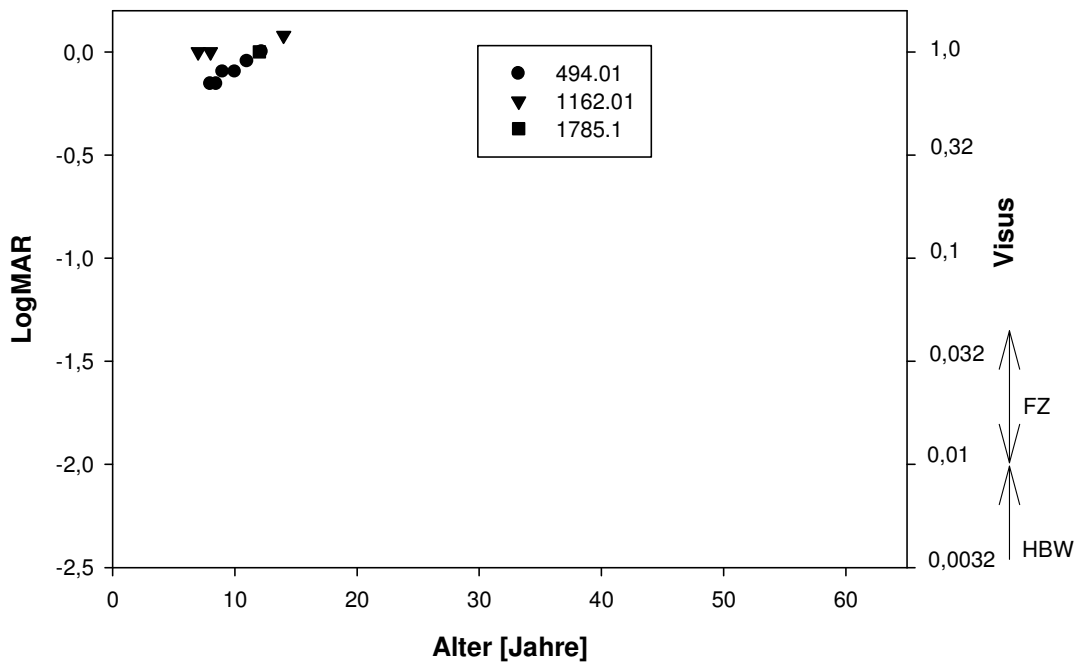
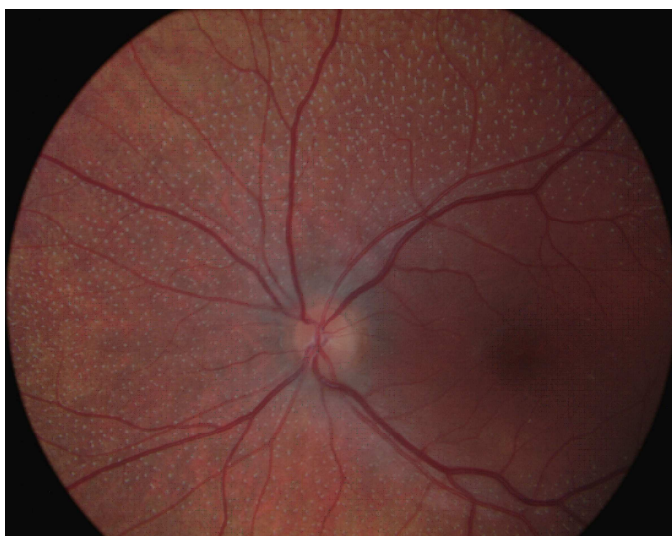


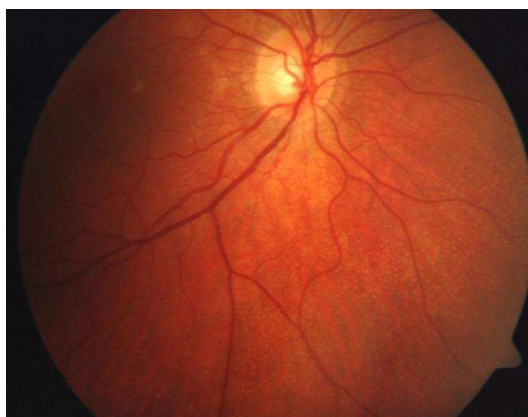
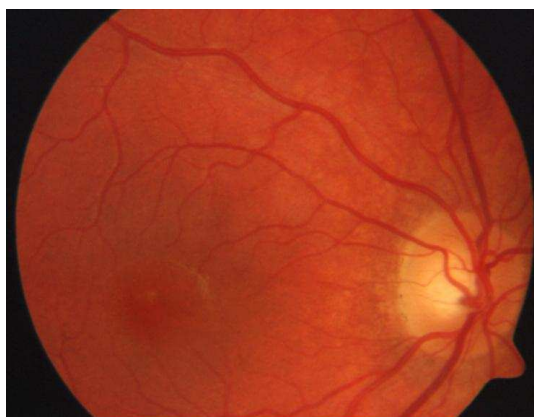
Abbildung 10: Entwicklung des Visus bei Patienten mit Mutationen im *RDH5*-Gen

(FZ: Fingerzählen, HBW: Handbewegungen)

In den Fundi der RDH5-Patienten imponierte das typische Erscheinungsbild eines Fundus albipunctatus (siehe Abbildung 11). Bei Patient 494.1 war der Bereich zwischen den Gefäßarkaden vom Erscheinungsbild des Fundus albipunctatus ausgespart. Makulaveränderungen hatten die Patienten 494.1 (siehe Abbildung 12) und 1162.1. Diese äußerten sich entweder in Pigmentverklumpungen (494.1) oder fehlenden Reflexen (1162.1). Patient 1785.1 zeigte keine solchen Auffälligkeiten.



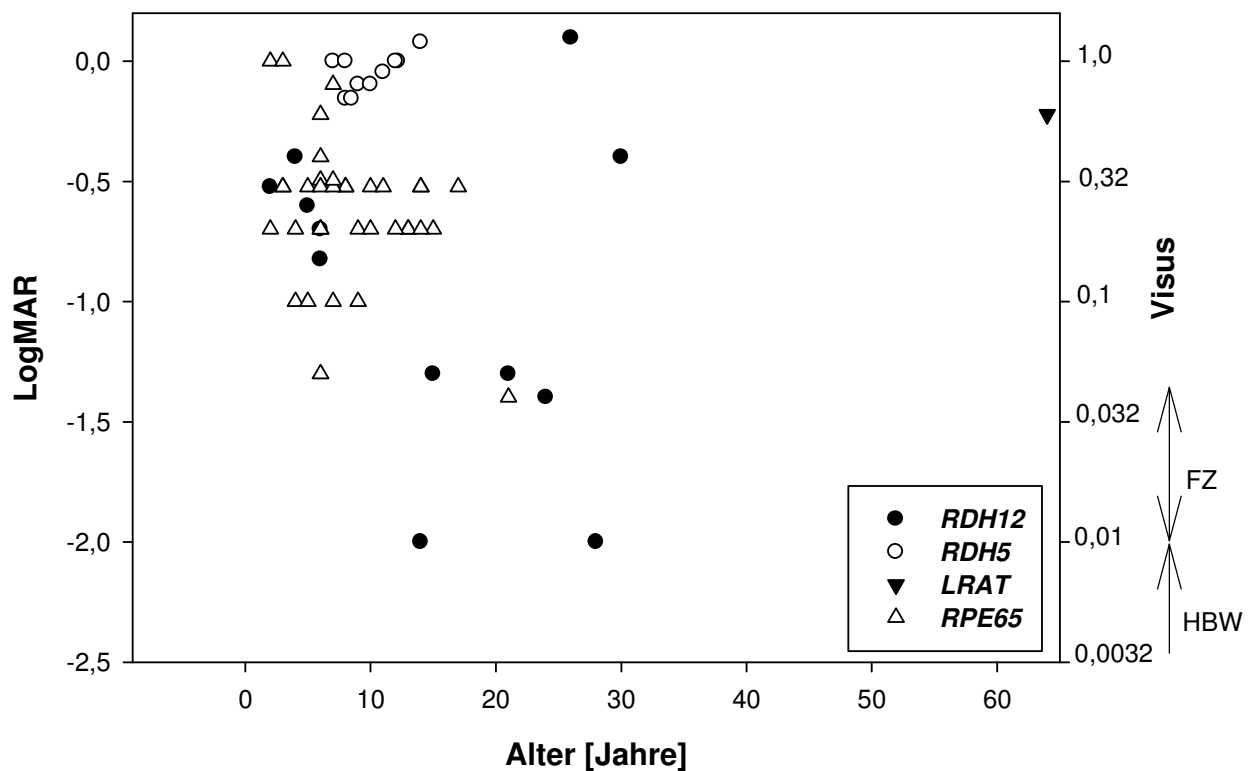
**Abbildung 11: Fundus Patient 1785.1 (RDH 5: p.R209X (c.625C>T) homozygot) im Alter von 28 Jahren
(Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Thomas Rosenberg, National Eye Clinic, Kennededy Center, Glostrup, Dänemark)**



**Abbildung 12: Fundus Patient 494.1 (RDH 5: p.F32fs29X (c.95delT) und p.G238W (c.712G>T)) im Alter von 15 Jahren.
(Mit freundlicher Genehmigung von Frau Prof. Dr. B. Lorenz.)**

3.5 Vergleich der Visuswerte der verschiedenen Patientenkollektive

Anschließend folgt eine Zusammenstellung der Visusentwicklung über die in diesem Kapitel beschriebenen Patienten (siehe Abbildung 13). Zu Vergleichszwecken wurden noch die Visuswerte von Patienten mit funktionellen Nullmutationen im *RPE65*- und dem *LRAT*-Gen hinzugefügt. Letztgenannte Werte oben genannter Patienten wurden bereits durch Preising et al. veröffentlicht⁶⁰.



4 Diskussion

4.1 Auswirkungen der Mutationen im *RDH12*-Gen

4.1.1 Pathologisches Potential der Mutationen im *RDH12*-Gen

Der Pathomechanismus, über den *RDH12*-Mutationen zu retinalen Degenerationen führen, ist noch nicht genau verstanden. Offenbar hat dieses Enzym keinen unmittelbaren Anteil am Sehzyklus, da dieser bei *RDH12*-Knockout-Mäusen nicht signifikant beeinträchtigt war³⁴. Allerdings steigt die Expression des *RDH12*-Proteins nach der Geburt, wenn die Reifung des Sehprozesses stattfindet, stark an. Der zeitliche Beginn der *RDH12*-Expression fällt mit dem Beginn der Elongation der Außensegmente der Stäbchen zusammen²⁸.

Es zeigte sich, dass das Enzym *RDH12* für die Reduktion von besonders hohen Konzentrationen an all-trans-Retinal zuständig ist, die bei oxidativem Stress anfallen. So kommt es bei Mäusen ohne *RDH12*-Gen zu einer beschleunigten Bildung von all-trans-Retinal, und die Photorezeptoren werden anfälliger für lichtinduzierte Apoptose⁴⁴. Offenbar ist dieses freie all-trans-Retinal für die Photorezeptoren toxisch. Maeda et al. konnten nachweisen, dass diese Verbindung dosisabhängig einen Untergang von humanen Zellen verursachen kann. Dabei scheint es zu einer Veränderung der Permeabilität der Plasmamembran und zu einer Beeinträchtigung der Mitochondrien zu kommen. Dies führt wahrscheinlich zu einer Aktivierung der Caspasen und zu einem mitochondrienassoziierten Zelltod. A2E und andere Kondensationsprodukte der Retinoide scheinen bei diesen Prozessen eine untergeordnete Rolle zu spielen^{42,43}.

Ferner deuten die Versuche von Marchette et al. daraufhin, dass das Enzym *RDH12* eine wichtige Rolle bei der Detoxifikation von 4-HNE (4-Hydroxynonenal) spielt. Diese Verbindung ist der bekannteste Vertreter von zytotoxischen Produkten, die bei der Lipidperoxidation entstehen. Marchette et al. konnten zeigen, dass helles Licht dessen Bildung im Bereich von murinen Photorezeptoren induziert und dass *RDH12* eine Rolle beim Schutz humaner Zellen vor deren Toxizität spielt⁴⁶.

Daneben kann das *RDH12*-Protein auch Dihydrotestosteron zu Androstendion reduzieren. In wie weit diese Funktion auch eine Bedeutung für die Pathophysiologie hat, muss noch geklärt werden³¹.

4.1.2 Vergleich des Phänotyps der *RDH12*-Patienten mit der Literatur

Die unter 3.2.2 beschriebenen Phänotypen der *RDH12*-Patienten (107.1, 1181.1, 1358.1) zeigten hinsichtlich der Entwicklung des Gesichtsfeldes, der Farbsehfähigkeit, der ERG-

Konstellation und der Fundusauffälligkeiten ähnliche Konstellationen, wie sie bereits von Schuster et al. (2007) und Thompson et al. (2005) beschrieben wurden^{62,66}.

Bezüglich der Knochenbälkchen war festzustellen, dass diese in jungen Jahren wohl noch nicht vorhanden sind (Pat. 1358.1 mit 7 Jahren) und mit zunehmendem Alter bevorzugt peripher (Pat. 1181.1 mit 12 Jahren und Pat. 107.1 mit 28 Jahren) auftreten. Diese verstärkte Präsenz der Knochenkörperchen in peripheren Fundusbereichen lässt sich durch die Untersuchungen von Fahl et al. erklären. Danach entstehen Knochenkörperchen, wenn (infolge des Verlustes der äußeren Retinaschichten durch retinale Degeneration) Äste der A. centralis retinae mit dem Retinalen Pigmentepithel in Kontakt kommen und dadurch eine RPE-Proliferation induziert wird¹⁶.

Die anderen beiden RDH12-Patienten, 78.1 und 209.2, zeigten, im Vergleich zu den eben erläuterten RDH12-Patienten, eine schwächere Beeinträchtigung des Sehvermögens.

Ein Erklärungsansatz wäre, dass die Sequenzvariationen IVS1+182G>A und IVS1-80del5bp, im Vergleich zu den übrigen *RDH12*-Mutationen, zu einer leichteren Beeinträchtigung Sehvermögens führen. Laut Valverde et al. hängt der Grad dieser Beeinträchtigung von der Art der RDH12-Mutation ab. So veröffentlichte diese Arbeitsgruppe den Phänotyp eines Patienten, der schwächer betroffen war (Visus OU 0,3 mit 21 Jahren)⁷⁰.

Ferner gibt es zwei Publikationen, die über eine heterozygote Trägerschaft beim *RDH12*-Gen berichten, die zu einer Beeinträchtigung des Sehvermögens führen sollen. Fingert et al. und Benayoun et al. zeigten jeweils einen solchen Fall. Die Beeinträchtigung des visuellen Systems falle in diesen Fällen schwächer aus als bei Patienten mit zwei betroffenen Allelen^{3,18}. Dies ist aus diesem Grunde interessant, weil sich die Auswirkungen der Sequenzvariation IVS1-80del5bp sehr schwer voraussagen lassen, wie in Kapitel 3.2 bereits erläutert wurde. Es wäre ein weiterer Erklärungsansatz für das relativ gute Sehvermögen der beiden Patienten.

In beiden Fällen bliebe jedoch noch der unterschiedliche Ausprägungsgrad der Beeinträchtigung zwischen den Geschwistern zu erklären. Obwohl zwischen ihnen nur ein Altersunterschied von 5 Jahren besteht, zeigt Patient 78.1 eine wesentlich stärkere Beeinträchtigung des Sehvermögens als Patient 209.2. Aus diesem Grund liegt der Schluss nahe, dass die Veränderungen im *RDH12*-Gen nicht die alleinigen Ursachen für die phänotypologischen Veränderungen der Patienten 78.1 und 209.2 sind. Dies ist vor dem Hintergrund der Tatsachen zu sehen, dass sich sowohl die Auswirkungen der Sequenzvariation IVS1-80del5bp nur schwer voraussagen lassen - als auch die Sequenzvariation IVS1+182G>A nur mit einer Wahrscheinlichkeit von knapp über 50% zu einer neuen Splicesite führt.

4.2 Auswirkungen der Mutationen im *LRAT*-Gen

4.2.1 Krankheitsauslösendes Potential von Mutationen im *LRAT*-Gen

Bei *LRAT*-Knockout-Mäusen zeigte sich ein Phänotyp, der einer EOSRD ähnlich und schon in jungem Alter sichtbar war². Ein noch vorhandener Visus mag an dem Enzym ARAT liegen, das Restmengen an Retinylester zur Verfügung stellen kann²⁹.

4.2.2 Vergleich des Phänotyps unseres Patienten mit der Literatur

Die niedrige Prävalenz von Mutationen im *LRAT*-Gen wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet, bei denen sie ebenfalls unter 1% lag⁶⁵.

In der Literatur konnten bisher nur vier Fälle von funktionellen Nullmutationen beschrieben werden. Alle diese Personen (2,5 -, 23 -, 25 -, 36 Jahre) waren deutlich jünger als unser Patient. Ebenso wie dieser hatten sie Dunkeladaptationschwierigkeiten, eine Hyperopie, Knochenbälkchen, eine RPE-Atrophie und keinen Nystagmus (bis auf einen Patienten). Im Gegensatz zu der hier vorgestellten Person litten die Patienten aus der Literatur unter keiner Photophobie, ihre Visuseinschränkung fiel jedoch stärker aus, obwohl Patient 293.1 zum Zeitpunkt der Untersuchung bereits 64 Jahre alt war. Des Weiteren zeigten die Patienten aus der Literatur ein erloschenes ERG, während bei 293.1 die Zapfen noch Restantworten vorwiesen und die Stäbchenantworten moderat erniedrigt waren. Eine starke Gesichtsfeldeinschränkung konnte bei Patient 293.1 ebenfalls nicht festgestellt werden. Allerdings hatte er rechts und links ein großes Skotom in der oberen Hemisphäre und beklagte den Eindruck einer Gesichtsfeldeinschränkung. Bei ihm fiel die Beeinträchtigung des visuellen Systems nicht so stark aus, wie bei den von Thompson et al. und Sénéchal et al. publizierten Fällen. Dies kann an den Mutationen von Patient 293.1 liegen, die eventuell eine enzymatische Restaktivität zulassen^{63,67}.

4.3 Auswirkungen der Mutationen im *RDH5*-Gen

4.3.1 Krankheitsauslösendes Potential von Mutationen im *RDH5*-Gen

Der Zusammenhang zwischen *RDH5*-Mutationen und Fundus albipunctatus wurde zuerst von Yamamoto et al. und Gonzalez et al. aufgrund von Segregationsanalysen postuliert^{21,75}. Die milde Ausprägung von funktionellen Nullmutationen beim *RDH5*-Gen kann damit erklärt werden, dass es alternative, jedoch weniger effiziente Wege gibt, auf denen 11-cis Retinal regeneriert werden kann^{10,17}.

4.3.2 Vergleich des Phänotyps der Patienten mit der Literatur

Die unter Punkt 3.4.2 zusammengefassten klinischen Untersuchungsergebnisse bezüglich der Dunkeladaptationsstörung, des guten Visus und des typischen Fundusbildes bei den *RDH5*-Patienten entsprechen dem klassischen Bild eines Fundus albipunctatus ohne Makuladystrophie⁵⁴.

Der skotopische ERG-Befund von 494.1 wird durch die Untersuchungen der Arbeitsgruppen von Nakamura et al. und Iannaccone et al. bestätigt^{25,54}. Gegensätzliche Ergebnisse liefern die elektrophysiologischen Untersuchungen bei Patient 1785.01. Diese zeigten eine Beeinträchtigung des Zapfensystems bei erhaltenen Stäbchenantworten. Offenbar scheinen Nullmutationen im *RDH5*-Gen eher die Zapfen- als die Stäbchenfunktion zu beeinträchtigen. Ein ähnlicher Fall wurde von Cideciyan et al. publiziert¹⁰.

Ob die erniedrigten photopischen ERG-Befunde bei Patient 494.1 und 1785.01 Vorboten einer Makuladystrophie sind, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht geklärt werden, da in Untersuchungen auch Patienten ohne Makulardystrophie Anzeichen einer Zapfendysfunktion hatten⁵⁵. Außerdem wird die Zapfendystrophie bei FA-Patienten in der Regel erst mit fortgeschrittenem Alter gehäuft beobachtet (die hier beschriebenen Patienten waren zum Zeitpunkt der Untersuchungen jünger als 30 Jahre)⁵². Ob funktionelle Nullmutationen, die offenbar vorzugsweise die Zapfen beeinträchtigen, auch notwendigerweise zu deren Degeneration führen, ist eher unwahrscheinlich, da der Patient von Cideciyan et al. zum Zeitpunkt der Untersuchung 57 Jahre alt war und einen Visus von 1,0 hatte¹⁰.

In der Einleitung wurde bereits beschrieben, dass sich beim Fundus albipunctatus die skotopischen ERG-Antworten nach einer mehrstündigen Dunkeladaptationsphase normalisieren. Diese Untersuchung wurde nur bei Patient 1785.01 durchgeführt. Dabei erfuhren die skotopischen ERG-Antworten eine Besserung nach 24-stündiger Dunkeladaptation. Allerdings waren die Ausgangswerte, nach 40minütiger Dunkeladaptation, bereits normal. Deshalb kann im Rahmen dieser Arbeit keine endgültige Aussage über eine eventuelle Beeinträchtigung der Stäbchen gemacht werden. Dies wäre interessant gewesen, da die Arbeitsgruppe um Niwa bei der ERG-Messung nach verlängerter Dunkeladaptation zeigen konnte, dass bei einigen Patienten mit FA auch das Stäbchensystem betroffen war⁵⁵.

Die Fundusautofluoreszenz war entweder stark herabgesetzt (494.1) oder nicht nachweisbar (1785.1).

4.4 Vergleich der Merkmalsausprägungen in den verschiedenen Genen

Hier sollen die in diesem Kapitel beschriebenen Phänotypen der Patienten mit *RDH12*- und *RDH5*-Mutationen untereinander und mit dem Phänotyp der *RPE65*- und *LRAT*-Mutationen verglichen werden. Die hierfür notwendigen Daten der Patienten mit einer *LRAT*- oder *RPE65*-Mutation wurden einer Publikation von Preising et al. entnommen ⁶⁰.

Mutationen auf beiden Allelen des *RDH12*-Gens wurden bei 5 von 129 Patienten, beim *LRAT*-Gen bei 1 von 258 Patienten und beim *RDH5*-Gen bei 3 von 15 Patienten gefunden. Die relative Häufigkeit der *RDH5*-Mutationen ist vermutlich darin begründet, dass man diese Patienten über die Funduskopie relativ gut herausfiltern kann, wohingegen die anderen beiden Patientengruppen (*LRAT*, *RDH5*) über keinen ähnlich guten „Marker“ verfügen. Die niedrige Nachweisquote bei den *LRAT*-Patienten scheint an der Seltenheit dieser Mutationen zu liegen, da andere Arbeitsgruppen über ähnlich niedrige Ergebnisse berichteten ⁶⁵.

Der phänotypologische Vergleich der drei Patientenkollektive (*RDH12*, *RDH5*) mit den *LRAT*- und *RPE65*-Patienten zeigte vor allem Unterschiede im Fundus, ERG und Photophobie. Die *RDH12*-Patienten (bis auf zwei Ausnahmen) und der *LRAT*-Patient wiesen Knochenkörperchen in ihrem Fundus auf. Dies wurde bei *RPE65*-Patienten nur vereinzelt beschrieben und dann immer im fortgeschrittenen Lebensalter, so dass diese Knochenkörperchen eher als Pigmentverklumpungen anzusehen sind. Bei den *RDH5*-Patienten imponierten der typische Fundus albipunctatus und diskrete Makularveränderungen.

Die *RDH12*-Patienten und der *LRAT*-Patient beklagten Photophobie. In den mir verfügbaren diagnostischen Erhebungen fanden sich bei den Patienten 107.1 und 1181.1 keine genauen Angaben über das Alter des Symptombeginns, anders bei Patient 1358: bei ihm erfolgte die Erstdiagnose der Photophobie im Alter von 4 Jahren. Dieses Symptom war bei den *RPE65*- und den *RDH5*-Patienten nicht vorhanden, was durch die reduzierte Lichtempfindlichkeit der Photorezeptoren - aufgrund des Chromophormangels - erklärt werden kann.

Im ERG fielen bei den *RPE65*-Patienten zuerst die skotopischen und dann die photopischen Antworten aus. Bei dem *LRAT*-Patienten war es genau umgekehrt ⁶⁰. Eine Person (494.1) mit *RDH5*-Mutationen hatte erniedrigte skotopische und photopische ERG Antworten. Der andere Patient (1785.01) zeigte normale skotopische Antworten, während die Untersuchung der Zapfen eine Beeinträchtigung aufwies. Hinsichtlich der *RDH12*-Patienten lässt sich nur sagen, dass die

ERG-Potentiale zum Zeitpunkt der Messung schon erloschen oder von begrenzter Aussagekraft (1358.1) waren. Mit dem Alter von 6 Jahren erlosch dann auch dieses ERG .

Die Einschränkung des Gesichtsfeldes konnten wir nur bei einem RDH12-Patienten messen. Bei diesem lief sie jedoch schneller ab als bei den RPE65-Fällen. Der LRAT-Patient hatte lediglich ein Skotom. Die Personen mit *RDH5*-Mutationen wurden keine eindeutig nachweisbaren Gesichtsfeldeinschränkungen festgestellt.

Die Untersuchung des Visus ergab die schlechtesten Werte für Patienten mit *RDH12*-Mutationen. Der Abfall der Visuswerte fand bei ihnen am schnellsten statt, so dass sie mit dem 15. Lebensjahr bereits blind waren. Die Schwankungsbreite der Visuswerte war relativ schmal. Bei den RPE65-Patienten berichtet die Literatur über eine große Schwankungsbreite bezüglich des Visus⁶⁰. Diese Patienten zeigten keinen so deutlichen Abfall wie bei den RDH12-Patienten. Die Sehbeeinträchtigung hängt bei diesem Enzym offenbar von der Art der Mutation ab. So konnten Lorenz et al. bei einem Patienten einen Visus von 1,0 messen und zeigen, dass diese Mutation eine Restaktivität zulässt, die offenbar ausreicht, um eine starke Sehbeeinträchtigung zu verzögern³⁶. Der untersuchte LRAT-Patient wies, trotz seines fortgeschrittenen Alters (64 Jahre), einen Visus von 0,6 auf⁶⁰, während die drei RDH5-Patienten Visuswerte von über 0,9 hatten.

Die RDH5-Patienten zeigten eine verminderte (494.1), bzw. fehlende (1785.1) Fundusautofluoreszenz. Dergleichen ist von Personen mit Mutationen im *RPE65*-Gen bekannt³⁷.

Eine Veränderung der Refraktionsanomalien von anfangs hyperop nach myop fand bei den RPE65-Patienten statt. Die anderen Patientengruppen (*RDH12*, *RDH5*, *LRAT*) wiesen eine solche Entwicklung nicht auf. In Bezug auf die RDH5-Patienten kann nur festgestellt werden, dass sie, sofern eine Refraktionsanomalie vorlag, hyperop waren, ebenso der LRAT-Patient⁶⁰.

Der Phänotyp von *LRAT*-Mutationen sollte dem der *RPE65*-Mutationen ähnlich sein, da beide Enzyme nur gemeinsam arbeiten könnten⁴⁹. Die Untersuchungsergebnisse bei dem Patienten mit *LRAT*-Mutationen bestätigen diese Hypothese nicht. So hatte dieser Patient trotz seines fortgeschrittenen Alters einen relativ guten Visus und litt unter erhöhter Blendempfindlichkeit, was bei den RPE65-Patienten regelhaft nicht der Fall war. Sein Fundus zeigte Knochenbälkchen - im ERG waren die photopischen Antworten stärker als die skotopischen beeinträchtigt.

Die Pupillenreaktionen waren bei allen Patienten ohne starke Beeinträchtigung. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass die lichtinduzierte Pupillenreaktion vom Sehzyklus unabhängig ist. Dies erklärt das Fehlen von Pupillenreaktionsstörungen bei unseren Patienten ⁶⁸.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Der klinische Phänotyp der *RPE65*-Mutationen ist durch zahlreiche Publikationen inzwischen gut beschrieben worden. So hat sich herausgestellt, dass Mutationen in diesem Gen zu stark unterschiedlichen Beeinträchtigungen des Sehvermögens führen. Der resultierende Phänotyp besteht in einer Stäbchen-Zapfen-Dystrophie mit Nachtblindheit, Nystagmus und Gesichtsfeld-einschränkungen. Der Visus ist in der ersten Lebensdekade ausreichend, um die Regelschule zu besuchen, verschlechtert sich aber mit zunehmendem Alter bis hin zur Blindheit, ferner findet eine Entwicklung der Refraktionsanomalien von anfangs hyperop nach myop statt. Im OCT lässt sich in frühen Jahren überwiegend eine normale Schichtung der Netzhaut erkennen. Im Alter über 40 Jahren kann man eine verdünnte Netzhaut nachweisen. Funduskopisch imponieren unspezifische Veränderungen. Besonders im hohen Lebensalter kommt es zu RPE-Veränderungen^{36,60}.

Im Hinblick auf den gut beschriebenen *RPE65*-Phänotyp war es Ziel dieser Arbeit, nun auch die Phänotypen der Mutationen weiterer Proteine des Retinolstoffwechsels zu ermitteln und mit dem klinischen Bild der *RPE65*-Mutationen zu vergleichen.

Dazu wurden, im Rahmen dieser Arbeit, zwei Gene des Retinolzyklus´ auf Mutationen untersucht. Es handelte sich dabei um das *RDH12*- und das *RDH5*-Gen. Die Daten für das *LRAT*- und *RPE65*-Gen wurden einer früheren Untersuchung von Preising et al. entnommen⁶⁰, die in der selben Arbeitsgruppe angefertigt wurde, wie die hier vorliegende Arbeit. Für jedes dieser Gene gab es eigene Patientenkollektive, wobei einige Personen aus diesen Kollektiven auf mehrere Gene gleichzeitig untersucht wurden.

Das Mutationsscreening wurde mit dem SSCP-Verfahren durchgeführt. Zeigte dieses Verfahren einen auffälligen Befund, erfolgte eine Sequenzierung des entsprechenden Genes mit der Chain-Termination-Methode nach Sanger. Anschließend wurde der Phänotyp jener Patienten verglichen, deren Sequenzvariation eine funktionelle Nullmutation oder deutliche Beeinträchtigung der Enzymfunktion vermuten ließen. Die klinischen Daten für den phänotypologischen Vergleich stammen aus früheren Konsultationen dieser Patienten in der Abteilung für Kinderophthalmologie, Strabismologie und Ophthalmogenetik des Klinikums der Universität Regensburg oder in anderen medizinischen Einrichtungen.

Die folgenschwersten Auswirkungen für die Patienten hatte eine Mutation im *RDH12*-Gen. Sie waren bereits mit dem 15. Lebensjahr erblindet, hatten einen Nystagmus und litten unter Pho-

trophobie. Zwei von diesen Patienten wiesen, im Gegensatz zu den *RPE65*-Patienten, Knochenkörperchen in ihrem Fundus auf. Das ERG war schon in den ersten fünf Lebensjahren schwer beeinträchtigt - bei einem Patienten (1358.1) bereits mit 6 Jahren unterhalb der Nachweisgrenze.

Der Phänotyp von *LRAT*-Mutationen sollte dem der *RPE65*-Mutationen ähnlich sein, da beide Enzyme nur gemeinsam arbeiten könnten⁴⁹. Die Untersuchungsergebnisse des Patienten mit *LRAT*-Mutationen konnten diese Hypothese nicht bestätigen. So hatte er, trotz seines Alters (64), einen relativ guten Visus (0,6) und litt unter einer erhöhten Blendempfindlichkeit, was bei den meisten der *RPE65*-Patienten nicht der Fall war. Sein Fundus zeigte Knochenbälkchen, im ERG waren die photopischen Antworten stärker beeinträchtigt als die skotopischen⁶⁰.

Beim Phänotyp der *RDH5*-Patienten imponierten der typische Fundus albipunctatus und diskrete Makulaveränderungen. Es konnten keine eindeutigen Gesichtsfeldeinschränkungen nachgewiesen werden. Die elektrophysiologischen Untersuchungen zeigten ein uneinheitliches Bild. Ein Patient wies eine Beeinträchtigung des Stäbchensystems auf, während bei einem Patienten, mit einer funktionellen Nullmutation, nur das Zapfensystem beeinträchtigt war. Bei keinem dieser o. g. Personen konnte eine Zapfendystrophie diagnostiziert werden. Allerdings ist die Zapfendystrophie eher ein Spätsymptom. Die hier vorgestellten Personen waren jedoch, zum Zeitpunkt der Untersuchung, jünger als 30 Jahre⁵². Somit kann eine später beginnende Zapfendystrophie nicht ausgeschlossen werden. Ferner war die Fundusautofluoreszenz stark beeinträchtigt.

Die vorliegende Untersuchung hat ein weiteres „Mosaiksteinchen“ geliefert, um das weite Feld der erblichen Netzhautdegenerationen besser gliedern zu können. Dies erscheint unter anderem im Hinblick auf die Entwicklung von Gentherapien sehr wichtig. So verliefen bereits erste Versuche erfolgreich, bei denen ein mutiertes *RPE65*-Gen durch Gentherapie substituiert wurde

1,9,45

Ein Teil der hier verwendeten Ergebnisse geht in die Arbeit „Lack of autofluorescence of the fundus and of the punctate lesions in Fundus Albipunctatus associated with mutations in *RDH5*.“ ein. Diese Arbeit wurde von Herrn PhD Patrik Schatz und sechs weiteren Personen veröffentlicht. Dieser Autorenschaft gehören u. a. Frau Prof. Dr. Lorenz, Herr Dr. Preising und der Autor dieser Dissertation an. Die Veröffentlichung befindet sich derzeit im Peer-Review bei der Zeitschrift „Retina“.

6 Literaturverzeichnis

1. Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, Robbie S, Henderson R, Balaggan K, Viswanathan A, Holder GE, Stockman A, Tyler N, Petersen-Jones S, Bhattacharya SS, Thrasher AJ, Fitzke FW, Carter BJ, Rubin GS, Moore AT, Ali RR. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *New England Journal of Medicine* 358[21], 2231-2239. 2008.
2. Batten ML, Imanishi Y, Maeda T, Tu DC, Moise AR, Bronson D, Possin D, Van Gelder RN, Baehr W, Palczewski K. Lecithin-retinol acyltransferase is essential for accumulation of all-trans-retinyl esters in the eye and in the liver. *Journal of Biological Chemistry* 279[11], 10422-10432. 2004.
3. Benayoun L, Spiegel R, Auslender N, Abbasi AH, Rizel L, Hujeirat Y, Salama I, Garzoni HJ, Ion-Shalev S, Ben-Yosef T. Genetic heterogeneity in two consanguineous families segregating early onset retinal degeneration: the pitfalls of homozygosity mapping. *Am.J.Med.Genet.A.* 149A[4], 650-656. 2009.
4. Bernal S, Calaf M, Garcia-Hoyos M, Garcia-Sandoval B, Rosell J, Adan A, Ayuso C, Baiget M. Study of the involvement of the RGR, CRPB1, and CRB1 genes in the pathogenesis of autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Journal of Medical Genetics* 40[7], e89. 2003.
5. Blomhoff R, Blomhoff HK. Overview of retinoid metabolism and function. *J Neurobiol.* 66[7], 606-630. 2006.
6. Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC. Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *American Journal of Human Genetics* 48, 137-144. 1991.
7. Carr RE. Congenital stationary nightblindness. *Trans Am.Ophthalmol Soc.* 72:448-87., 448-487. 1974.
8. Cheng S, Fockler C, Barnes WM, Higuchi R. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 91[12], 5695-5699. 1994.
9. Cideciyan AV, Aleman TS, Boye SL, Schwartz SB, Kaushal S, Roman AJ, Pang JJ, Sumaroka A, Windsor EA, Wilson JM, Flotte TR, Fishman GA, Heon E, Stone EM, Byrne BJ, Jacobson SG, Hauswirth WW. Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 105[39], 15112-15117. 2008.
10. Cideciyan AV, Haeseleer F, Fariss RN, Aleman TS, Jang GF, Verlinde CL, Marmor MF, Jacobson SG, Palczewski K. Rod and cone visual cycle consequences of a null mu-

- tation in the 11-cis-retinol dehydrogenase gene in man. *Vis.Neurosci.* 17[5], 667-678. 2000.
11. den Hollander AI, Heckenlively JR, van den Born LI, de Kok YJ, Velde-Visser SD, Kellner U, Jurklies B, van Schooneveld MJ, Blankenagel A, Rohrschneider K, Wissinger B, Cruysberg JR, Deutman AF, Brunner HG, Apfelstedt-Sylla E, Hoyng CB, Cremers FP. Leber Congenital Amaurosis and Retinitis Pigmentosa with Coats-like exudative vasculopathy are associated with mutations in the crumbs homologue 1 (CRB1) gene. *American Journal of Human Genetics* 69[1], 198-203. 2001.
 12. den Hollander AI, Koenekoop RK, Yzer S, Lopez I, Arends ML, Voeselek KE, Zonneveld MN, Strom TM, Meitinger T, Brunner HG, Hoyng CB, van den Born LI, Rohrschneider K, Cremers FP. Mutations in the CEP290 (NPHP6) Gene Are a Frequent Cause of Leber Congenital Amaurosis. *Am J Hum Genet.* 79[3], 556-561. 2006.
 13. den Hollander AI, ten Brink JB, de Kok YJ, van Soest S, van den Born LI, van Driel MA, van de Pol DJR, Payne AM, Bhattacharya SS, Kellner U, Hoyng CB, Westerveld A, Brunner HG, Bleeker Wagemakers EM, Deutman AF, Heckenlively JR, Cremers FPM, Bergen AAB, van de Pol DJ, Bleeker-Wagemakers EM, Heckenlively JR, Cremers FP, Bergen AA. Mutations in a human homologue of Drosophila crumbs cause retinitis pigmentosa (RP12). *Nat.Genet.* 23[2], 217-221. 1999.
 14. Dryja TP, Adams SM, Grimsby JL, McGee TL, Hong DH, Li T, Andreasson S, Berson EL. Null RPGRIP1 alleles in patients with leber congenital amaurosis. *American Journal of Human Genetics* 68[5], 1295-1298. 2001.
 15. Eysel U. Signalaufnahme und Verarbeitung in der Netzhaut. *Ophthalmologe.* 104[1], 79-90. 2007.
 16. Fahl E, Jaissle GB, May CA, van de Pavert S, Wenzel A, Claes E, Wolfrum U, Wijnholds J, Humphries P, Seeliger MW. Bone Spicule Formation in Retinitis Pigmentosa: Insights From a Mouse Model. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 49[5], 2199. 2008. Online Reference: <http://abstracts.iovs.org/cgi/content/abstract/49/5/2199>.
 17. Farjo KM, Moiseyev G, Takahashi Y, Crouch RK, Ma JX. The 11-cis-retinol dehydrogenase activity of RDH10 and its interaction with visual cycle proteins. *Invest Ophthalmol Vis.Sci.* 50[11], 5089-5097. 2009.
 18. Fingert JH, Oh K, Chung M, Scheetz TE, Andorf JL, Johnson RM, Sheffield VC, Stone EM. Association of a novel mutation in the retinol dehydrogenase 12 (RDH12) gene with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol.* 126[9], 1301-1307. 2008.

19. Fleisch VC, Schonthaler HB, von LJ, Neuhauss SC. Subfunctionalization of a retinoid-binding protein provides evidence for two parallel visual cycles in the cone-dominant zebrafish retina. *J.Neurosci.* 28[33], 8208-8216. 2008.
20. Foxman SG, Heckenlively JR, Bateman JB, Wirtschafter JD. Classification of congenital and early onset retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol.* 103[10], 1502-1506. 1985.
21. Gonzalez-Fernandez F, Kurz D, Bao Y, Newman S, Conway BP, Young JE, Han DP, Khani SC. 11-cis retinol dehydrogenase mutations as a major cause of the congenital night-blindness disorder known as fundus albipunctatus. *Molecular Vision* 5, 41. 1999.
22. Gu S, Thompson DA, Srisailapathy Srikumari CR, Lorenz B, Finckh U, Nicoletti A, Murthy KR, Rathmann M, Kumaramanickavel G, Denton MJ, Gal A. Mutations in RPE65 cause autosomal recessive childhood-onset severe retinal dystrophy. *Nat.Genet.* 17[2], 194-197. 1997.
23. Hanein S, Perrault I, Gerber S, Tanguy G, Barbet F, Ducroq D, Calvas P, Dollfus H, Hamel C, Lopponen T, Munier F, Santos L, Shalev S, Zafeiriou D, Dufier JL, Munnich A, Rozet JM, Kaplan J. Leber congenital amaurosis: comprehensive survey of the genetic heterogeneity, refinement of the clinical definition, and genotype-phenotype correlations as a strategy for molecular diagnosis. *Hum Mutat.* 23[4], 306-317. 2004.
24. Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. Retinitis pigmentosa. *Lancet.* 368[9549], 1795-1809. 2006.
25. Iannaccone A, Tedesco SA, Gallaher KT, Yamamoto H, Charles S, Dryja TP. Fundus albipunctatus in a 6-year old girl due to compound heterozygous mutations in the RDH5 gene. *Doc.Ophthalmol.* 115[2], 111-116. 2007.
26. Janecke AR, Thompson DA, Utermann G, Becker C, Hubner CA, Schmid E, McHenry CL, Nair AR, Ruschendorf F, Heckenlively J, Wissinger B, Nurnberg P, Gal A. Mutations in RDH12 encoding a photoreceptor cell retinol dehydrogenase cause childhood-onset severe retinal dystrophy. *Nat.Genet* 36[8], 850-854. 2004.
27. Jordanova A, Kalaydjieva L, Savov A, Claustres M, Schwarz M, Estivill X, Angelicheva D, Haworth A, Casals T, Kremensky I. SSCP analysis: a blind sensitivity trial. *Human Mutation* 10[1], 65-70. 1997.
28. Kanan Y, Wicker LD, Al-Ubaidi MR, Mandal NA, Kasus-Jacobi A. Retinol dehydrogenases RDH11 and RDH12 in the mouse retina: expression levels during development and regulation by oxidative stress. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 49[3], 1071-1078. 2008.
29. Kaschula CH, Jin MH, smond-Smith NS, Travis GH. Acyl CoA:retinol acyltransferase (ARAT) activity is present in bovine retinal pigment epithelium. *Exp.Eye Res.* 82[1], 111-121. 2006.

30. Kawaguchi R, Yu J, Honda J, Hu J, Whitelegge J, Ping P, Wiita P, Bok D, Sun H. A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A. *Science*. 315[5813], 820-825. 2007.
31. Keller B, Adamski J. RDH12, a retinol dehydrogenase causing Leber's congenital amaurosis, is also involved in steroid metabolism. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 104[3-5], 190-194. 2007.
32. Kim TS, Maeda A, Maeda T, Heinlein C, Kedishvili N, Palczewski K, Nelson PS. Delayed dark adaptation in 11-cis-retinol dehydrogenase-deficient mice: a role of RDH11 in visual processes in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 280[10], 8694-8704. 2005.
33. Koenekoop RK. An overview of Leber congenital amaurosis: a model to understand human retinal development. *Surv.Ophthalmol* 49[4], 379-398. 2004.
34. Kurth I, Thompson DA, Ruther K, Feathers KL, Chrispell JD, Schroth J, McHenry CL, Schweizer M, Skosyrski S, Gal A, Hubner CA. Targeted disruption of the murine retinal dehydrogenase gene rdh12 does not limit visual cycle function. *Mol.Cell Biol.* 27[4], 1370-1379. 2007.
35. Liu T, Jenwitheesuk E, Teller DC, Samudrala R. Structural insights into the cellular retinaldehyde-binding protein (CRALBP). *Proteins*. 61[2], 412-422. 2005.
36. Lorenz B, Poliakov E, Schambeck M, Friedburg C, Preising MN, Redmond TM. A comprehensive clinical and biochemical functional study of a novel RPE65 hypomorphic mutation. *Invest Ophthalmol Vis.Sci.* 49[12], 5235-5242. 2008.
37. Lorenz B, Wabbels B, Wegscheider E, Hamel CP, Drexler W, Preising MN. Lack of fundus autofluorescence to 488 nanometers from childhood on in patients with early-onset severe retinal dystrophy associated with mutations in RPE65. *Ophthalmology* 111[8], 1585-1594. 2004.
38. Lotery AJ, Jacobson SG, Fishman GA, Weleber RG, Fulton AB, Namperumalsamy P, Heon E, Levin AV, Grover S, Rosenow JR, Kopp KK, Sheffield VC, Stone EM. Mutations in the CRB1 gene cause Leber congenital amaurosis. *Archives of Ophthalmology* 119[3], 415-420. 2001.
39. Lotery AJ, Namperumalsamy P, Jacobson SG, Weleber RG, Fishman GA, Musarella MA, Hoyt CS, Heon E, Levin A, Jan J, Lam B, Carr RE, Franklin A, Radha S, Andorf JL, Sheffield VC, Stone EM. Mutation analysis of 3 genes in patients with Leber congenital amaurosis. *Archives of Ophthalmology* 118[4], 538-543. 2000.
40. Lottspeich F, Zorbass H. Bioanalytik. 24. 1998. Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag.
41. Lottspeich F, Zorbass H. Polymerase-Kettenreaktion. Lottspeich F, Zorbass H, editors. Bioanalytik. 24, 673-704. 1998. Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag.

42. Maeda A, Golczak M, Maeda T, Palczewski K. Limited roles of Rdh8, Rdh12, and Abca4 in all-trans-retinal clearance in mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis.Sci.* 50[11], 5435-5443. 2009.
43. Maeda A, Maeda T, Golczak M, Chou S, Desai A, Hoppel CL, Matsuyama S, Palczewski K. Involvement of all-trans-retinal in acute light-induced retinopathy of mice. *Journal of Biological Chemistry* 284[22], 15173-15183. 2009.
44. Maeda A, Maeda T, Imanishi Y, Sun W, Jastrzebska B, Hatala DA, Winkens HJ, Hofmann KP, Janssen JJ, Baehr W, Driessen CA, Palczewski K. Retinol dehydrogenase (RDH12) protects photoreceptors from light-induced degeneration in mice. *J Biol.Chem.* 281[49], 37697-37704. 2006.
45. Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, Pugh EN, Jr., Mingozzi F, Bennicelli J, Banfi S, Marshall KA, Testa F, Surace EM, Rossi S, Lyubarsky A, Arruda VR, Konkle B, Stone E, Sun J, Jacobs J, Dell'osso L, Hertle R, Ma JX, Redmond TM, Zhu X, Hauck B, Zeleniaia O, Shindler KS, Maguire MG, Wright JF, Volpe NJ, McDonnell JW, Auricchio A, High KA, Bennett J. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *New England Journal of Medicine* 358[21], 2240-2248. 2008.
46. Marchette LD, Thompson DA, Kravtsova M, Ngansop TN, Mandal MN, Kasus-Jacobi A. Retinol dehydrogenase 12 detoxifies 4-hydroxynonenal in photoreceptor cells. *Free Radic.Biol.Med.* 2009.
47. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16, 1215. 1988.
48. Moise AR, Golczak M, Imanishi Y, Palczewski K. Topology and membrane association of lecithin: retinol acyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* 282[3], 2081-2090. 2007.
49. Moiseyev G, Chen Y, Takahashi Y, Wu BX, Ma JX. RPE65 is the isomerohydrolase in the retinoid visual cycle. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 102[35], 12413-12418. 2005.
50. Morimura H, Fishman GA, Grover SA, Fulton AB, Berson EL, Dryja TP. Mutations in the RPE65 gene in patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa or Leber congenital amaurosis. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 95[6], 3088-3093. 1998.
51. Muniz A, Villazana-Espinoza ET, Hatch AL, Trevino SG, Allen DM, Tsin AT. A novel cone visual cycle in the cone-dominated retina. *Exp.Eye Res.* 85[2], 175-184. 2007.
52. Nakamura M, Hotta Y, Tanikawa A, Terasaki H, Miyake Y. A high association with cone dystrophy in fundus albipunctatus caused by mutations of the RDH5 gene. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 41[12], 3925-3932. 2000.

53. Nakamura M, Lin J, Ito Y, Miyake Y. Novel mutation in RLBP1 gene in a Japanese patient with retinitis punctata albescens. *American Journal of Ophthalmology* 139[6], 1133-1135. 2005.
54. Nakamura M, Skalet J, Miyake Y. RDH5 gene mutations and electroretinogram in fundus albipunctatus with or without macular dystrophy: RDH5 mutations and ERG in fundus albipunctatus. *Doc.Ophthalmol.* 107[1], 3-11. 2003.
55. Niwa Y, Kondo M, Ueno S, Nakamura M, Terasaki H, Miyake Y. Cone and Rod Dysfunction in Fundus Albipunctatus with RDH5 Mutation: An Electrophysiological Study. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 46[4], 1480-1485. 2005.
56. Paunescu K, Wabbels B, Preising MN, Lorenz B. Longitudinal and cross-sectional study of patients with early-onset severe retinal dystrophy associated with RPE65 mutations. *Graefes Arch.Clin.Exp.Ophthalmol.* 243[5], 417-426. 2005.
57. Payne AM, Morris AG, Downes SM, Johnson S, Bird AC, Moore AT, Bhattacharya SS, Hunt DM. Clustering and frequency of mutations in the retinal guanylate cyclase (GUCY2D) gene in patients with dominant cone-rod dystrophies. *Journal of Medical Genetics* 38[9], 611-614. 2001.
58. Perrault I, Hanein S, Gerber S, Barbet F, Ducroq D, Dollfus H, Hamel C, Dufier JL, Munnich A, Kaplan J, Rozet JM. Retinal dehydrogenase 12 (RDH12) mutations in leber congenital amaurosis. *American Journal of Human Genetics* 75[4], 639-646. 2004.
59. Perrault I, Rozet JM, Gerber S, Ghazi I, Ducroq D, Souied E, Leowski C, Bonnemaïson M, Dufier JL, Munnich A, Kaplan J. Spectrum of retGC1 mutations in Leber's congenital amaurosis. *European Journal of Human Genetics* 8[8], 578-582. 2000.
60. Preising MN, Paunescu K, Friedburg C, Lorenz B. Genetische und klinische Heterogenität bei LCA-Patienten : Das Ende der Einheitlichkeit. *Der Ophthalmologe* 104[6], 490-498. 2007.
61. Rando RR. The biochemistry of the visual cycle. *Chem.Rev.* 101[7], 1881-1896. 2001.
62. Schuster A, Janecke AR, Wilke R, Schmid E, Thompson DA, Utermann G, Wissinger B, Zrenner E, Gal A. The phenotype of early-onset retinal degeneration in persons with RDH12 mutations. *Invest Ophthalmol. Vis.Sci.* 48[4], 1824-1831. 2007.
63. Senechal A, Humbert G, Surget MO, Bazalgette C, Bazalgette C, Arnaud B, Arndt C, Laurent E, Brabet P, Hamel CP. Screening genes of the retinoid metabolism: novel LRAT mutation in leber congenital amaurosis. *Am J Ophthalmol.* 142[4], 702-704. 2006.
64. Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* 16, 325-332. 1993.

65. Sweeney MO, McGee TL, Berson EL, Dryja TP. Low prevalence of lecithin retinol acyltransferase mutations in patients with Leber congenital amaurosis and autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Molecular Vision* 13:588-93., 588-593. 2007.
66. Thompson DA, Janecke AR, Lange J, Feathers KL, Hubner CA, McHenry CL, Stockton DW, Rammesmayr G, Lupski JR, Antinolo G, Ayuso C, Baiget M, Gouras P, Heck-enlively JR, den Hollander A, Jacobson SG, Lewis RA, Sieving PA, Wissinger B, Yzer S, Zrenner E, Utermann G, Gal A. Retinal degeneration associated with RDH12 mutations results from decreased 11-cis retinal synthesis due to disruption of the visual cycle. *Hum Mol.Genet.* 14[24], 3865-3875. 2005.
67. Thompson DA, Li Y, McHenry CL, Carlson TJ, Ding X, Sieving PA, Apfelstedt-Sylla E, Gal A. Mutations in the gene encoding lecithin retinol acyltransferase are associated with early-onset severe retinal dystrophy. *Nat.Genet.* 28[2], 123-124. 2001.
68. Tu DC, Owens LA, Anderson L, Golczak M, Doyle SE, McCall M, Menaker M, Palczewski K, Van Gelder RN. Inner retinal photoreception independent of the visual retinoid cycle. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 103[27], 10426-10431. 2006.
69. Valente EM, Silhavy JL, Brancati F, Barrano G, Krishnaswami SR, Castori M, Lancaster MA, Boltshauser E, Boccone L, Al Gazali L, Fazzi E, Signorini S, Louie CM, Bellacchio E, Bertini E, Dallapiccola B, Gleeson JG. Mutations in CEP290, which encodes a centrosomal protein, cause pleiotropic forms of Joubert syndrome. *Nat.Genet.* 38[6], 623-625. 2006.
70. Valverde D, Pereiro I, Vallespin E, Ayuso C, Borrego S, Baiget M. Complexity of phenotype-genotype correlations in Spanish patients with RDH12 mutations. *Invest Ophthalmol Vis.Sci.* 50[3], 1065-1068. 2009.
71. Wada Y, Abe T, Sato H, Tamai M. A novel Gly35Ser mutation in the RDH5 gene in a Japanese family with fundus albipunctatus associated with cone dystrophy. *Archives of Ophthalmology* 119[7], 1059-1063. 2001.
72. Watson JD, Hopkins NA, Roberts JW, Argetsinger-Seitz J, Weiner AM. The structures of DNA. *Molecular Biology of the Gene.* 4[9], 241-281. 1988. Menlo-Park, Ca, The Benjamin/Cummings Publishing Co.Inc.
73. Wijesuriya SD, Evans K, Jay MR, Davison C, Weber BHF, Bird AC, Bhattacharya SS, Gregory CY. Sorsby's fundus dystrophy in the British Isles: demonstration of a striking founder effect by microsatellite-generated haplotypes. *Genome Res.* 6[2], 92-101. 1996.
74. Wu Q, Blakeley LR, Cornwall MC, Crouch RK, Wiggert BN, Koutalos Y. Interphotoreceptor retinoid-binding protein is the physiologically relevant carrier that removes retinol from rod photoreceptor outer segments. *Biochemistry.* 46[29], 8669-8679. 2007.

75. Yamamoto H, Simon A, Eriksson U, Harris E, Berson EL, Dryja TP. Mutations in the gene encoding 11-cis retinol dehydrogenase cause delayed dark adaptation and fundus albipunctatus. *Nat.Genet.* 22[2], 188-191. 1999.
76. Yzer S, Leroy BP, De Baere E, de Ravel TJ, Zonneveld MN, Voeselek K, Kellner U, Ciriaco JP, de Faber JT, Rohrschneider K, Roepman R, den Hollander AI, Cruysberg JR, Meire F, Casteels I, Moll-Ramirez NG, Allikmets R, van den Born LI, Cremers FP. Microarray-based mutation detection and phenotypic characterization of patients with Leber congenital amaurosis. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 47[3], 1167-1176. 2006.
77. Zernant J, Kulm M, Dharmaraj S, den Hollander AI, Perrault I, Preising MN, Lorenz B, Kaplan J, Cremers FP, Maumenee I, Koenekoop RK, Allikmets R. Genotyping microarray (disease chip) for leber congenital amaurosis: detection of modifier alleles. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 46[9], 3052-3059. 2005.
78. Zhang Q, Li S, Guo X, Guo L, Xiao X, Jia X, Kuang Z. Screening for CRX gene mutations in Chinese patients with Leber congenital amaurosis and mutational phenotype. *Ophthalmic Genetics* 22[2], 89-96. 2001.

7 Verzeichnis der verwendeten Software

„The Splice Sequences Finder“-Software	http://www.umd.be/SSF
„PolyPhen“-Software	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/
„Retina-International“-Datenbank	http://www.retina-international.org/sci-news/disloci.htm
„Swissprot“-Datenbank	http://expasy.org/people/swissprot.html
„SIFT“-Software	http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html

8 Anhang

Die in diesem Anhang aufgelisteten Patientendaten wurden aus den Akten der Abteilung für Kinderophthalmologie, Strabismologie und Ophthalmogenetik des Klinikums der Universität Regensburg entnommen und für diese Arbeit verwendet.

8.1 Klinische Daten der Patienten mit Mutationen im *RDH12*-Gen

DNA Geburtsstag Diagnose	Konsultation	Gesichtsfeld Goldmann Skot. Perimetrie Phot. Perimetrie	Nystagmus Dunkeladaptation Photophobie Pupillenreaktion	Anomaloskop Ishihara Ishikawa Panel D15	Blitz-VEP Muster VEP Ganzfeld-ERG multifokales ERG EOG	Skioskopie Visus Ferne Visus Nähe	Autofluoreszenz	OCT	Fundus
0078.1 25.10.1967 RP	02.05.1998	OU: konz. GF↓	Dunkeladaptation↓	n.d..	n.d..	OD: 0,4 OS: 0,5	n.d..	n.d..	Knochenkörp. Arterien eng
	27.05.1998 bis 04.06.1998	siehe Abb. 15: GF sieh. Abb.14: 2-FP sko Perimetrie: OD Verlust oberes GF, Antworten zapfen- bedingt u.stäb- chenbedingt. pho Perimetrie: OD Restantw. innerh. v. 15°, niedr. Schwellen	Dunkeladaptation↓	n.d..	OU: ERG sko/pho erloschen	OD: -11,0/-1,0/150° OS: -12,0/-2,0/14° OD: ec 0,4 OS: ec 0,5	n.d.	n.d..	ONH: opB mit per. chorioatroph. Conus MAK: MWR -, PE-V Peripher: zirkl. Knochenbälkchen Arterien eng
0209.2 18.02.1972 arRP	27.11.1998	n.d..	n.d..	OU: opB	sco: b-Welle Lat. erh, Amp stark reduz. pho: b-Welle Amp reduz., Lat. erhöht 30Hz: OS Ampl erh. OP: normal	OD: -0,75/-0,5/90° OS: -0,75/-1,5/70° OU: cc 1,25p	n.d..	n.d..	OD: ONH opB, MAK: feine PE-V, Peripher: PE opB OS: opB, keine PE-V
0107.1 28.03.1967	13.06.1988	n.d..	rotat. Pendel-Ny	n.d..	n.d..	hochgrad. Minder. seit Kindheit	n.d..	n.d..	degenerativ. NH- Veränd.

8 Anhang

DNA Geburtsstag Diagnose	Konsultation	Gesichtsfeld Goldmann Skot. Perimetrie Phot. Perimetrie	Nystagmus Dunkeladaptation Photophobie Pupillenreaktion	Anomaloskop Ishihara Ishikawa Panel D15	Blitz-VEP Muster VEP Ganzfeld-ERG multifokales ERG EOG	Skiaskopie Visus Ferne Visus Nähe	Autofluoreszenz	OCT	Fundus
LCA						bin 1/20			
	13.08.1991	n.d..	Ny	n.d..	n.d..	bin 1/25	n.d..	n.d..	ONH blass, rarefiz. Gef
	18.12.1995	n.d..	Primär ruhig, ztw. Pendel-Ruck Ny, rotat.Ny, see-saw Ny Braucht viel Licht	n.d..	sko/pho erloschen	OD:+2,75/-2,5/178° OS: -3,25/-5,0/176° OU: LSP, FZ bei Rechtsbl.	n.d.	n.d..	ONH blass, rs, MAK-Kolobom, per.Knochenb., enge Arterien
	28.09.1998	n.d..	früher Ny Photophobie	n.d..	n.d..	n.d..	n.d..	n.d..	n.d..
1181.1 02.04.1981 EOSRD	21.03.1983	n.d..	n.d..	n.d..	2 J. pho nicht ableitbar	connatal Hy 6J. OD: 0,1, OS: 0,3 bis 14 J. mit Bildschirmleseger.	n.d..	n.d..	2 J. PE-V ONH: vt, excav., begren. PE-V
	22.04.1987	n.d..	Ny	n.d..	n.d..	OS: cc 0,15, OD: 1/50 (Snellen)	n.d..	n.d..	ONH rs, PE-V in MAK u. Periph.
	01.03.2004	keine Fixation	Rotator. Pendel Ny kleiner Amplitude, mfg Photophobie	n.d..	OU: erloschen OS: kleine Restantw.	LSP pos, HBW neg	nicht möglich, keine Fixation	nicht möglich, keine Fixation	per. PE-V wie Knochenkörp., PE-A, Arterien eng, chorioret. Atrophien
1358.1 26.10.1999 Zapfen- Stäbchen- Dystrophie	11.08.2003	n.d..	n.d..	n.d..	n.d..	OD 3,75/-0,25/79° OS +5,0/-1,75/160°	n.d..	n.d..	ONH: blass, vt, ödematös, Gef eng, MAK areoläre Atrophie, gelbl. glitzernd. Reflexe, konfl.PE- Verklump, PE-V, PE-A (nahe Ora), PE-Defekte
	08.12.2003	n.d..	Dunkeladaptation↓ Photophobie	n. k.	n.d..	OD +5,0/-0,5/39° OS +6,7/-0,75/180° OD: cc 0,4 p OS: cc 0,1 (LEA)	n.d..	n.d..	ONH: nicht rs, deutl. prominent, MAK: zentr. areoläre Atroph. Peripher: ausgepr. RPE-Defekte u. PE-V
	29.01.2004	n. k.	Dunkeladaptation↓ Photophobie	Sat.: verw. Entl.d. Tritanachse, n. k.	ERG OD: Stäbchenantw. 67%↓	OD +5,0/-0,5/39° OS +6,75/-0,7/180°	n.d..	n.d..	ONH: nicht rs, erhab. pigm.

8 Anhang

DNA Geburtsstag Diagnose	Konsultation	Gesichtsfeld Goldmann Skot. Perimetrie Phot. Perimetrie	Nystagmus Dunkeladaptation Photophobie Pupillenreaktion	Anomaloskop Ishihara Ishikawa Panel D15	Blitz-VEP Muster VEP Ganzfeld-ERG multifokales ERG EOG Zapfenantw. 85%↓	Skioskopie Visus Ferne Visus Nähe	Autofluoreszenz	OCT	Fundus
						OD 0,3-0,4 OS 0,2 p			Rand, Gef unauffällig MAK FVR -,MWR- unregelm.pigme., fleckige PE-A, Peripherie: verstr. scharf begr. PE- Defekte
22.05.2006		OD: konz. GF↓, II/4: o 10°, na 20°, u 30°, te 35° III/4: o 50°, na 40°, u 50°, te 70° OS: konz. GF↓ I/4: o 10°, horiz. 2°-20°, u 10° II/4 o 35°, na 5°, u 30°, te 40° III/4 o 50°, na 40°, u 50°, te 70°	RichtungsNy. n. rechts, kl. Amp, mfg Dunkeladaptation↓ Photophobie OD geringes RAPD	sat.: norm. desat.: RA norm, LA kleine Verw.	ERG OD: sko / pho unter der Nachweisgrenze	OD +5,0/-0,25/20 OS +5,75/-0,5/35 OU sc 0,2 Lea Test in 3m OD 0,32 OS 0,16 cc Lea in 40 cm OD 0,25 OS 0,16 pp OU 0,4	n.d..	n.d..	ausgepr. Pseudo- Stauungspap., ausgepr. PE-V, PE-Prolif.
30.04.2007		starke konz. GF↓, V/4 auf 15° III/4 auf 5°	Dunkeladaptation↓ Photophobie	sat.: OU normal desat. OU mehrf. Verw. in versch. Achsen	n.d..	OD ec 0,2 OS ec 0,13 Lea in 40 cm: OD ec 0,25 OS ec 0,12-0,16	perimakul. hyper- fluoreszenter Ring	n.d..	ausgepr. Pseudo- Stauungspapille, ausgepr. PE-V

Amp: Amplitude, ar: autosomal rezessiv, bin: binokular, cc: mit Korrektur, ec: eigene Korrektur, EOSRD: early-onset severe retinal dystrophy, ERG:

Elektroretinogramm, FVR: Fovealreflex, FZ: Fingerzählen, Gef: Gefäße, GF: Gesichtsfeld, HBW: Handbewegungen, HP: Hypopigmentierung, Hy: Hypermetropie, Lat: Latenzen, LSP: Lichtschienprojektion, mfg: mittlere Frequenz, MWR: Makulawallreflex, n: nasal, n. d.: nicht durchgeführt, nk: nicht kooperativ, Ny: Nystagmus, o: oben, OD: rechtes Auge, ONH: optic nerve head (Papille), opB: ohne pathologischen Befund, OS: linkes Auge, OU: beide Augen, PE: Pigmentepithel, PE-A: Pigmentepithelatrophy, PE-V: Pigmentepithelumschichtungen / -verschiebungen, pho: photopisch, RAPD: relativer afferenter Pupillendefekt RP: Retinitis pigmentosa, rs: randscharf, sc: ohne Korrektur, sko: skotopisch, MHP: Makulahypoplasmie, t: temporal, u: unten, vt: vital, 2-FP: 2-Farbenschwellenperimetrie

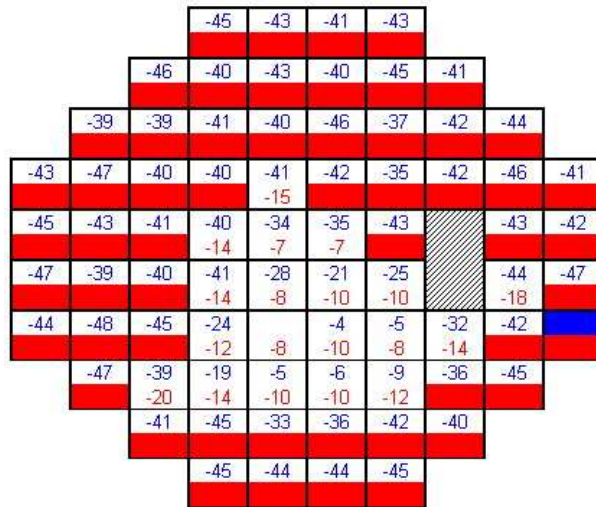


Abbildung 14: 2-Farbschwellenperimetrie des rechten Auges für Patient 78.01 vom 27.5.1998

Die Zahlen geben die Empfindlichkeitserluste [dB] gegenüber dem Normwert für das jeweilige Feld an. Blaue Felder und Zahlen geben die Stäbchenfunktion wieder. Rote Felder und Zahlen geben die Zapfenfunktion wieder. Ausgefüllte Felder beschreiben Meßpunkte, die unter der Nachweisgrenze liegen.

8 Anhang

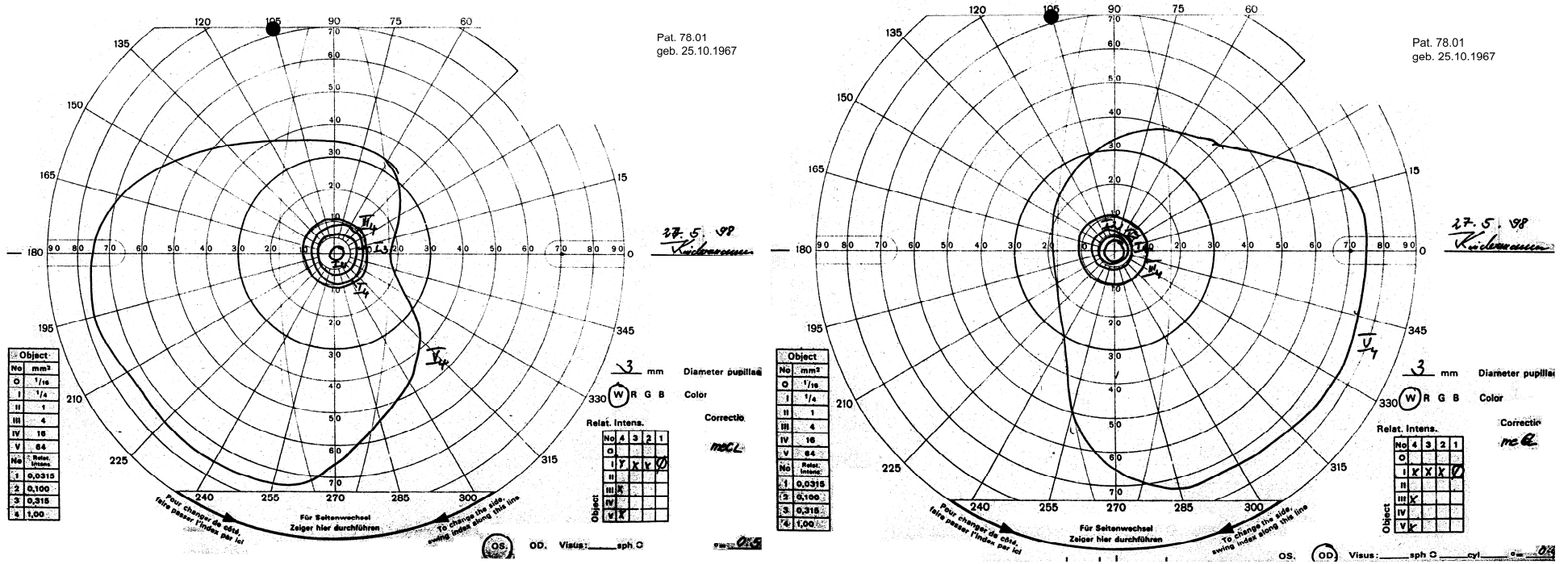


Abbildung 15: Gesichtsfeld Patient 78.01 vom 27.5.1998

8.2 Klinische Daten des Patienten mit Mutationen im *LRAT*-Gen

DNA Geburtsdag Diagnose Konsultation	Gesichtsfeld Goldmann Skot. Perimetrie Phot. Perimetrie	Nystagmus Dunkeladaptation Photophobie Pupillenreaktion	Anomaloskop Ishihara Ishikawa Panel D15	Blitz-VEP Muster VEP Ganzfeld-ERG multifokales ERG EOG	Skiaskopie Visus Ferne Visus Nähe	Autofluoreszenz	OCT	Fundus
0293.1 29.12.1934 RP 17.06.1999	Außengren. opB, OS>OD großes Skotom ob. Hemis. subjektiv GF↓	seit 20 J. Dunkel- adaptation↓ Photophobie	n.d..	ausgepr. Zapfendysf., moder. Säbchendysf.	OD +4,5/-1,5/180 OS +4,75/-1,0/170 OD cc 0,6 OS cc 0,4	n.d..	n.d..	OU ONH blass, exzentr. Excav., rs MAK trocken, PE-A um große Gef- Bögen, Knochen- bälkchen, feine kräuselige PE-V., NH anlieg.

cc: mit Korrektur, Gef: Gefäße, GF: Gesichtsfeld, n.d.: nicht durchgeführt, MAK: Makula, NH: Netzhaut, OD: rechtes Auge, ONH: optic nerve head (Papille), OP: oszillatorische Potentiale, opB: ohne pathologischen Befund, OS: linkes Auge, OU: beide Augen, PE-A: Pigmentepithelatrophie, PE-V: Pigmentepithelumschichtungen/ -verschiebungen, RP: Retinitis pigmentosa, rs: randscharf

8.3 Klinische Daten der Patienten mit Mutationen im *RDH5*-Gen

DNA Geburtsjahr Diagnose	Konsultation	Gesichtsfeld Goldmann Skot. Perimetrie Phot. Perimetrie	Nystagmus Dunkeladaptation Photophobie Pupillenreaktion	Anomaloskop Ishihara Ishikawa Panel D15	Blitz-VEP Muster VEP Ganzfeld-ERG multifokales ERG EOG	Skioskopie Visus Ferne Visus Nähe	Auto- fluoreszenz	OCT	Fundus
0494.1 10.01.1992 Fundus albipunctat.	18.10.1999	siehe Abb. 16	Dunkeladaptation↓	OU opB	sko OD niedrig-norm. Amp OS Restpot. OU Maximalantw. a-Welle niedr.norm. Amp, b-Welle red. Amp, anged.neg. Wellenform pho Flicker-/Einzelbli.: normal OP: niedr.norm. Amp	OU +1,0, kein Ast. Visus Ferne: OD sc 1,0 p OS sc 0,9 Visus Nähe: OD sc 0,9 OS sc 0,8	n.d.	n.d..	ONH: rs, MAK: MWR +, OD>OS zentrale PE-V, vermehrte Granulierung, nasal Depigmentierg.,
	02.11.2000	siehe Abb. 17	n.d..	desat. OD eine Verwechslung i.d. Deutanachse	sko deutl. red. Antwort pho mäßige red. Antwort	OD sc 1,0, p OS sc 0,9 OU 1,0	n.d..	n.d..	ONH rs, phys. exkaviert, PE-Verklumpg. i.d. MAK, mittl. Periph. fleckige PE- Aufhellungen m. feiner Granulierung, dünne Arteriolen
	02.03.2006	n.d.	n.d.	OU opB	n.d.	OU psc 1,2	stark ver- mindert	n.d..	OU ONH rs, weißl. Flecken peripher, PE-Aufhellungen (nicht zw. Gefäß-arkaden) Salz-Pfeffer-Aspect, Gef nicht skleros., Fundus albipunctatus
1162.1 04.07.1983 Fundus albipunctat.	19.05.2004	opB	Dunkeladaptation↓	oB	n.d..	OD cc 0,9 OS cc 1,0	n.d.	n.d..	ONH rs, zentr. excav. Gef, Arterien disk. eng MAK: MWR -, FVR neg Multipl. kleinfleckige, weißl. gräul. Veränd., kleinscheckiges Fundusbild
1785.1 1976	2004	IV/4e normale Außengren.,	kein Ny subj. Dunkel-	n.d..	Jeweils n. 40min. u. n. 24h Dunkeladaptat.:	OD +2.50-.50x165° OS +1.50-2,75x25°	nicht nachweisb.	n.d..	ONH opB, Gef opB Periph. weiße, tiefliegen-

8 Anhang

DNA Geburtstag Diagnose	Konsultation	Gesichtsfeld Goldmann Skot. Perimetrie Phot. Perimetrie	Nystagmus Dunkeladaptation Photophobie Pupillenreaktion	Anomaloskop Ishihara Ishikawa Panel D15	Blitz-VEP Muster VEP Ganzfeld-ERG multifokales ERG EOG	Skioskopie Visus Ferne Visus Nähe	Auto- fluoreszenz	OCT	Fundus
Fundus albipunctat.		keine GF- Defekte	adaptation↓ Dunkeladaptation- schwelle normal Dunkeladaptometr.m. Goldmann-Weekers: triphasische Adaptati- onskurve		ERG Stäbchenantw. Konfi- guration, Latenzen, Ampl. normal, Verbesserung. d. Ampl. n. 24h Dunkeladapt. um 19% ERG gemischte Antw.: leichte Mind. Ampl. und verl. Latenzen 30Hz-Fl.: path. Zapfenantw., verl. Latenz- zeit multifokales ERG: subnorm. Werte	OU ec 1,0			de, fast linear arrangierte weiße Flecken

Amp: Amplitude, Ast.: Astigmatismus, cc: mit Korrektur, ec: eigene Korrektur, EOG: Elektrookulogramm, ERG: Elektroretinogramm, FVR: Fovealreflex, Gef: Gefäße, GF: Gesichtsfeld, MAK: Makula, MWR: Makulawallreflex, n: nasal, n.d.: nicht durchgeführt, Ny: Nystagmus, o: oben, OD: rechtes Auge, ONH: Papille des N. opticus, opB: ohne pathologischen Befund, OS: linkes Auge, OU: beide Augen, PE: retinales Pigmentepithel, PE-V: Pigmentepithelverschiebung, pho: photopisch, red.: reduziert, rs: randscharf, sc: ohne Korrektur, sko: skotopisch, t: temporal, u: unten

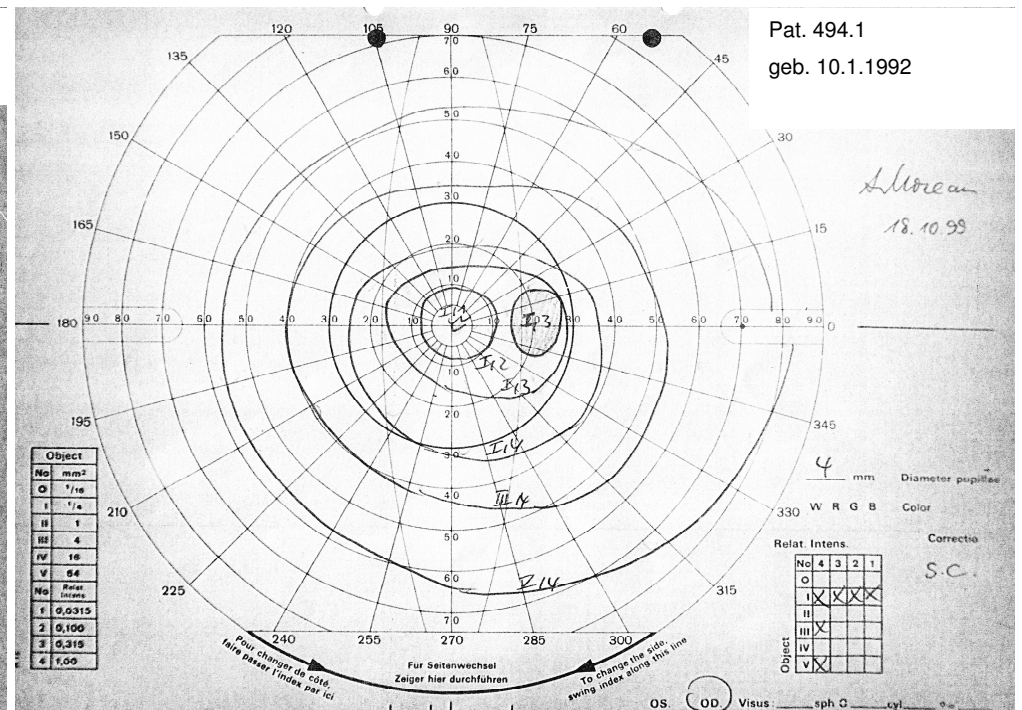
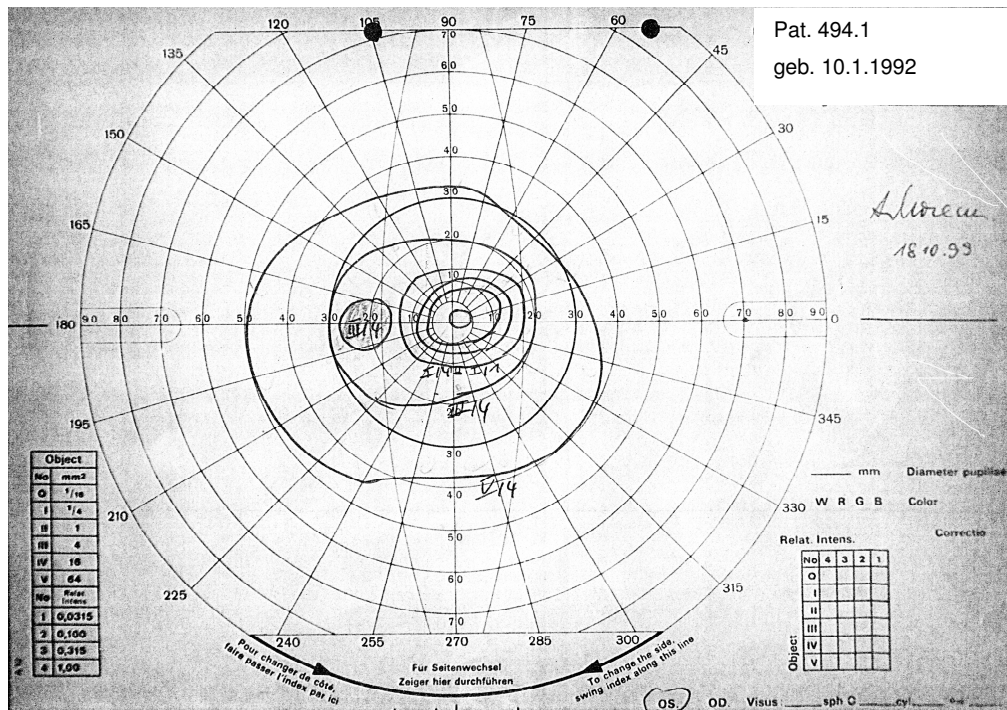


Abbildung 16: Gesichtsfeld Pat. 494.1 vom 18.10.1999

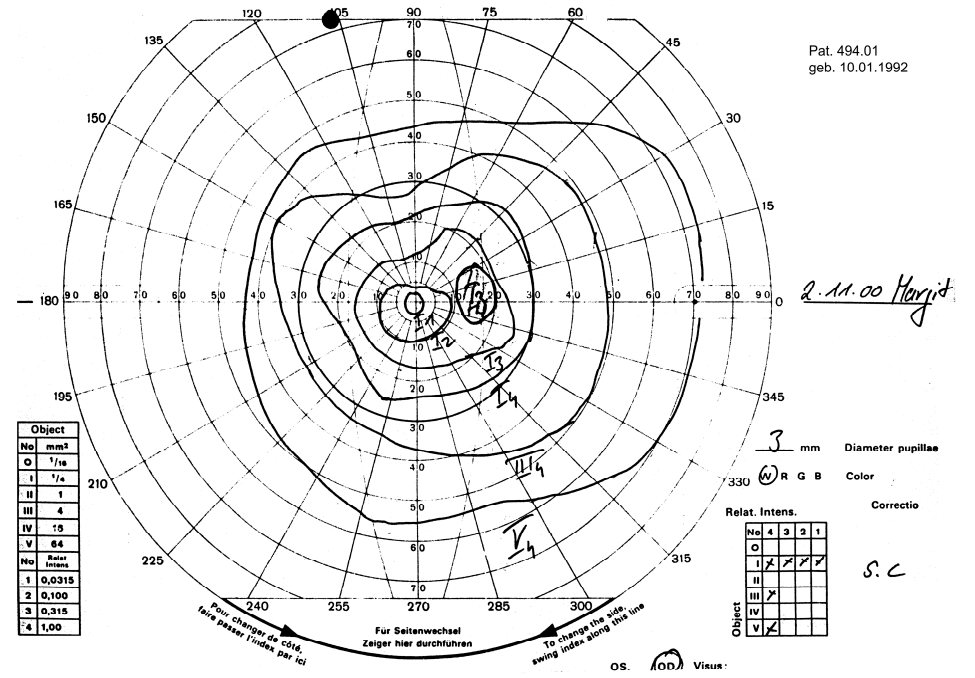
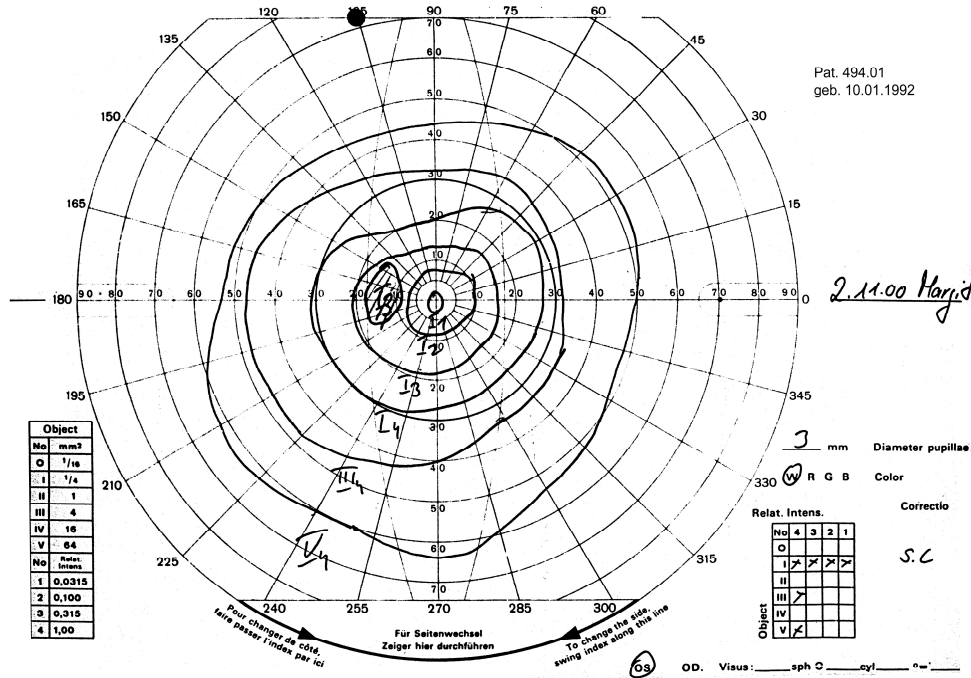


Abbildung 17: Gesichtsfelder Patient 494.01 vom 2.11.2000

9 Abkürzungsverzeichnis

9.1 Allgemein

°C	Grad Celsius
μ	Mikro
μl	Mikroliter
abs.	absolut
AF	Autofluoreszenz
Amp	Amplitude
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARAT	11-cis Acyl CoA Retinol Acyl Transferase
AtRAL	all-trans retinal
AtRE	all-trans retinyl ester
AtROL	all-trans retinol
bp	Basenpaare
Ca	Calcium
CCC	Cambridge-Crowding-Cards
cGMP	zyklisches 3'5'-Guanosin-Monophosphat
Cl	Chlor...
cm	Zentimeter
CRALBP	Cellular Retinaldehyde-Binding Protein
CRBP	cellular retinol binding protein
CRBP-II	zelluläre Retinolbindeprotein II
CSNB	congenital stationary night blindness
dATP, ddATP	desoxy-, dideoxy Adenosintriphosphat
dCTP, ddCTP	desoxy-, dideoxy Cytidintriphosphat
del	Deletion
dGTP, ddGTP	desoxy-, dideoxy Guanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinacid
dTTP, ddTTP	desoxy-, dideoxy Thymidintriphosphat
EBP50	ERM (ezrin, radixin, mosin) binding phosphoprotein 50
ec	eigene Korrektur
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

EOSRD	Early-onset severe retinal dystrophy
ERG	Elektroretinographie
EtOH	Ethanol
FA	Fundus albipunctatus
FD	Fundus
FZ	Fingerzählen
Gbn	Gläser bessern nicht
GCAP	Guanylyl-cyclase-aktivierende Protein
GDP	Guanosindiphosphat
Gef.	Gefäße
GF	Gesichtsfeld
GK	Glaskörper
GNAT	Transducin α -Untereinheit
GNB	Transducin β -Untereinheit
GNG	Transducin γ -Untereinheit
GTP	Guanosintriphosphat
HBW	Handbewegungen
hfq	hochfrequent
HP	Hypopigmentierung
Hy	Hypermetropie
IRBP	interstitial retinoid-binding protein
IVS	intervening sequence
K	Kalium
n.d..	nicht durchgeführt
KZH	Kopfzwangshaltung
Lat.	Latenzen
LCA	Leber'sche kongenitale Amaurose
Lea	Lea-Cards
LRAT	Lecithin-Retinol-Acyltransferase
lrPCR	long range-PCR
LSP	Lichtscheinprojektion
M	Molar
MAK	Makula
mfq	mittelfrequent
mg	Milligramm
MHP	Makulahypoplasie

min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
MWR	Makulawallreflex
Na	Natrium
na	nasal
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
nfq	niederfrequent
ng	Nanogramm
nk	nicht kooperativ
nm	Nanometer
NMD	nonsense-mediated decay
Ny	Nystagmus
o	oben
OCT	optical coherence tomography
OD	rechtes Auge
ONH	Papille des N. opticus
OP	oszillatorische Potentiale
opB	ohne pathologischen Befund
OS	linkes Auge
OU	beide Augen
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDEA, PDEB, PDEG	Phosphodiesterasen vom Typ A, B, G
PE	retinales Pigmentepithel
PE-A	Pigmentepithelatrophie
PE-V	Pigmentepithelverschiebung
pH	Abkürzung für Potenz und Maß für Wasserstoffionenkonzentration
pho	photopisch
PLT	Preferential Looking Test
pmol	Pikomol
RAL	Retinal
RAPD	relativer afferenter Pupillendefekt
RBP	Retinolbindeprotein

RCD	Stäbchen-Zapfen Dystrophie
RDH	Retinoldehydrogenase
RDH12	Retinoldehydrogenase 12
RDH5	11-cis-Retinoldehydrogenase
RE	Retinylester
REH	all-trans retinyl ester hydrolase
RetGC-1	retinale Guanylatzyklase
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RHO	Rhodopsin
ROL	Retinol
RP	Retinitis pigmentosa
RPGR	Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator
RPE	retinales Pigmentepithel
RPE65	retinal pigment epithelium-specific 65-kDa protein
rs	randscharf
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
skot	skotopisch
SRBP	serum retinol-binding protein
SSCP	Single-Strand-Conformation-Polymorphismus
SWFL	Swinging-Flash-Light-Test
TAC	Teller Acuity Cards
Taq	Thermus aquaticus
TE	Tris-EDTA
te	temporal
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u	unten
4-HNE	4-Hydroxynonenal
vt	vital

9.2 Aminosäuren

Ala (A)	Alanin
Arg (R)	Arginin
Asn (N)	Asparagin
Asp (D)	Asparaginsäure
Cyc (C)	Cystein
Gln (Q)	Glutamin
Glu (E)	Glutaminsäure
Gly (G)	Glycin
His (H)	Histidin
Ile (I)	Isoleucin
Leu (L)	Leucin
Lys (K)	Lysin
Met (M)	Methionin
Phe (F)	Phenylalanin
Pro (P)	Prolin
Ser (S)	Serin
Ter (X)	Stop
Thr (T)	Threonin
Trp (W)	Tryptophan
Tyr (Y)	Tyrosin
Val (V)	Valin

10 Lebenslauf

persönliche Angaben:

Christoph Gerd Eckstein
Kümmersbuch 15
92256 Hahnbach
geb. am 30.11.1981 in Amberg

persönlicher Werdegang:

1988-1994: Grund- und Hauptschule Hahnbach

1994-1998: Realschule Sulzbach-Rosenberg

1998: mittlere Reife

1998-2001: Ausbildung zum Steuerfachangestellten in Amberg

2001-2003: Besuch der Staatl. Berufsoberschule Scheyern

2003: Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

2003-2005: Medizinstudium an der Universität Ulm

2005: Physikum

2005-2009: Medizinstudium in Regensburg

2009: zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

seit 04/2006: Doktorarbeit in der Abteilung für Kinderophthalmologie, Strabismologie und Ophthalmogenetik des Klinikums der Universität Regensburg b. Fr. Prof. Dr. Lorenz, Thema: „Genotyp/Phänotyp Korrelation bei Patienten mit Mutationen in Genen des Retinolzyklus“

11 Danksagungen

Mein besonderer Dank geht an Frau Prof. Dr. med. Birgit Lorenz für die Aufgabenstellung und die Bereitstellung der Labortechnik.

Ganz herzlich möchte ich Herrn Dr. rer. medic. Dipl.-Biol. Markus Preising für die geduldige und wohlwollende Betreuung dieser Arbeit und seine Hilfestellung in der Laborarbeit, der Auswertung der Ergebnisse und der Datenerhebung danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern des molekulargenetischen Labors der Abteilung für Pädiatrische Ophthalmologie, Strabismologie und Ophthalmogenetik, besonders Frau Renate Foeckler, Frau Dagmar Glatz und Herrn Bodo Jahnke, für ihre Mitarbeit und stete Hilfsbereitschaft.