

**AUS DER ABTEILUNG FÜR PÄDIATRISCHE OPHTHALMOLOGIE,
STRABISMOLOGIE UND OPHTHALMOGENETIK**

LEITERIN: *Professor Dr. med. Birgit Lorenz*

Der Medizinischen Fakultät

Der Universität Regensburg

**Molekulargenetische Untersuchungen zur Expression von
Sequenzveränderungen im *REP-1*-Gen bei heterozygoten
Trägerinnen**

**Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin**

**der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg**

vorgelegt von Mario Willer
aus Landshut

2008

Dekan: Professor Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter: Professor Dr. med. Birgit Lorenz

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Februar 2009

2. Berichterstatter: Professor Dr. Peter Oefner

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Februar 2009

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1. Chorioideremie	6
1.2. Biochemische Eigenschaften und Funktionen des REP-1 Gens	13
1.3. Mutationen im <i>REP-1</i> Gen	16
1.4. Die Lyon-Hypothese (Lyonisierung)	17
1.5. Aufgabenstellung	19
2. Material & Methoden	20
2.1. Material	20
2.1.1. Patienten	20
2.1.2. Geräte und Zubehör	21
2.1.3. Chemikalien	22
2.1.4. Kits	24
2.1.5. Puffer und Lösungen	24
2.2. Methoden	26
2.2.1. Isolation, Immortalisierung und Kultivierung von Lymphoblastoidzellen	26
2.2.1.1. Transformationsprozess	26
2.2.1.1.1. Lymphozytenisolation	27
2.2.1.1.2. Aufarbeitung des infektiösen Epstein-Barr Virus (EBV)	27
2.2.1.1.3. Transformation	28
2.2.1.2. Fütterung der Kulturen	28
2.2.1.3. Einfrieren der Kulturen	28
2.2.1.4. Anzucht eingefrorener Zellen	28
2.2.2. Isolation von Einzelzellen aus Lymphozytenzellkulturen	29
2.2.3. Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	29
2.2.3.1. Qiagen Onestep RT-PCR	33
2.2.3.2. Gradienten RT-PCR	35
2.2.4. Agarosegelelektrophorese	37
2.2.5. ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit	39
2.2.5.1. Vorbereiten des PCR-Templates für die Primer-Extension	42
2.2.5.2. Vorbereiten der Kontrollreaktionen	43
2.2.5.3. Primerextension	44
2.2.5.4. Post-Extension Treatment	45
2.2.5.5. Detektion der Extended Primer-Fragmente mit dem ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer	45
3. Ergebnisse	46
3.1. Das Picken von Lymphoblastoid-Einzelzellen	46
3.2. Gradienten RT-PCR	46
3.3. ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit	47
3.3.1. Untersuchte Mutationen	48
3.3.2. Verdünnungsreihe PCR-Templates	49
3.3.3. Fragmentanalyse	53
4. Diskussion	56
4.1. Prüfung der Methode des ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit	56
4.2. Untersuchung auf Inaktivierung mit dem ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit	57
5. Zusammenfassung	60
6. Literaturverzeichnis	62
6.1. Referenzen	62

6.2.	Internetreferenzen	67
7.	Danksagung	68
8.	Curriculum vitae	69

1. Einleitung

1.1. Chorioideremie

Chorioideremie (CHM) (syn. tapetochoroidale Dystrophie, progressive chorioretinale Degeneration, vollständige diffuse choroidale Gefäßatrophie) ist eine langsam fortschreitende X-chromosomal rezessiv vererbte Augenkrankheit mit sukzessivem Verlust der peripheren Sehkraft^{20,38}. CHM entsteht durch mangelhafte Prenylierung von Rab-Proteinen in der Netzhaut (Retina) und dem retinalen Pigmentepithel (RPE) als Folge von Mutationen im *REP-1*-Gen⁵³. Charakteristisch für die Krankheit ist die progressive und unabhängige Degeneration der Photorezeptoren, des retinalen Pigmentepithels (RPE) und der Choriokapillaren (CHC). Behandlungsmöglichkeiten dieser Erkrankung gibt es derzeit nicht. Die Inzidenz der Fälle liegt bei 1 zu 100. 000.
16,63

Bei CHM handelt es sich um eine biochemische Funktionsstörung. Im Verlauf der Krankheit werden keine normalen Genprodukte mehr hergestellt. Frauen sind Konduktorinnen. Bei ihnen entsteht ein geflecktes Muster in der Peripherie der Netzhaut als Folge der Lyonisierung (siehe 1.4.) und der klonalen Abstammung aus einer einzelnen Zelle.³²

Bei Männern bestehen anfangs Veränderungen der hinteren und äquatorialen Areale des Fundus in Form einer Pigment-Tüpfelung und feiner Atrophie des Pigmentepithels. Um die Papille herum und in den äquatorialen Anteilen treten fokale Atrophien der Choriokapillaren und der größeren Gefäße der Aderhaut (Choroidea) auf. Bei weiterem Fortschreiten beginnt die Atrophie des RPE, des Choroids und der Retina in der mittleren Peripherie und breitet sich nach zentral aus und von der Papille nach außen. Die Makula bleibt langfristig ausgespart. Im noch weiter fortgeschrittenen Stadium nach der 4. Dekade atrophieren die restlichen Gefäße des Choroids innerhalb der Makula und im Endstadium wird in der Funduskopie die Sklera in Bereichen mit kompletter Dystrophie der CHC und des RPE sichtbar.

17,20,21,29,38,40,55

Phänotypische Merkmale und ihre Darstellung in der klinischen Untersuchung:

17,20,21,29,40

- Mit dem Ophthalmoskop wird in der *Funduskopie* der Augenhintergrund (Fundus) dargestellt. Die Funduskopie erlaubt eine Beurteilung der Netzhaut, des retinalen Pigmentepithels (RPE), sowie der Gefäße der Retina und gegebenenfalls der Choroidea. Man erkennt bei betroffenen Männern feingranuläre Hyperpigmentierungen des RPE. Im Verlauf entstehen fleckförmige, unscharf begrenzte chorioatrophische Areale in der Peripherie. Diese Areale konfluieren und schreiten nach zentral fort bis zur völligen Aderhautatrophie mit Erblindung im höheren Lebensalter (Fig. 1, 2).

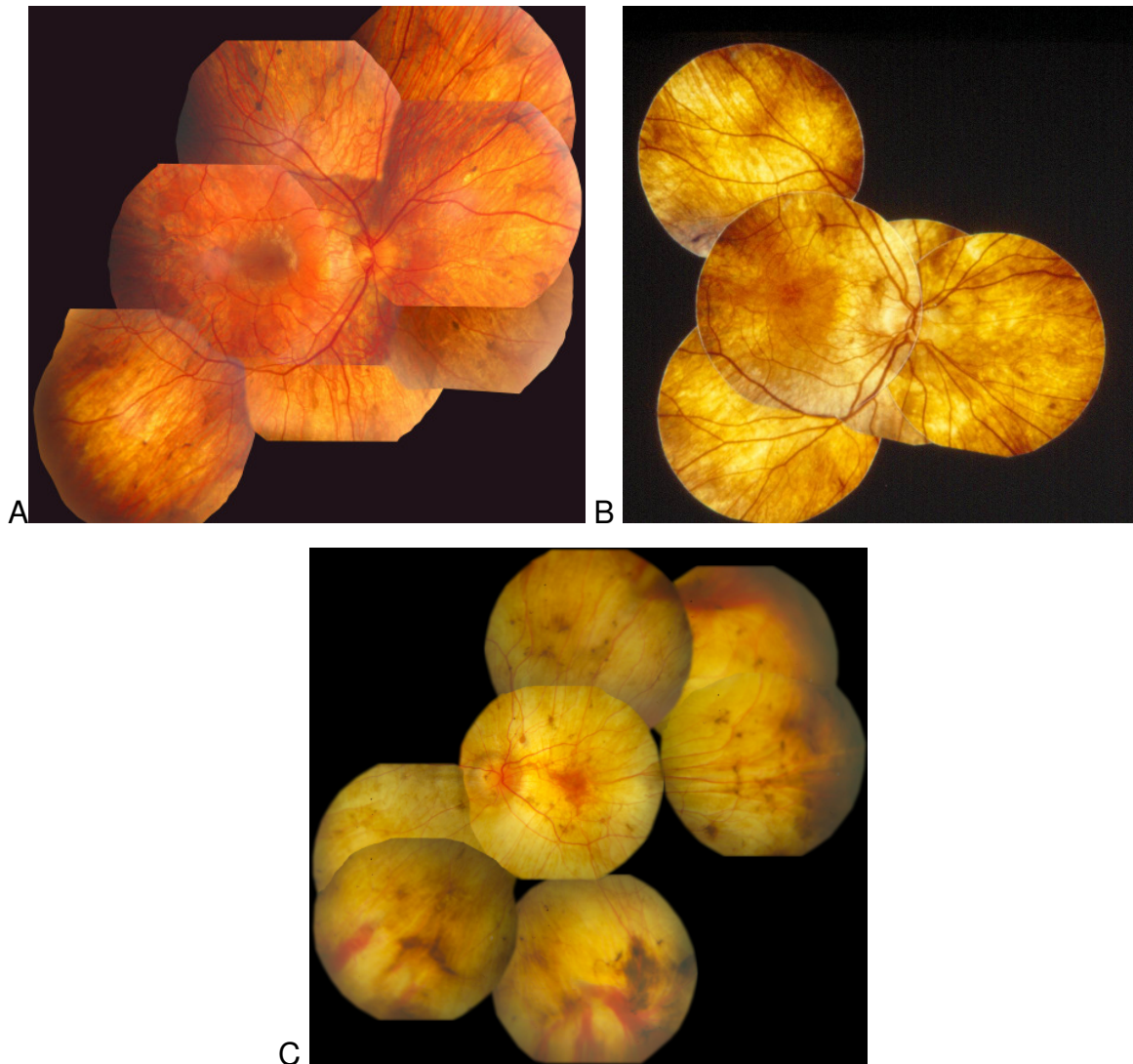


Abb. 1: Diese **Fundusphotographien von männlichen CHM Patienten** in verschiedenen Altersstufen zeigen unterschiedliche weit fortgeschrittene Atrophien des RPE und des Choroids. A: 19 Jahre. B: 32 Jahre. C: 44 Jahre; Das fleckenförmige Muster zeigt sich durch dunkle Areale, in denen das Pigmentepithel noch vorhanden ist und hellere Areale, in denen das Pigmentepithel atrophiert ist

und die Aderhaut zu erkennen ist. Es besteht keine klare Abgrenzung zwischen den betroffenen und den weniger betroffenen Arealen. Bei Patient C sind große Teile des RPE und der choroidalen Gefäße zerstört und lassen Bereiche mit bloßem Auge die Sklera erkennen. (mit freundlicher Genehmigung von Frau Prof. B. Lorenz)

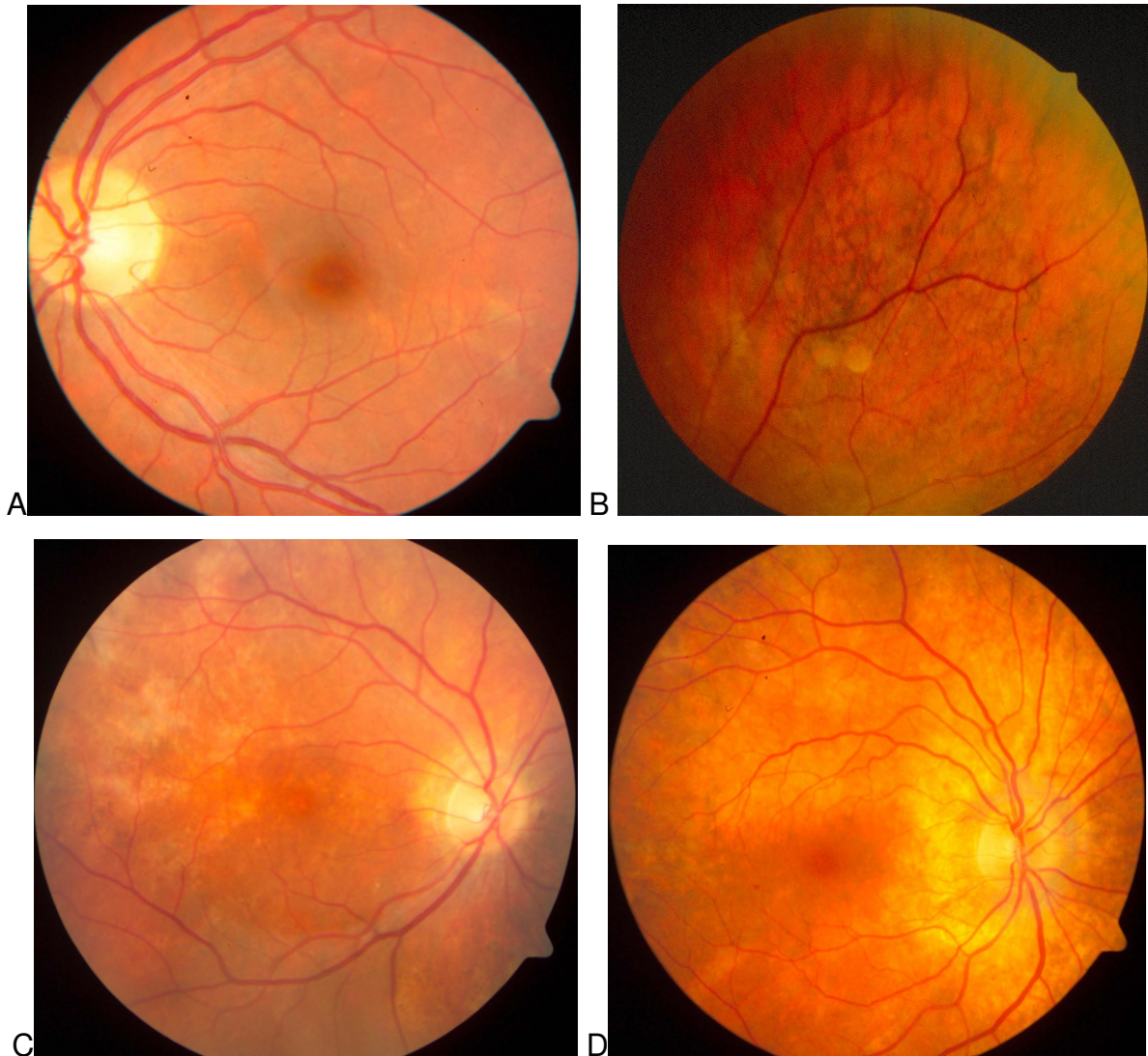


Abb. 2: Fundusphotographien typischer CHM Konduktorinnen: A: 33 Jahre (DNA 716). B: peripherer Fundus einer Konduktorin im Alter von 41 Jahren (DNA 238), C: zentraler Fundus, Konduktorin im Alter von 47 Jahren (DNA1182), D: 54 Jahre (DNA 1363) (mit freundlicher Genehmigung von Frau Prof. B. Lorenz)

- Die *Fundusautofluoreszenz* ist eine Untersuchung des Augenhintergrundes beruhend auf der Autofluoreszenz, d.h. es können Veränderungen des retinalen Pigmentepithels ohne Gabe von Farbstoff sichtbar gemacht werden. Bei CHM kann der zunächst fleckförmige Ausfall des retinalen Pigmentepithels nachgewiesen werden (Fig. 3).

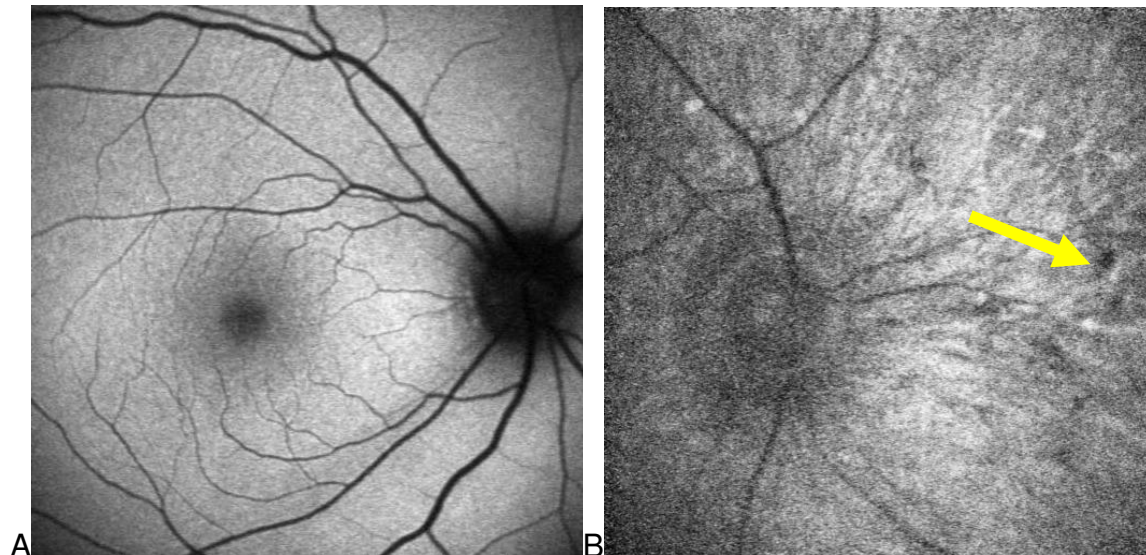


Abb. 3: Fundusautofluoreszenz. Bild A stellt eine Person mit gesundem Fundus dar. Vergleichsweise kann man den fleckförmigen Ausfall des RPE (siehe gelber Pfeil) bei einem 40 jährigen CHM-Patienten in Bild B erkennen, (mit freundlicher Genehmigung von Frau Prof. B. Lorenz)

- Die *Fluorescein-Angiographie* dient der Darstellung der Gefäßsysteme der Retina und der Choroidea durch intravenöse Injektion eines Farbstoffes unter Einsatz einer Fototechnik mit spezifisch gefiltertem Licht. Verwendete Farbstoffe sind Fluorescein-Natrium oder Indocyaningrün. Mit dieser Untersuchungsmethode kann bereits in einem frühen Stadium der zunächst fleckförmigen Ausfalls des RPE und der Choriokapillaren mit diffuser Hyperfluoreszenz und später Hypofluoreszenz in Arealen mit choroidaler Atrophie nachgewiesen werden. Die Gefäße der Retina zeigen meist keine Auffälligkeit (Fig. 4).

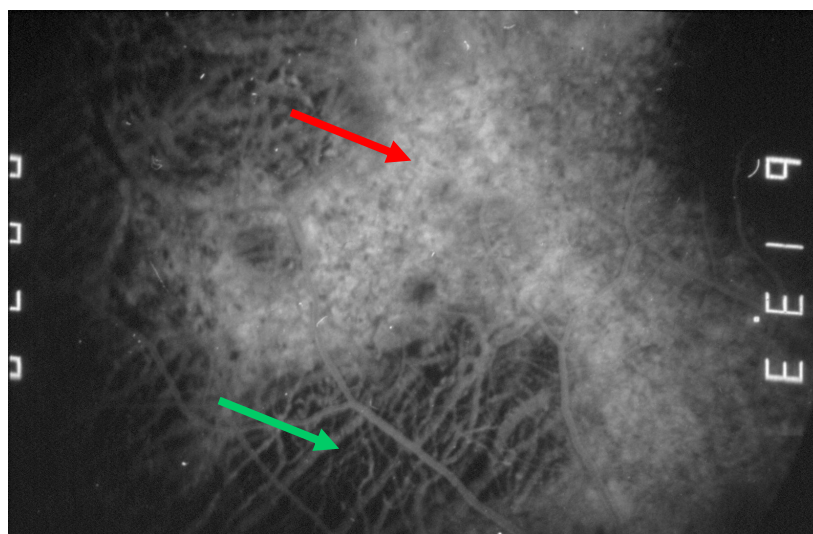


Abb. 4: Diese **Fluorescein-Angiographie** eines 19 Jahre alten männlichen CHM-Patienten zeigt temporal der Papille einen hyperfluoreszenten Bereich (siehe roter Pfeil) mit intakten Choriokapillaren

und Hypofluoreszenz in Bereichen mit Atrophie des RPE (siehe grüner Pfeil) und der Choriokapillaren. Einige große choroidale Gefäße bleiben unberührt. Retinale Gefäße sind geringfügig vermindert. (mit freundlicher Genehmigung von Frau Prof. B. Lorenz)

Funktionsdiagnostik: ¹⁷

Der Visus und das Farbensehen sind erst in Spätstadien stark beeinträchtigt, da die Makula lange erhalten bleibt.

Das Gesichtsfeld zeigt mittelperiphere Skotome und progrediente konzentrische Einengung.

Im Ganzfeld Elektroretinogramm (ERG) erkennt man, dass anfangs stäbchenabhängige Antworten stärker reduziert oder sogar außerhalb der Nachweisgrenze sind, als zapfenabhängige Antworten. Dadurch lassen sich auch die ersten klinischen Symptome der Nachtblindheit erklären.

Mit der Elektrookulographie (EOG) werden entweder die Bewegung der Augen oder Veränderungen des Ruhepotentials der Netzhaut gemessen. In beiden Fällen wird die elektrische Spannung gemessen, die zwischen zwei Elektroden auftritt, die links und rechts (oder oberhalb und unterhalb) des Auges auf der Haut angebracht sind. Das Ruhepotential ist ein ständig bestehender elektrischer Spannungsunterschied zwischen Vorder- und Rückseite der Netzhaut, der dazu führt, dass die Hornhaut negativ und die Rückseite des Augapfels positiv geladen sind. Für die Messung von Veränderungen des Ruhepotentials wird der Patient gebeten, regelmäßig zwischen zwei festen Punkten hin und her zu schauen. Bei konstantem Ruhepotential würde bei jedem Blickrichtungswechsel der gleiche Spannungswechsel gemessen. Ändert sich die Beleuchtungssituation, so ändert sich jedoch das Ruhepotential und somit die Größe der bei den Blickrichtungswechseln gemessenen Spannungswechsel. Bei einer typischen klinischen Untersuchung wird zunächst untersucht, wie sich das Ruhepotential nach Ausschalten der Beleuchtung verändert (Dunkeladaptation). Üblicherweise findet man dabei einen leichten Abfall des Ruhepotentials über mehrere Minuten. Anschließend wird der Patient wieder einem Licht ausgesetzt, was normalerweise zu einem vorübergehenden starken Anstieg des Ruhepotentials führt, der ebenfalls einige Minuten dauert. Veränderungen gegenüber diesem typischen Verlauf sind ein Indiz für eine Erkrankung des Pigmentepithels der Netzhaut. Die *Elektrookulogramm* (EOG) -Auswertung über diesen ARDEN Ratio ist bei CHM durch die Degeneration des RPE früh stark reduziert bis erloschen.

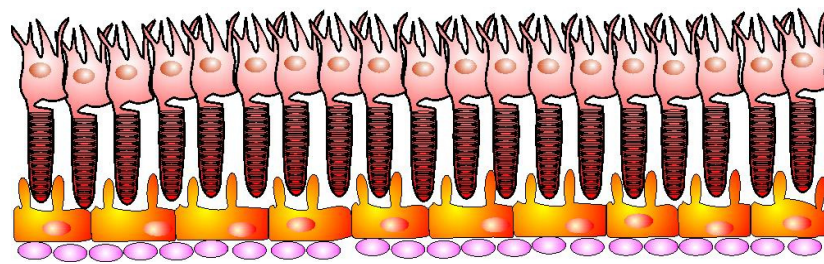
Biochemie/Genetik:

Bei Männern ist der Nachweis des Fehlens von *REP-1* in Lymphozyten möglich³⁰.

Histologie:

In histologischen Präparaten sind die Atrophie der Photorezeptoren, des retinalen Pigmentepithels und letztendlich der Choroidea zu sehen (Fig. 5)⁵³.

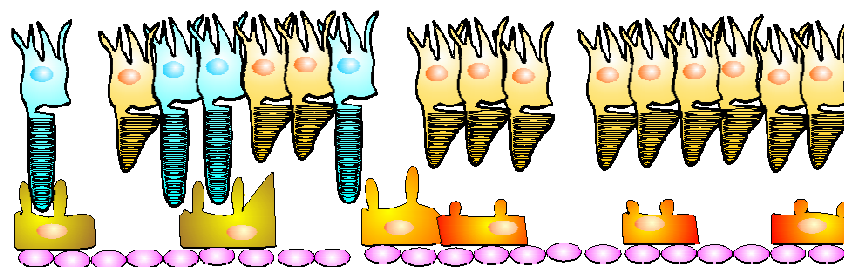
Abb. 5: Schemata der Netzhauthistologie bei Chorioideremie



A: Beispiel für einen intakten Teil der Netzhaut in der Peripherie, bestehend aus vorwiegend stäbchenförmigen Photorezeptoren, RPE und der Choroidea.



B: Totale Atrophie der Photorezeptoren und des RPE bis auf die Choroidea bei einem männlichen Patienten mit Chorioideremie.



C: Beispiel eines Gewebedefektes eines mit CHM betroffenen Mannes im Bereich der Makula. In der Makula ist im Verhältnis die Zahl der zapfenförmigen Photorezeptoren erhöht. Da bei CHM die stäbchenförmigen Photorezeptoren degenerieren, bleibt die Makula auch im fortgeschrittenen Stadium erhalten. Teile des RPE sind atrophiert, die Choroidea ist intakt.



stäbchenförmige Photorezeptoren



zapfenförmige Photorezeptoren



RPE



Choroidea

Legende zu Abbildung 5 A-C

Differenzialdiagnostik:

Im Frühstadium ist eine Abgrenzung zur X-chromosomalen Retinitis pigmentosa (XLRP) notwendig, wobei die Untersuchung der Mütter hilfreich ist. Bei XLRP stellt sich die Fundusautofluoreszenz mit strahlenförmigen Ausfällen dar ⁶⁵, der Fundus bei CHM weist punkt- bzw. fleckenförmige Ausfälle auf ⁶⁴ (Preising et al in Vorbereitung).

Im Spätstadium ist eine Abgrenzung zum autosomal-rezessiv erblichen Stoffwechseldefekt Atrophia gyrata (GA) leicht möglich. Da bei CHM keine Hyperornithinämie auftritt, schafft eine Messung der Ornithin Aminotransferase Aktivität im Plasma oder in Hautproben Klarheit. Klinisch tritt zudem bei der GA eine stärkere Myopie auf. GA beginnt im höheren Alter und wird autosomal-rezessiv vererbt, zeigt jedoch eine fast gleiche klinische Manifestation der Krankheit in der Funduskopie.

Bei der Rötelnretinopathie ist keine peripapilläre oder äquatoriale Atrophie zu erkennen.

Hemizygoter Männer klagen in der ersten oder zweiten Lebensdekade über Nachtblindheit, gefolgt von progredienten Gesichtsfeldausfällen, verminderter Sehschärfe und geringer Myopie. Bis zum Alter von 40-50 Jahren zeigt die Mehrheit der untersuchten Patienten mit CHM ein gutes zentrales Sehvermögen. Im höheren Alter kommt es zu einer zunehmenden Verminderung der Sehschärfe und des zentralen Sehvermögens. ^{17,21,29,40}

Heterozygote Frauen (Konduktorinnen) weisen im Allgemeinen ein subjektiv asymptomatisches Krankheitsbild auf, zeigen aber deutliche Veränderungen im Fundus in Form einer mottenfraß-ähnlichen Pigmentveränderung in der Peripherie. Die feingranuläre Hyperpigmentierung und manchmal Atrophie des RPE deuten auf einen Gendefekt eines X-chromosomalen Gens hin. Die pathologischen Befunde bei Konduktorinnen lassen sich dadurch erklären, dass die im Mosaik vorliegenden Zellen mit einem aktiven mutierten Allel ausreichen eine Funktionsstörung hervorzurufen. Das mosaikartige Muster der Netzhautpigmentierung kann auf die zufallsbedingte Inaktivierung des X-Chromosoms zurückgeführt werden (= Lyonisierung; siehe 1.4.) ²⁸. CHM kann bei einigen Frauen im höheren Alter zu Nachtblindheit, Photophobie oder gelegentlich zur Einschränkung des Sehfeldes

führen. Es wurde auch von Frauen berichtet, die im vollen Ausmaße von CHM betroffen waren.²¹ Stark ausgeprägte Befunde bei Konduktorinnen sind möglicherweise darauf zurückzuführen, dass überwiegend das X-Chromosom mit dem Wildtyp-Allel inaktiviert wurde. Das heißt, dass die unterschiedlichen Ausprägungsformen keine Progression darstellen, sondern individuelle Entwicklungsschritte sind, die bei jeder Konduktorin anders verlaufen können^{15,17,21,29,40,53}.

1.2. Biochemische Eigenschaften und Funktionen des REP-1 Gens

Rab Proteine sind kleine GTP-bindende Proteine mit einer molekularen Masse von 21-25 kDa, die für den intrazellulären Verkehr auf exozytotischen und endozytotischen Bahnen in eukaryotischen Zellen eine wichtige Schlüsselrolle spielen^{1,39}. In Zellen kommen mehr als 30 verschiedene Rabs vor. Sie sind in zwei Bereichen zu finden: in einem kleinen zytosolischen Bereich, in dem sie an den GTP Dissoziation Inhibitor (GDI) gekoppelt sind und in einem großen membranbegrenzten Bereich. Bei Bewegungen durch die zellulären Kompartimente, dem intrazellulären Verkehr, werden die Transportvesikel, Melanosomen, Endosomen und Lysosomen von Rab Proteinen begleitet, um ihr entsprechendes Zellorganell finden zu können²⁴. Rab Proteine werden an die Kompartiment –oder Vesikel Membran durch Geranyl-Geranyl-Gruppen angeheftet, eine feste und zugleich reversible Bindung an biologischen Membranen. Diese zwei hydrophoben C₂₀-Geranyl-Geranyl-Isoprenlipide werden in einer posttranslatorischen Prenylierung auf zwei carboxy-terminale Cysteine des Rab Proteins durch die Rab-Geranyl-Geranyl-Transferase 2 (Rab-GGTase2) übertragen, was essentiell für die Aktivität im intrazellulär vesikulären Verkehr und den Verbund zur intrazellulären Membran ist^{3,45,46,48-50,56}. Die Rab-GGTase2 besteht aus mehreren Untereinheiten; eine Komponente B, einem katalytischen α/β Heterodimer (α :60-kDa; β :38-kDa)^{5,24,48}, einer akzessorischen Komponente A, das RAB Escort Protein 1 (*REP-1*)^{5,24,30,44,47} und das autosomale Homolog *REP-2*, welches auf Proteinebene zu 75% identisch zu *REP-1* ist^{10,10,24,44}. Die Rab-GGTase2 ist einzigartig unter den bekannten Prenyltransferasen, da es selber keine Reaktion katalysieren kann, sondern auf die Anwesenheit von *REP-1*, ein 95-kDa Protein, angewiesen ist^{9,24,39,50}. Das *REP-1* bindet an neu synthetisierte

nicht prenylierte Rab Proteine, präsentiert diese der katalytischen Komponente B der Rab GGT-ase und die Geranylgeranylgruppe wird auf einen oder zwei Cysteinreste übertragen, die mittels einer Thioether-Bindung kovalent gebunden werden^{2,4,36,45,50,56}. Rab Proteine werden nach dieser Di-Geranylgeranylierung durch die Bindung von GTP gegen GDP mittels des Guanin Austauschfaktors (GEF) aktiviert und dann bis zu einer vorherbestimmten Kompartiment- oder Membranbindestelle von *REP-1* begleitet, welches hier als GTP Dissoziation Inhibitor (GDI) dient^{3,45,49}. Es verhindert, dass sich GTP durch Austausch mit GDP vom Rab Protein trennt und hält das Rab Protein im Zyklus zwischen Zytosol und Membran in Lösung. Nachdem das Rab Protein mit seiner Akzeptormembran verschmolzen ist, wird GTP wieder zu GDP hydrolysiert. Durch den Rab GDP Dissoziation Inhibitor wird Rab von der Membran gelöst und kehrt zu seiner Ausgangsmembran zurück wo es seinen Zyklus vervollständigt. Durch Verlust der *REP-1*-Funktion durch Mutationen bei CHM-Patienten sammelt sich im Zytosol eine signifikant hohe Menge von unprenylierten Rab27 Proteinen an^{45,49}.

Dieser Verlust der *REP-1* Funktion kann größtenteils durch das homologe *REP-2* Gen ausgeglichen werden d.h. *REP-2* kann funktionell *REP-1* in der Geranylgeranylierung von Rab-Proteinen ersetzen. Der Organismus kann somit über mehrere Gene verfügen, welche dieselbe Funktion ausüben (= Genredundanz)^{18,48,49}. Überraschenderweise geschieht diese Kompensation im Auge nicht vollständig, da *REP-2* eine geringere Affinität zu *Rab 27* hat, welches in größerer Menge im RPE und in den Choriokapillaren vorhanden ist⁴⁹. Rab Proteine (v. a. *Rab 27a*), die essentiell auf *REP-1* in der Geranylgeranylierung angewiesen sind, werden nicht prenyliert. Wahrscheinlich kommt es durch diese Störung des intrazellulären Verkehrs in Zellen der Choriokapillaren und des RPE zu der progressiven chorioretinalen Degeneration mit Folge der Erkrankung an CHM.^{3,19,22,24,44,49,56}

CHM entsteht somit aufgrund von Mutationen im *REP-1* Gen. Es ist ein X-gebundenes Gen, welches in der Region Xq21.1-21.2 lokalisiert ist⁵⁵. Es kodiert ein Protein mit 653 Aminosäuren^{11,33,58,59}. Das Gen besteht aus 15 Exons mit einer Größe zwischen 64 Nukleotiden für Exon 11 und 3,4 kb für Exon 15. Seine genomische Sequenz umfasst 150 kb mit einer Durchschnittsgröße der Introns von 10 kb.^{44,58}

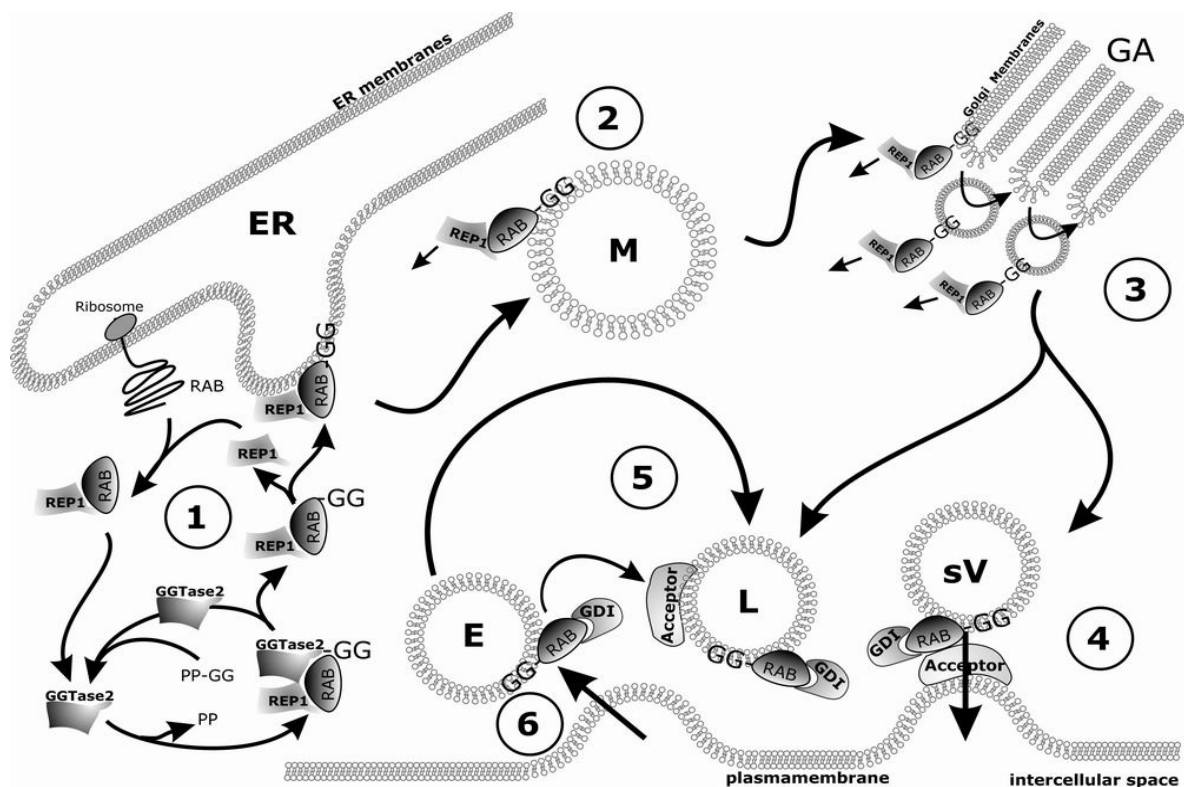


Abb. 6: Geranylgeranylierung von Rab Proteinen (1), unter Einsatz des *REP-1* als Kofaktor der Rab-GGTase2. Geranylisierte Rab Proteine werden von *REP-1* bis zu ihrer vorherbestimmten Zielmembran begleitet. *REP-1* fungiert als GTP Dissoziation Inhibitor (GDI) im ersten Zyklus der Rab Aktivität. Bei weiteren Zyklen werden die Rab-Proteine zur Aktivierung an die GDI gebunden, um eine kontrollierte GTP Hydrolyse zu erreichen. Rab Proteine werden benötigt, um ER-Mikrosomen zum Golgiapparat zu begleiten (2), für die kontrollierte Knospung und Fusion der Golgi Vesikel im Golgi Apparat (3). Für die Fusion der sekretorischen Vesikel mit der Plasmamembran (4), sowie den Endosomen zu Lysosomen (5), und ebenso der Knospung der Endosomen von der Plasmamembran (6). Auch die Bewegung der Lysosomen innerhalb der Zelle wird von Rab-Proteinen gesteuert. Nach der Beförderung des Rab Proteins zu seiner Akzeptorstelle auf der Zielmembran tritt *REP-1* wieder in einen neuen Rab-Geranylisierungszyklus ein.

ER: Endoplasmatisches Retikulum; M: Mikrosomen; GA: Golgi Apparat; sV: sekretorische Vesikel; L: Lysosomen; E: Endosomen; PP-GG: Geranylphosphate; -GG: Geranylrest; GDI: GTP Dissoziations Inhibitor. Mit freundlicher Genehmigung von Dr. M. Preising.³⁷

1.3. Mutationen im *REP-1* Gen

Eine Reihe molekulargenetischer Untersuchungen hat 70 Mutationen auf dem CHM-*REP-1* Gen nachgewiesen. All diese Mutationen führen zur Synthese eines verkürzten oder degenerierten Polypeptids und somit zu einem vollständigen Verlust an Funktion (Null Mutationen) ^{41,42,44,57,61}. Bis heute sind Deletionen mehrerer Kilobasenpaare bis hin zu einzelnen Basenpaaren, Insertionen mehrerer Basenpaare, sowie Punktmutationen in Form von Transitionen und Transversionen, die zu Splice-Site-, Frameshift- und Nonsense-Mutationen im *REP-1* führen, bekannt ³¹. Missense Mutation, bei denen eine Aminosäure im Genprodukt gegen eine andere ausgetauscht wurde und dadurch nur zu teilweisem Funktionsverlust führen, wurden bislang nicht berichtet ^{12,51}. Interessanterweise konnte bei einem Drittel europäischer CHM Patienten, die nachweislich eine X-gebundene CHM haben, keine Mutation gefunden werden. ^{32,34,43,57,58,60}

Eine Übersicht ist im Internet auf den Seiten: *Retina International Scientific Newsletter Mutation Database Mutations of the Rab Escort Protein1* (<http://www.retina-international.org/sci-news/repmut.htm>), *HGMD® home page* (www.hgmd.org) und *HGVS-Human Genome Variation Society* (www.genomic.unimelb.edu.au/mdi/) zu finden.

Die Mehrheit der Mutationen im *REP-1* Gen sind Transitionen und Transversionen (>42%). Da *REP-1* einen recht geringen GC-Gehalt aufweist, entstehen dadurch leicht vorzeitige Stopcodon Mutationen (TAG, TAA, TGA) ^{32,52}.

Deletionen auf dem *REP-1* Gen treten in verschiedenen Größenordnungen auf. Sie reichen von kompletten Deletionen (ca. 4 %), über Deletionen von einigen Kilobasen bis zu mehreren Exons (ca. 9 %), bis zu Deletionen von weniger als 5 Basenpaaren (< 28 %). Es gibt jedoch keine klare Beziehung zwischen der Größe und der Lage der Bruchstellen von Deletionen und der klinischen CHM Ausprägung ^{32,51,60}.

In den Exons 5-14 wurden Punktmutationen und kleine Insertionen bzw. Deletionen nachgewiesen. Durch Frameshiftmutationen (Leserasterverschiebungen) nach Deletionen, Insertionen oder Splicingfehlern auf der distalen Seite der Mutation wird die Aminosäuresequenz verändert ⁵², wodurch vorzeitige Stopcodons entstehen können ⁵¹. Diese führen zu einem kompletten Verlust der mRNA des Allels mit der

Mutation. Wird ein Protein aus dem mutierten Allel gebildet, so wird es am C-terminalen Ende abgeschnitten. Das *REP-1* Protein, das die 70 C-terminalen Aminosäuren benötigt, um das Rab Protein der Geranylgeranylierung zu zuführen, kann nicht als Untereinheit der GGTase fungieren. Frameshift –und Nonsense Mutationen, die weniger als 70 C-terminale Aminosäuren entfernen, führen nicht zu einem Funktionsverlust des *REP-1* Gens, d.h. dass Mutationen im Exon 15 nicht zu CHM führen. In Exon 1-4 sind bislang keine Mutationen beschrieben worden. ^{51,60}

1.4. Die Lyon-Hypothese (Lyonisierung)

Die Lyon-Hypothese ^{14,28,51,55} besagt, dass in weiblichen somatischen Zellen eines der beiden X-Chromosomen nach einem Zufallsprinzip in der frühen embryonalen Entwicklung inaktiviert wird ¹⁴. Die statistische Verteilung liegt bei 1:1. Bei 10-15 % der Frauen kommt es zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes.

Das inaktivierte X-Chromosom stammt entweder aus der väterlichen (X_p) oder der mütterlichen (X_m) Linie.

Nur eines der doppelt vorhandenen X-Chromosomen ist genetisch aktiv (X_a) und dieses ist für die Funktion einer Zelle ausreichend. Das andere Gonosom ist inaktiv (X_i) und liegt in heterochromatischer Form vor. Es kann als Sexchromatin (Barr Bodies) dargestellt werden.

Gene auf dem distalen Teil des kurzen und des langen Armes des X_i , die so genannte pseudoautosomale Hauptregion (PAR1) ⁵¹, entgehen der X-Inaktivierung und werden sowohl vom aktiven (X_a) als auch vom inaktiven (X_i) Chromosom exprimiert. Außerhalb der PAR1-Region sind auf dem X- und Y Chromosom homologe Gene, die ebenfalls der X-Inaktivierung entgehen.

In verschiedenen Zellen des gleichen Individuums kann entweder X_m oder X_p inaktiv sein d.h. es entsteht ein Mosaik ⁵¹ durch genetisch unterschiedliche Zelllinien die von einer Ursprungszelle abstammen. Die Inaktivierung des X-Chromosoms geht vom XiST-Gen aus, wobei das Allel des X_i exprimiert werden kann.

Der Ablauf der Inaktivierung des X-Chromosoms: In der Oogenese wird vor Beginn der Meiose das inaktive X-Chromosom reaktiviert. Beide X-Chromosomen sind in der frühen weiblichen XX-Zygote wieder aktiv. Jedoch am 12. - 16. Tag der

frühen Embryogenese, im Stadium der späten Blastozyste, erfolgt eine randomisierte Inaktivierung des väterlichen oder des mütterlichen X-Chromosoms. Dieses Inaktivierungsmuster wird von der Stammzelle an alle Tochterzellen weitergegeben und bleibt stabil. Heterozygote Frauen weisen somit ein genetisches Mosaik auf d.h. es kommt zu einer unterschiedlichen Zusammensetzung von Nachkommen einer Ursprungszelle, in der entweder väterliche oder mütterliche X-Chromosomen inaktiviert sind.⁵¹

Häufig wird bei pathologischen Veränderungen des X-Chromosoms wie z.B. bei einem Isochromosom der langen Arme, einem Ringchromosom oder einer Deletion, beobachtet, dass dieses inaktiviert wird und das nicht betroffene, normale X-Chromosom aktiv bleibt. Für diese Ausnahme der zufallsbedingten Inaktivierung gibt es zwei Hypothesen:

- aktive, unbetroffene X-Chromosomen haben einen Selektionsvorteil, denn inaktive X-Chromosomen sind genetisch unbalanciert und haben dadurch möglicherweise eine geringere Teilungsrate.
- abnorme X-Chromosomen werden gezielt inaktiviert.

Andererseits wurde bei Translokationsträgern eine Inaktivierung des normalen X-Chromosoms berichtet. Man unterscheidet:

- balancierte reziproke Translokationen mit 46 Chromosomen, die praktisch alle vom X-autosomalen Typ sind
- Translokationen mit 46 Chromosomen und einer unbalancierten X-autosomalen oder X/X- Translokation
- Translokationen mit 45 Chromosomen und einer unbalancierten X-autosomalen Translokation

Im Regelfall heißt dies für die Konduktorinnen, dass das nicht betroffene, Wildtyp X-Chromosom aktiv bleibt und das X-Chromosom mit vorhandener Mutation inaktiviert wird. Durch die Fälle, in denen es zu einer Inaktivierung des gesunden X-Chromosoms kommt wird CHM, je nach Aktivitätsgrad des X-Chromosoms mit Mutation, unterschiedlich stark exprimiert.

Entgegen der anfänglich angenommenen Lyon-Hypothese²⁸ konnte von Carrel et al. festgestellt werden, dass die Inaktivierung eines der X-Chromosoms nicht vollständig

vonstatten geht. Gene können dieser Inaktivierung entkommen und werden sowohl vom aktiven X-Chromosom (X_a) und als auch vom inaktivierten X-Chromosom (X_i) exprimiert. Die Restaktivität von X_i drückt sich klinisch im Phänotyp aus, die Expression von X_a ist um diesen Anteil reduziert.

In Carrels Untersuchung zur Expression von humanen X-gebundenen Genen wurden Polymorphismen aus Zelllinien von Frauen untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass das *REP-1* Gen ebenso durch X_i exprimiert wurde.^{7,8}

1.5. Aufgabenstellung

Ziel der molekulargenetischen Untersuchung war es zu zeigen, mit welcher Verteilungshäufigkeit eine Trägerin für eine Sequenzvariation im *REP-1* Gen das Wildtyp-Allel bzw. das veränderte Allel des *REP-1* in Lymphoblastoidzelllinien exprimiert. Dazu wurden von Frauen mit bekannter *REP-1*-Sequenzveränderung EBV-transformierte Lymphoblastoidzellen isoliert und mittels Einzelzell-PCR und ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit die Expression des veränderten Allels in Einzelzellen untersucht. Für unseren Ansatz wurden drei verschiedene Formen pathologischer Punktmutationen verwendet (Deletion, Insertion, Nonsense-Mutation). Als Grundlage für die Hypothese dienten die Untersuchungen von Carrel et al.⁸, die mit benignen Missense-Mutationen (Polymorphismen) gearbeitet hatte. Um die möglichen Unterschiede zu diesen Untersuchungen erfassen zu können wurden zusätzlich zwei Trägerinnen für eine benigne Missense-Mutation untersucht.

2. Material & Methoden

2.1. Material

2.1.1. Patienten

In drei Familien mit CHM-Patienten aufgrund einer *REP-1*-Sequenzveränderung, wurde von Konduktorinnen Lymphozytenzellkulturen aus Blutproben etabliert. Zusätzlich wurden Lymphozytenzellkulturen aus Blutproben von zwei Frauen etabliert, die einen Polymorphismus im Exon 15 hatten.

Zellkulturen	Nukleotidänderung	Effekt	Exon
716.1	c.581del14bp	D184fsX9	5
617.3	c.838C>T	R270X	6
673.1	c.1168ins50bp	Q380fsX46	8
38.2	c.1833C>A	D601S	15
38.4	c.1833C>A	D601S	15

Tabelle 1: Patientengut und ihre Mutationen

Bei Konduktorin 716.1 wurde eine Deletion von 14 Basenpaaren in Exon 5 nachgewiesen. Konduktorin 617.3 hatte eine Punktmutation in Form eines Basenaustausches von Cytosin gegen Thymin in Exon 6. Konduktorin 673.1 wies eine Insertion von 50 Basenpaaren in Exon 8 auf. Die Mutationen dieser drei Konduktorinnen führten zu einem vorzeitigen Stopcodon (= Nullmutation). Durch diesen Funktionsverlust des *REP-1* Gens kommt es zu einer Veränderung des Phänotyps im Sinne einer CHM. Anders jedoch wirkte sich der Basenaustausch von Cytosin gegen Adenosin in Exon 15 bei den Probandinnen 38.2 und 38.4 aus. Wie schon in Kapitel 1.3 besprochen führt diese Missensemutation nicht zu einer pathogenen Veränderung des Proteins (= Polymorphismus) und damit nicht zur CHM. Folglich kann bei den Probandinnen kein Vorteil durch die Expression des Wildtyp-Alleles erzielt werden. Probandinnen 38.2 und 38.4 wurden in die Untersuchung eingeschlossen um eine Abhängigkeit von der Mutationswirkung auf die Lyonisation bewerten zu können.

2.1.2. Geräte und Zubehör

Gerät	Typ	Hersteller
ABI PRISM Genetic Analyser	3100 avant, POP4 polymer, Kapillar Array 36 cm; 3100 Data Collection version 1.0; SNP36_POP4 default module	Applied Biosystems, Darmstadt
GenScan software	3.5.	Applied Biosystems, Darmstadt
Akkupipettierer	Pipetus-akku	Hirschmann, Herrenberg
Blockthermostat	QBT2	Grant, Cambridge
CO ₂ -Begasungsbrutschrank	APT Line CB150	WTB Binder, Tuttlingen
Gelelektrophorese-Kammer (horizontal) für Agarose	Sunrise TM120	Biometra Whatman, Göttingen
Photodokumentation		MWG Biotech, Ebersberg
Kühlzentrifuge Rotor	4K15 11150/13350 swing out	Sigma, Osterode
Kühlthermostat	C19	Haake, Karlsruhe
Micropipetten	Reference 2-20 Research 1-10, 2-20, 1-100, 100-1000, 250 - 2500 µl	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop Okulare	CK 2-TR 10x, 20x, Phasenkontrast	Olympus, Hamburg
Schüttelgerät	Vortex-2-gene	Scientific Industries
Sicherheitswerkbank	HS12	Heraeus Instruments, Hanau
Spannungsgerät 1	Power supply PS305T	Biometra Whatman, Göttingen
Tischzentrifuge	Biofuge Fresco	Heraeus Instruments,

Rotor	3765	Hanau
Thermocycler 1	PTC100	MJ Research, Biozym, Preuß. Oldendorf
Thermocycler 2	Cyclone gradient	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
UV-Illuminator	TFX-20-M	MWG Biotech, Ebersberg
Waage	Basic-Plus BP1200	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	1003	GFL, Burgwedel

Tabelle 2

2.1.3. Chemikalien

Reagenzien	Summen- formel	Bestell-Nr.	Hersteller
Agarose, Biozym LE Agarose			Biozym, Hess. Oldendorf
Borsäure, p.A.	H ₃ BO ₃	1.00165	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau Indikator	C ₁₉ H ₁₀ Br ₂ Cl ₂ O ₅ S	103022	Merck, Darmstadt
Cyclosporin A Ansatz von 1 ml (= 50 mg) /25 ml RPMI1640 (als Aliquots zu 1 ml abfüllen = 2 mg/ml Stammlösung) (Sandimmun)		3123. 00. 00	Sandoz
<u>D</u> imethyl <u>s</u> ulfo <u>x</u> id (DMSO) z.S.	C ₂ H ₆ OS	802912	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat- Dodecahydrat	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	1.06579	Merck, Darmstadt
DMSO		2951	Merck, Darmstadt
<u>E</u> thylendinitril <u>o</u> tetra <u>e</u> ssigsäure-	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈	112029	Merck, Darmstadt

Dinatrium-Dihydrat (EDTA) für Mikrobiologie Titriplex, p.A.	x 2 H ₂ O		
Ethidiumbromid p. A, (1 %-Lösung in H ₂ O) für die Elektrophorese	C ₂₁ H ₂₀ BrN ₃	111608	Merck, Darmstadt
Fetales Kälberserum Gold (FKS)		A15-649	PAA
GeneRuler DNALadderMix (100-10000 bp)		SM0331	MBI Fermentas, St, Leon-Roth
GeneScan-120-LIZ™ size standard		4324211	Applied Biosystems, Darmstadt
Glycerin		4094	Merck, Darmstadt
Go Taq DNA Polymerase (5 U/ µl)		18657913	Promega, Mannheim
Hi-Di™ Formamid		4311320	Applied Biosystems, Darmstadt
Kaliumchlorid, p.A.	KCl	1.04936	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat, p.A.	KH ₂ PO ₄	1.04873	Merck, Darmstadt
Lymphocyte Separation Medium		3043169	Life Technologies, Paisley, Scotland
L-Glutamin (200 mM)		K0283	Biochrom, Berlin
Magnesiumchlorid wasserfrei z.S.	Cl ₂ Mg	814733	Merck, Darmstadt
Matrix Standard Set	DS-02 [dR110, dRGG, dTAMRA, dROX, LIZ™]		Applied Biosystems, Darmstadt
MEM nicht essentielles Aminosäure-konzentrat (MEM-AS)		M11-003	PAA
Natriumchlorid, p.A.	NaCl	1.06404	Merck, Darmstadt
Penicillin / Streptomycin (10.000		P11-010	PAA

U / 10.000 mg)			
RPMI1640 1640: ohne L-Glutamin, 0,2 g/l HCO_3^-		E15-039	PAA
Sucrose p.A.	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	35579	Serva, Heidelberg
Trichlormethan/Chloroform Rotipura $\geq 99\%$ p.A.	CHCl_3	3313	Roth, Karlsruhe
Tris (hydroxy-methyl)-aminoethan, p.A.	$\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$	1.08382	Merck, Darmstadt
Xylencyanol für die Elektrophorese	$\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{NaO}_6\text{S}_2$	1.10590	Merck, Darmstadt

Tabelle 3

2.1.4. Kits

Kit	Bestell-nummer	Hersteller
Qiagen- Kit: One Step RT-PCR-Kit	210212	Quiagen, Hilden
ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit	4323151	Applied Biosystems, Darmstadt

Tabelle 4

2.1.5. Puffer und Lösungen

- 10-10000 bp DNA-Ladder:

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

- Gel-Ladepuffer:

- 40 % Sucrose
- 0,05 % Bromphenolblau
- 0,05 % Xylencyanol
- in 1x TBE ad 100 ml ddH₂O

-PBS-Puffer (phosphate buffered saline):

- 137 mM (8,18 g / l) NaCl
- 2,6 mM (0,2 g / l) KCl
- 1,4 mM (0,27 g / l) KH₂PO₄
- 8 mM (2,8 g / l) Na₂HPO₄ x 12H₂O
- Ad 1 l ddH₂O pH = 7,4
- autoklaviert

- 10x TBE-Puffer (**T**ris-**B**orat-**E**DTA-Puffer) :

- 1000 mM (121 g / l) Tris
- 830 mM (51,36 g / l) Borsäure
- 10 mM (3,72 g / l) EDTA x 2 H₂O x 2 Na
- ad 1 l ddH₂O; pH = 8
- autoklaviert

- 1x TE-Puffer:

- 10 mM (1,211 g / l) Tris
- 5 mM (1,86 g / l) EDTA
- ad 1 l ddH₂O
- pH = 8
- autoklaviert

- dNTP (1,25 mM):

- 12,5 µl 100 mM dATP
- 12,5 µl 100 mM dCTP
- 12,5 µl 100 mM dTTP
- 12,5 µl 100 mM dGTP
- ad 1 ml mit 1x TE auffüllen und bei -20 °C lagern

2.2. Methoden

2.2.1. Isolation, Immortalisierung und Kultivierung von Lymphoblastoidzellen

Medien:

Tabelle 5: Futtermedium

RPMI1640	FKS [20 %]	MEM AS [100 x]	L-Glutamin [200 mM]	Penicillin [10.000 U] / Streptomycin [10.000 g]
77 ml	20 ml	1 ml	1 ml	2 ml

ad 100 ml

Erstmedium

Futtermedium mit 1µg / ml Cyclosporin A

Tabelle 6: Einfriermedium

RPMI1640	FKS [20 %]	Glycerin	DMSO	L-Glutamin [200 mM]	Penicillin [10.000 U] / Streptomycin [10.000 g]
315 ml	100 ml	25ml	50 ml	3 ml	7 ml

ad 500 ml

2.2.1.1. Transformationsprozess

EBV-Kulturen:

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) ist ein humanpathogenes, behülltes, doppelsträngiges DNA-Virus aus der Gammasubfamilie der Herpesviridae bzw, der Herpetoviridae. Erstmals beschrieben wurde es 1964 von Sir Michael Anthony Epstein und Yvonne M. Barr. Sie entdeckten EBV in B-Zell-Linien, die von afrikanischen Patienten mit Burkitt-Lymphom stammten. ²⁶

Durch EBV infizierte B-Lymphoblastoide werden "immortalisiert". Ohne Bildung neuer Viren werden die B-Zellen durch die persistierende Infektion zu lymphoblastoiden

Zellen transformiert. Diese können in vitro zu fortwährendem Wachstum, von z.B. Patientenpopulationen stimuliert werden.

Isoliert wurde der EBV aus kultivierten B95-8 Zellen aus Marmoset (*Callithrix argentata*, Krallenaffe).²⁶

2.2.1.1.1. Lymphozytenisolation

Von den Blutproben wurden je 10 ml in ein Falcon tube (15 ml) überführt. Danach wurde sie mit RPMI1640 aufgefüllt und beides gemischt. Zwei Falcons (15 ml) beschickte man mit 5 ml Lymphoflot und überschichtete sie vorsichtig mit 7,5 ml der verdünnten Blutproben, ohne dabei die Phasen zu mischen. Die Reaktionsgefäße wurden 40 min bei 306 g mit der Kühlzentrifuge 4K15 zentrifugiert, wobei sich drei Phasen trennten. Die mittlere Phase, welche die Lymphozyten enthielt, wurde vorsichtig mit einer Pipette in einem Volumen von 2,5 ml abgezogen. Die beiden Ansätze wurden vereinigt und mit RPMI1640 auf 14 ml aufgefüllt und für 10 min bei 306 g mit der Kühlzentrifuge 4K15 abzentrifugiert. Der Überstand wurde fast vollständig verworfen und das Pellet erneut in 14 ml RPMI1640 resuspendiert. Die Zentrifugation wurde noch mal für 10 min bei 306 g mit der Kühlzentrifuge 4K15 wiederholt. Insgesamt wurden das Waschen und die Zentrifugation dreimal wiederholt. Danach lag ein reines Pellet aus Lymphozyten vor.

2.2.1.1.2. Aufarbeitung des infektiösen Epstein-Barr Virus (EBV)

Aus der B95-8 Stammkultur entnahm man ausreichend Kulturüberstand mit möglichst wenigen Zellen und zentrifugierte diesen 10 min bei 306 g mit der Kühlzentrifuge 4K15 ab. Der Überstand (konditioniertes Kulturmedium) wurde zweimal durch einen virendurchlässigen, aber zellichten Weißbrandfilter (0,45 µm) filtriert um einen zellfreien Kulturüberstand zu erhalten.

2.2.1.1.3. Transformation

In einem 50 ml Kulturschrägröhrchen suspendierte man ein reines Lymphozytenpellet (aus 2.2.1.1.1.) mit je 1 ml konditioniertem Medium (aus 2.2.1.1.2.) Die Kulturen wurden dann bei 37 °C / 5 % CO₂ mit ventilierendem Deckel über Nacht inkubiert.

2.2.1.2. Fütterung der Kulturen

Am folgenden Tag und jede weitere Woche wurden die Kulturen regelmäßig mit einem speziellen Erstmedium gefüttert. Hierfür wurde 1 ml Erstmedium zugefüttert bis ein Kulturvolumen von 5 ml erreicht wurde. Danach wurde 1 ml Medium gegen Erstmedium ausgetauscht bis die Kulturen ausreichend gewachsen waren. Je nach Wachstum wurde die Kultur in 25 ml (10 ml Volumen) oder 75 ml Kulturflaschen (20 ml Volumen) überführt und das Kulturvolumen erhöht. In den Kulturflaschen wurde Standardfuttermedium eingesetzt.

2.2.1.3. Einfrieren der Kulturen

Kulturen aus einem 75 ml Kulturansatz wurden in je ein 50 ml Falcon tube überführt und 10 min bei 306 g mit der Kühlzentrifuge 4K15 zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 4 ml Einfriermedium resuspendiert. Je 1 ml Suspension wurde in ein 2 ml Cryotube abgefüllt und über Nacht bei -70 °C eingefroren und danach in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.1.4. Anzucht eingefrorener Zellen

Ein Cryotube mit Zellen wurde in 37 °C warmem Wasser aufgetaut. Das Cryotube wusch man mit Alkohol ab und überführte die Suspension in Zentrifugenröhrchen. Danach wurde die Suspension 10 min bei 306 g mit der Kühlzentrifuge 4K15 abzentrifugiert. Das entstandende Pellet wurde in 20 ml Futtermedium resuspendiert

und bei 37 °C / 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Einmal die Woche wurden die Kulturen gefüttert.

2.2.2. Isolation von Einzelzellen aus Lymphozytenzellkulturen

Wichtig bei der Arbeit mit Kulturen war steriles Arbeiten, um eine Kontamination mit Fremd-DNA/RNA zu vermeiden. Aus dem Brutschrank wurden die zu untersuchenden Kulturen entnommen und unter dem Mikroskop (10 x) kontrolliert, ob ausreichend Lymphozyten angewachsen waren.

Mit einem Akkupipettierer und einer abgeflammt Pipette wurden mit einer Pipettenspitze der 5 ml Glaspipette ca. 200 µl Kulturmedium entnommen. Die Probe wurde in eine Zellkulturschale gegeben und 1: 10 mit 1800 µl PBS-Puffer verdünnt.

Unter dem Mikroskop (10 x, 20 x) prüfte man die Dichte der darin befindlichen Lymphozyten. Waren noch zu viele Zellen zu sehen, wurde nochmals 1: 10 mit PBS-Puffer verdünnt bis nur noch einzelne Zellen zu sehen waren. Sauberes und zügiges Arbeiten mit Handschuhen hielt die Zerstörung der RNA durch RNasen in den Lymphozytenkulturen in Grenzen.

Es musste gewährleistet sein, dass die Pipettenspitze nur eine Einzelzelle enthält. Diese wurde in ein gekennzeichnetes PCR-Reaktionsgefäß aus 2.2.3. überführt. Das Ziel war, mit der RNA einer Einzelzelle in den Reaktionsgefäßen eine RT-PCR durchzuführen und dadurch die Expression der verschiedenen Allele des *REP-1* in den Einzelzellen quantifizieren zu können.

2.2.3. Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die **RT-PCR** (engl.: reverse transcription polymerase chain reaction) ^{6,23,27,51} ist eine Methode der Molekularbiologie, um die Genexpression von spezifischen Genen in Zellen, Geweben oder Blutserum nachzuweisen. Dabei wurde mRNA (Messenger RNA= prozessierte RNA-Kopie, die nur die proteinkodierenden und translationssteuernden Bereiche eines Gens enthält ⁵²) mittels einer reversen Transkriptase in cDNA ^{14,54} (engl.: complementary DNA) umgeschrieben (=> reverse Transkription) und danach amplifiziert. Um die Expression eines Genes

nachzuweisen, muss die mRNA untersucht werden. Die RNA in Zellen dient als Bauplan für die Proteinbiosynthese, d. h. die Umsetzung von genetischer Information in Proteine (Translation). Bei der Amplifikation von DNA mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden spezifische DNA-Polymerasen verwendet, welche DNA-abhängig sind, d.h. sie sind nicht in der Lage, RNA zu amplifizieren. Daher wurde zuerst eine Reverse Transkriptase (RT) ^{23,52} eingesetzt, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, mit deren Hilfe RNA in cDNA umgeschrieben werden kann. Diese kann als Matrize sowohl RNA- als auch DNA-Einzelstränge verwenden. Die cDNA konnte im Anschluss als Ausgangsprodukt in einer PCR verwendet werden, um spezifische Sequenzen aus dieser zu amplifizieren. In einer Serie von Zyklen mit drei hintereinander ablaufenden Schritten (Denaturierung, Annealing, Extension) amplifizierte man die cDNA mit $T \cdot E \cdot 2^n$ (T= Ausgangskopienzahl (Template); E= Effizienz; n= Zyklenzahl) exponentiell. ^{14,27,51}. Durch Erhöhung der Temperatur auf 90-95 °C denaturierte der Doppelstrang der DNA / cDNA. Das anschließende Primer-Annealing bzw. Primerhybridisierung ist die Anlagerung eines Oligonukleotids (Primer) an eine DNA-Sequenz, das als Ausgangspunkt für die DNA-Polymerisation dient. Nach raschem Abkühlen auf eine Annealingtemperatur zwischen 50–70 °C, wurden die beiden synthetischen Oligonukleotidprimer zugesetzt, die komplementär der Sequenz der 5'-Enden der beiden Einzelstränge sind und die gesuchte DNA-Region einrahmen. Die optimale Annealingtemperatur liegt in der Regel 5 °C unter der errechneten Schmelztemperatur T_m der Primer. Durch Zusatz einer thermostabilen DNA-Polymerase wurde die DNA in 5'-3'-Richtung unter Verwendung von Desoxynukleotide (dNTPs = dATP, dCTP, dGTP, dTTP) synthetisiert (Extension). Die beiden Einzelstränge wurden zum jeweiligen Doppelstrang komplementiert, so dass zwei Doppelstränge vorhanden sind. Auch bei Temperaturen bis 100 °C können diese DNA-Polymerasen, die aus thermophilen Bakterien stammen, ihre Aktivität beibehalten.

Die Produkte der RT-PCR lassen sich elektrophoretisch in einem Agarosegel auftrennen (siehe 2.2.4.).

Die eingesetzten Reversen Transkriptasen sind veränderte Enzymvarianten aus unterschiedlichen Retroviren, wie der „Moloney Murine Leukemia Virus“ (M-MLV RT) oder „Avian Myeloblastosis Virus“ (AMV RT). Die verschiedenen Varianten des Enzyms sind je nach Hersteller derart modifiziert worden, dass diese höhere

Spezifität oder bessere Erträge generieren können, beispielsweise wird die im Enzym intrinsisch vorkommende RNase H-Aktivität deletiert.^{23,51,52,54}

Wie andere DNA-abhängige DNA- und RNA-Polymerasen benötigt auch eine Reverse Transkriptase ein kurzes DNA-Stück, ein so genannter Primer, zur Initiation der DNA-Synthese in 5'→3'-Richtung. Oftmals wird hier ein modifizierter Oligo-d(T)₂₀-Primer verwendet, der an seinem 3'-Ende verschiedene einzelne Nukleotide (z.B. A, C, G, nicht T) oder ein anderes Dinukleotid (z. B. AC) besitzt. Die Thymin-Basen und das Nukleotid binden sich komplementär zum Poly(A) -Schwanz am 3'-Ende der mRNA. Erst im zweiten Schritt bei der PCR wurden dann zwei Gen-spezifische Oligonukleotidprimer mit einer optimalen Größe zwischen 18-25 Nukleotiden eingesetzt, welche die denaturierte cDNA in 5'→3'- und 3'→5'-Richtung synthetisieren, die dann als doppelsträngige cDNA amplifiziert werden konnte.^{51,52,54}

Das Ziel der PCR-Reaktion ist, eine definierte DNA-Sequenz zu amplifizieren. Dazu wurden Primer eingesetzt (siehe Tabelle 7), die nur an den erwünschten Stellen auf dem Template binden, welche das gewünschte Produkt begrenzen. Dabei ist bei der Herstellung der Primer darauf zu achten, dass repetitive DNA-Sequenzen vermieden werden, sowie eine Reihe weiterer Überlegungen.⁵¹ Es sollten zwischen 40-60% GC-Paare vorhanden sein. Die Schmelztemperatur ($T_m = 2\text{ }^{\circ}\text{C} \times (A + T) + 4\text{ }^{\circ}\text{C} \times (C+G)$) der Primer, die miteinander verwendet werden, sollte sich nicht mehr als 5°C unterscheiden und zum Amplifikationsprodukt nicht mehr als 10°C. Die 3' Sequenz des einen Primers sollte nicht komplementär zu einem Stück des Gegenprimers sein, da die Primer sonst Dimere bilden können. Zu sich selbst komplementäre Sequenzen innerhalb eines Primers größer als 3 Basenpaare sollten vermieden werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden mit Hilfe der Software Vector NTI 7.0 (Invitrogen, Karlsruhe) hergestellt.

Bei einer modifizierten Variante der One-Step RT-PCR, werden direkt Gen-spezifische Primer verwendet und beide Reaktionen werden hintereinander im selben Ansatz ausgeführt. Eine geringere Anzahl an Pipettiereinheiten minimiert die Zahl möglicher Fehler und eine schnelle und einfache Analyse der RNA ist möglich.

Tabelle 7: Sequenzen der eingesetzten Primer

Primer:	Sequenz:	Fragment:
REP-14-15b	GGCTGTAACTGTCTCCATCA AGG	REP-1-RT-Primer Exon 14-15 antisense
REP-14-15a	TCGTCAGACATCAGCAGGAG C	REP-1-RT-Primer Exon 14-15 sense
REP-10-13b	GCAAGTCAAATGAACCAAATA GGTG	REP-RNA Exon 10 bis 13 antisense
REP-10-13a	TGGAGGACAGTTACTTTCCTG AGAA	REP-RNA Exon 10 bis 13 sense
REP7-9b	GCAGAAACACTGGGGGAGTT C	REP-RNA Exon 7 bis 9 antisense
REP7-9a	AAAGACTCAAAAATTAACCCC CAAC	REP-RNA Exon 7 bis 9 sense
REP5-6b	CCTCGAGAATACAGCAGCTTT GAT	REP-1 RNA Exon 5 bis 6 antisense
REP5-6a	GCGATCCAGAGAATGCGCTA	REP-1 RNA Exon 5 bis 6 sense
REP-1-15ub	CAAGTCAATGTGCTTTATAAG TGTTGTG	REP-1 Exon 15 UTR antisense
REP-12ea	CAACAGATTTCCATTTTGACA GTGC	REP-1-Exon12 RCT-PCR Primer
REP-10-15a	GAGAACATGTGCTCACGTGTG CA	REP-1 Exon 10 - 15 mRNA, sense

Eine cDNA ist die doppelsträngige Kopie einer mRNA. Deshalb kann aus dieser anhand des genetischen Codes auch die Aminosäuresequenz eines Proteins abgeleitet werden, für welche diese mRNA kodiert. Da eine mRNA in Eukaryoten nach ihrer Transkription bereits modifiziert und prozessiert wurde, ist sie im Gegensatz zum Gen intron-frei. Darüber hinaus liefert diese cDNA auch Informationen, ob das dazugehörige Gen in verschiedenen Isoformen exprimiert wird, d.h. die mRNA alternativ gespleißt wird⁵¹. Über RT-PCR lässt sich also gezielt Genexpression nachweisen.

2.2.3.1. Qiagen Onestep RT-PCR

Material:

- QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer: gewährleistet eine effektive Reverse Transkription und eine spezifische Amplifikation.
- Q-Solution: erleichtert die Amplifikation schwieriger Templates durch das abwandeln des Schmelzverhaltens von Nukleinsäuren.
- QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix:
 - Omniscript Reverse Transkriptase (RNA>50 ng) und Sensiscript Reverse Transkriptase (RNA<50 ng) sind hitzeempfindliche heterodimere Enzyme, die in E. coli heterolog exprimiert werden. Diese Transkriptasen sind für die reverse Transkription zuständig (siehe unten).
 - HotStar Taq DNA-Polymerase ist eine modifizierte 94 kDa große hitzestabile DNA-Polymerase, die ursprünglich aus hitzebeständigen Bakterien namens *Thermus aquaticus* isoliert worden ist und in E. coli heterolog exprimiert wurde. Funktion der DNA-Polymerase ist die Verlängerung der DNA-Kette mit dNTPs (Nukleotide).
- dNTP Mix, je 10 mM
- Forward Primer (10 pmol / µl) (siehe Tab. 7)
- Reverse Primer (10 pmol / µl) (siehe Tab. 7)
- RNA template (Optimalbereich 1 pg-2 µg RNA)
- Rnase-freies Wasser
- Thermocycler:
 - Reverse Transkription: 30 Min., 50 °C
 - Aktivierung der DNA-Polymerase: Die HotStarTaq DNA-Polymerase wird aktiviert, die Omniscript und Sensiscript Reversen Transkriptasen werden inaktiviert und das cDNA Template denaturiert. Nichtspezifische Primer und Primer-Dimere werden aufgelöst, damit man ein hochspezifisches amplifiziertes PCR-Produkt erhält: 15 Min., 95 °C
 - Reaktionszyklus:
 - Denaturierung: 1 Min., 94 °C
 - Annealing: 1 Min., Temperatur je nach Primern
 - Extension: 1 Min., 72 °C
 - Finale Extension: 10 Min., 72 °C

Mit dem Qiagen Onestep RT-PCR Kit wurde die RNA der Lymphozyten in einem Schritt, ohne eine weitere Reaktion in cDNA umgewandelt (\Rightarrow OneStep RT-PCR) und spezifisch amplifiziert.

Dazu wurde für jede zu untersuchende Zellkultur, nach folgendem Pipettierschema, ein 4facher MasterMix mit 200 μ l vorbereitet und auf 12 Reaktionsgefäße á 15 μ l verteilt.

Tabelle 8: MasterMix Qiagen OneStep RT-PCR

Material	Volumen 1 x [μl]	Volumen 4 x [μl]
RNase freies ddH₂O	31, 5	126
Puffer 5 x	5	20
dNTP-Mix	1	4
Sense Primer	3	12
Antisense Primer	3	12
RT-PCR EnzymMix	1	4
Q-Solution 5 x	5	20
Einzelzelle	ca. 0,5 μ l / Probe	ca. 0,5 μ l / Probe
Gesamtvolumen	50	200

Zu jedem PCR Ansatz mit 10 μ l Volumen gab man je **eine** frisch isolierte Lymphoblastoidzelle (siehe 2. 2. 2.). Wegen der geringen Zahl an Templatekopien in den Einzelzellen, im Vergleich zu einer normalen PCR, wurde die RT-PCR mit 50 Zyklen durchgeführt, um eine genügend große Menge an PCR Produkt zu erhalten. Nach der Amplifikation wurden die Proben für kürzere Lagerung, über Nacht bei 2-8 °C im Kühlschrank und bei längerer Lagerung bei -20 °C im Tiefkühlschrank aufbewahrt.

Vor Gebrauch der Proben überprüfte man die PCR-Produkte aller Reaktionsgefäße auf Größe und Gehalt des spezifischen PCR-Produkts mittels einer

gelelektrophoretischen Auftrennung (siehe 2.2.4.). Dazu wurde 5 µl jeder Probe mit 3 µl Ladepuffer gemischt und auf ein Agarosegel aufgetragen. Zeigten die PCR-Ansätze einzelne Banden in der erwarteten Größe, waren diese Proben verwendbar, Proben die davon abwichen wurden verworfen.

2.2.3.2. Gradienten RT-PCR

Material:

- Thermocycler (Cyclone gradient Peq lab)
- Qiagen Onestep RT-PCR Kit
- Forward Primer (10 pmol / µl) (siehe Tab. 7)
- Reverse Primer (10 pmol / µl) (siehe Tab. 7)
- RNA template (Nr. 0005)

Das Ziel einer **Gradienten-RT-PCR** ist es herauszufinden, bei welcher Annealing-Temperatur es zur maximalen Spezifität der Amplifikation der Zielsequenz (cDNA) mit den eingesetzten Primern kommt. Ein Primerpaar besteht aus einem Forward- oder Senseprimer und einem Reverse- oder Antisenseprimer. Die Annealing-Temperatur beschreibt hierbei die maximale Temperatur, bei welcher sich die Polynukleotidsequenz noch an die komplementäre Sequenz des Templates bindet. Diese sollte ca. 5 °C tiefer sein als die Schmelztemperatur T_m , bei der sich die Oligonukleotidprimer von den DNA-Einzelsträngen lösen.

Bei einer zu niedrigen Temperatur kann es zu unspezifischen Bindungen der Primer kommen und in der Folge unter Umständen zu unerwünschten Nebenprodukten. Bei zu hohen Temperaturen entsteht kein Produkt, da die Schmelztemperatur überschritten wird.

Ein doppelter Mastermix mit 100 µl wurde auf 12 Reaktionsgefäße á 8 µl aufgeteilt, entsprechend den 12 Positionen für den Gradienten im Thermocycler d.h. +/- 6 °C um einen Mittelwert von 60 °C. Dazu gab man je 2 µl einer Kontroll-RNA. Obligatorisch ist genau wie bei der normalen RT-PCR schnelles und sauberes Arbeiten mit Handschuhen. Nach 40 Zyklen RT-PCR im Thermocycler konnten die Proben auf ein Agarosegel aufgetragen und ausgewertet werden (siehe 2.2.4.). Am

Temperaturoptimum des Primerpaars kommt es zur Amplifikation des Genproduktes. Diese Temperatur wurde für die weitere Arbeit mit diesem Primerpaar verwendet.

Tabelle 9: MasterMix Gradienten RT-PCR

Material	Volumen 2 x [µl]
RNase freies H₂O	38
Puffer 5 x	20
dNTP-Mix	4
Sense Primer	6
Antisense Primer	6
RT-PCR EnzymMix	4
Q-Solution 5 x	20
RNA [250 ng]	2
Gesamtvolumen	100

Tabelle 10: Primerpaare und Fragmentgröße

Primerpaare	Fragmentgröße [bp]
REP-10-15a / REP-1-15ub	661
REP-12ea / REP-1-15ub	751
REP5-6a / REP5-6b	238
REP7-9a / REP7-9b	193
REP-10-13a / REP-10-13b	230
REP-14-15a / REP-14-15b	200

2.2.4. Agarosegelelektrophorese

Material:

- Biozym LE Agarose (Biozym, Hess. Oldendorf)
- 1 % Ethidiumbromid
- Elektrophoresepuffer (1 x TBE-Puffer)
- Gel-Ladepuffer

Tabelle 12: Gelkammern für Agarosegelelektrophorese

Kammergröße	Groß	Mittel	Klein
Gelgröße [ml]	250	60	20
1 x TBE-Puffer	2500	800	200
Strom [V]	120	100	80
Zeit [min]	90	75	45
DNA [µl]	8	6	4
Laufstrecke [cm]	3, 5	5, 5	8, 5

Eine **Agarose-Gelelektrophorese** ⁶² ist eine molekularbiologische Methode, um Desoxyribonukleinsäure (DNA) -Stränge nach ihrer Größe zu trennen und ihre Größe durch Vergleich mit Strängen bekannter Größe zu bestimmen. Lange Fäden aus Agarosepolymeren werden engmaschig zu einer Matrix vernetzt in der die zu trennenden Moleküle an ihrer Wanderung durch ein elektrisches Feld behindert werden. Je höher die Agarose (ein Polysaccharid, aus D-Galaktose und 3, 6-Anhydrogalactose, die glycosidisch verbunden sind) konzentriert ist, desto kleiner sind die Poren, die sich in der Matrix befinden. Die Gelelektrophorese funktioniert wie ein Sieb für Moleküle, in dem diese sich je nach Ladung und Größe unterschiedlich schnell bewegen. Nukleinsäuren liegen durch ihre negativ geladenen Phosphatgruppen im Phosphat-Zucker-Rückgrat polar vor. Negativ geladene Moleküle (Anionen) wandern am schnellsten in Richtung der positiv geladenen Anode und positiv geladene Moleküle (Kationen) bewegen sich in Richtung der negativ geladenen Kathode. Ein elektrisches Feld wird verwendet, um die negativ geladenen DNA-Moleküle durch die Gelmatrix zu ziehen, wobei sich die kurzen DNA-Moleküle schneller durch das Gel bewegen können als die großen und somit eine Auftrennung der Stränge nach ihrer Größe ermöglicht wird.

Außerhalb des elektrischen Feldes liegt die DNA als Knäuel vor. Innerhalb desselben wird sie linearisiert, so dass sich der Strang der Nukleinsäure durch die Poren des Filters schlängeln kann.

Ein DNA-Marker (hier: 100 bp ladder) ist eine Mischung verschiedener DNA-Fragmente definierter Länge (hier: Vielfache von 100 Basenpaaren), mit dem die PCR-Produkte verglichen werden, um deren Größe zu bestimmen.

Mit einem Farbmaler, z. B. ein niedermolekularer Farbstoff wie Bromphenol Blau (BPB), kann der Fortschritt der Elektrophorese abgeschätzt werden. Laufstrecken der Farbstoffe BPB ca. 100 bp, CyanCyanol ca. 200 bp.

Herstellung einer 2 % w / v Agaroselösung in TBE: ⁶²

Je nach Gelgröße (250 ml, 60 ml, 20 ml) wog man 2 % w / v Agarose ab (5 g, 1,2 g, 0,4 g), vermengte beides miteinander und wog nochmals das Gesamtgewicht ab. Das Gemenge wurde im Mikrowellenherd aufgeköcht, bis keine Schlieren mehr zu sehen waren und die Lösung klar war. Nochmals wurde das Gewicht ermittelt und die Differenz, die durch Verdunstung entstand, glich man mit ddH₂O aus. Danach gab man 0,5 µl 1 % Ethidiumbromid pro 10 ml Gellösung zu. Die Lösung lies man im Wasserbad auf ca. 42 °C abkühlen und schwenkte stetig den Erlmeierkolben. Ein Gießen des Gels bei höheren Temperaturen, kann zur Verformung des Gelschlittens oder zum Platzen der Kammer führen. Bei 42 °C konnte das Gel in eine waagrecht liegende Gelkammer eingegossen werden und die Kämme wurden in ihre Positionen gesteckt. Wenn das Gel fest geworden ist, wurde es in 1 x TBE Laufpuffer versenkt (ionische Pufferlösung, die über die gesamte Trennzeit und -distanz den pH konstant hält). Danach entfernte man die Kämme.

Auftrennen der DNA-Stränge:

7 µl DNA-Leiter und 5 µl PCR-Produkt wurden mit einer Pipette in jeweils einen Slot pipettiert. Bei farblosen PCR-Produkten mischte man die 5 µl PCR-Produkt mit 3 µl Ladepuffer und pipettierte dieses Gemisch (ca. 8 µl) in den Slot. Je nach Kammergröße verwendete man eine elektrische Spannung von 120, 90 oder 60 Volt, bei einer Stromstärke im Milliamperebereich. Nach Ablauf der vorgegebenen Zeit wurde die Elektrophorese automatisch beendet und die Spannung auf 1 V reduziert.

Nach visueller Kontrolle der Laufstrecke des Farbstoffes Bromphenolblau und des Ladepuffers kann das Programm auch manuell beendet werden.

Das Gel wurde unter einer UV-Lampe ($>2500 \mu\text{W} / \text{cm}^2$, $\lambda = 302 \text{ nm}$) betrachtet werden. Ethidiumbromid, das sich in die DNA eingelagert hat, fluoresziert proportional zur vorhandenen DNA-Konzentration im ultravioletten Licht.

Eigenschaften:

Ethidiumbromid ⁶² (5-Ethyl-3, 8-diamino-6-phenyl-phenanthridiniumbromid) ist ein heterozyklischer, rotbrauner organischer Farbstoff, der sich an die doppelsträngige DNA-Moleküle bindet, indem er sich parallel zwischen zwei benachbarte Basenpaare einlagert (Interkalation). Die Nukleinsäurefragmente können auf dem UV-Illuminator bei 302 nm mit ultraviolettem Licht zur Eigenfluoreszenz gebracht werden. Der angeregte Ethidiumbromid-Nukleinsäure-Komplex emittiert dann ein orange-rotes-Licht im sichtbaren Bereich. Mit abnehmender Größe der Nukleinsäurefragmente nimmt automatisch auch die Intensität der Fluoreszenzstärke ab. Kleine Fragmente und Proben mit geringer Konzentration können nur gering fluoreszierend oder gar nicht dargestellt werden. Auch Einzelstränge lassen sich nur schlecht darstellen, da Ethidiumbromid nicht interkalieren kann.

Ethidiumbromid ist als sehr giftig und reizend eingestuft und wurde daher in die Gefahrenklasse 2 eingeordnet. In Kurzzeittests hat es sich zudem als mutagen und potentiell kanzerogen herausgestellt. Daher sind beim Umgang mit Ethidiumbromid größte Sorgfalt und geeignete Vorsichtsmaßnahmen wie Schutzbrille und Handschuhe indiziert.

2.2.5. ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit

Material:

- SNaPshot Multiplex Control Template (60 μl) : Amplicon von CEPH DNA
- SNaPshot Multiplex Control Primer

Tabelle 13: Zusammensetzung des SNaPshot Multiplex Control Primer Mix (30 µl)

Multiplex Control Primer Mix	Länge des Endproduktes [nt]	Signalfarbe	Heterozygosität
20A Primer (0,05 pmol / µl)	21	Grün	Homozygot
28G/A Primer (0,10 pmol / µl)	29	Blau/Grün	Heterozygot
36G Primer (0,05 pmol / µl)	37	Blau	Homozygot
44T Primer (0,30 pmol / µl)	45	Rot	Homozygot
52C/T Primer (0,30 pmol / µl)	53	Schwarz/Rot	Heterozygot
60C Primer (0,30 pmol / µl)	61	Schwarz	Homozygot

- Thermocycler:
 - o Denaturieren des Templates: 96 °C, 10 Sekunden
 - o Annealing des unmarkierten Primers: 50 °C, 5 Sekunden
 - o Verlängern des Primers mit komplementären, fluoreszent markierten ddNTP: 60 °C, 30 Sekunden
- ABI PRISM 3100 avant Genetic Analyser: 4 Kapillar-Sequenzier
- GeneScan Analysis Software Version 3.5.
- Matrix Standard Set DS-02
- Hi-Di™ Formamid: Ein hoch deionisiertes Formamid, als Lösemittel für DNA-Analyse Methoden mit dem ABI PRISM DNA Analyser.
- GeneScan-120- LIZ Size Standard: Oligonucleotide die in einer einzelnen Reaktion für eine multiloci Abfrage verwendet werden, müssen sich signifikant in ihrer Länge unterscheiden, um ein Überlappen mit den finalen SNaPshot Produkten zu vermeiden. Für eine erfolgreiche Analyse der finalen Produkte, sollte ein „5th dye-labeled internal size standard“, der speziell für kleine Fragmente entwickelt wurde, verwendet werden. Der GeneScan-120-LIZ size standard ist speziell für den Gebrauch mit dem SNaPshot Multiplex Kit als Marker entwickelt worden.
- ddH₂O

- Antarctic Phosphatase [5 Units / μ l]: Das Enzym katalysiert die Entfernung von 5'-Phosphatgruppen von Nukleinsäuren, bereitet Templates für eine Markierung am 5'-Ende vor und kann dNTPs, ddNTPs und Pyrophosphate aus PCR-Reaktionen entfernen.
- Exonuklease I (E. coli) [20 U / μ l]: Das Enzym katalysiert die Entfernung von überschüssigen einzelsträngigen Primer Oligonukleotiden von 3'- in 5'-Richtung aus Proben mit doppelsträngigen PCR-Produkten,
- PCR-Produkt aus 2.2.3.1.

Tabelle 14: Untersuchte RT-PCR-Produkte

Patient	Primer RT-PCR
716. 1	REP 5-6 a / b
617. 3	REP 5-6 a / b
673. 1	REP 7-9 a / b
38. 2	REP-14-15 a / b
38. 4	REP-14-15 a / b

- **Tabelle 15: Sequenzen der eingesetzten SNaPshotPrimer und die mit diesen untersuchten RT-PCR-Produkte**

Primer-name	Sequenz	Fragment - gröÙe	Fragment	Zellkultur
REP-1168	TGGGCGGTATGGCAACACTC CATTTTTGTTTCCTTTATATGG CCA	45	REP-1 Position 1168	673.1
REP-581	GGTGCTGAAGTGACAGGGGA AAAAGAAAACCATTGTGATG	40	REP-1 Position 581	716.1
REP-838	AAAATATTACCAGGATTCTTG CATTTTCGAGAAGGA	35	REP-1 Position 838	617.3
REP-1832	CTGAAACACTTTTCCAGGAAA TCTGCCCA	30	REP-1 Position 1832	38.2 / 38.4

Mit dem **ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit** können Einzelnukleotid-Polymorphismen („single nucleotide polymorphisms“ SNPs) in einer DNA Probe detektiert werden.

Die biochemische Eigenschaft des Kits basiert auf der Verlängerung eines unmarkierten Oligonukleotidprimers um ein einziges Didesoxy Nukleosid Triphosphat (ddNTP) d.h. ein Primer bindet in Gegenwart von fluoreszent markierten ddNTPs und einer DNA Polymerase an ein komplementäres Template der Zielsequenz (siehe 3.4.1.). Die Polymerase verlängert den Primer an seinem 3'-Ende um ein einziges

ddNTP, das komplementär zur polymorphen Base des SNP ist. Der Primer kann auch so gestaltet sein, daß das entsprechende Nukleotid ein paar Basen von der Mutation entfernt ist, weil eine Insertion oder Deletion die Sequenz so verändert, dass die ersten Basen nach der Mutation identisch mit den ersten Basen der Deletion / Insertion sind. Deshalb musste der Primer so liegen, dass er etwas in die Frameshift Mutation hineinreicht um die erste Base zu detektieren, die das mutierte Allel vom Wildtyp unterscheidet.

Die SNaPshot-Produkte wurden dann mittels Kapillargelelektrophorese im DNA-Sequenzierautomaten (ABI PRISM Genetic Analyser 3100 avant, Applied Biosystems) aufgetrennt und dort durch laser-induzierte Fluoreszenz die an einen Primer gebundenen fluoreszierenden ddNTP mit dem Gentic-Analyser detektiert.

Tabelle 16: Fluoreszenzmarkierungen der eingesetzten ddNTP

ddNTP	Farbstoffname	Farbe der Markierung	Wellenlänge [nm]
A	dRGG	Grün	570
C	dTAMRA TM	Gelb*	595
G	dR110	Blau	540
T (U)	dROX TM	Rot	625

*Im Ausdruck Schwarz dargestellt

2.2.5.1. Vorbereiten des PCR-Templates für die Primer-Extension

Vor der Primer-Extension musste das PCR-Produkt aufgereinigt werden, da es sich nach der Amplifikation in einer Lösung mit Pufferkomponenten, Enzymen, Primern und dNTPs befindet. Deshalb wurden Primer und dNTPs entfernt, um eine ungewollte Beteiligung in der anschließenden Primer-Extension Reaktion zu vermeiden.

Für jedes zu untersuchende DNA-Template wurde ein Reaktionsansatz nach folgendem Pipettierschema in einem separaten Reaktionsgefäß zusammengemischt. Für den Mix wurde zu jedem PCR-Produkt (aus 2.2.3.1) nur jeweils ein produktspezifischer Primer zugegeben, da die SNaPshot-Produkte sich in der Quantifizierung sonst gegenseitig behindert hätten.

Wegen der hohen Glycerin Konzentration von unverdünntem SAP und Exo I, wurde ein Enzym nach dem Anderen in den PCR-Ansatz gegeben, gründlich mit dem Vortex durchmischt und für eine Stunde im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Enzyme bei 75 °C für 15 Minuten inaktiviert. Für den kurzfristigen Gebrauch das gereinigte Template auf Eis lagern lassen oder in den Kühlschrank (4 °C) stellen. Langfristige Lagerung bei - 20 °C im Gefrierschrank.

Tabelle 17: Mastermix für die auf die Primer-Extension vorzubereitenden PCR-Produkte

	Volumen [µl / Probe]	Volumen Mix [µl]
PCR-Produkt	5	z.B. 3x3
SAP (5 Units)	1	2
Exo I (2 Units)	0, 1	0, 2
SAP-Puffer	1	2
ddH₂O	ad 10	ad 20

2.2.5.2 Vorbereiten der Kontrollreaktionen

Für die SNaPshot Reaktion wurde einmal eine positive Kontrollreaktion mit Kontrolltemplate und eine negative Kontrollreaktion ohne Kontrolltemplate mitlaufen gelassen. Das Ergebnis aus dieser Kontrollreaktion wurde mit einem standardisierten Ergebnis aus dem ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit Protokoll, in Bezug auf Größe der SNaPshot Produkte, abgeglichen. Der Ansatz wurde kurz mit dem Vortex durchmischt und mit den Proben aus Schritt 3 in den Thermocycler gestellt.

Tabelle 18: Mastermix Kontrollreaktion

	Positive Kontrolle [µl]	Negative Kontrolle [µl]
SNaPshot Multiplex Reaktionsmix	5	5
SNaPshot Multiplex Kontroll- DNA	2	0
SNaPshot Multiplex Kontroll Primer Mix	1	1
ddH₂O	2	4
ad	10	10

2.2.5.3. Primerextension

Für die SNaPshot Multiplex Reaktion benötigt man die gereinigten Templates aus 2.2.5.1. und die komplementären Primer der zu untersuchenden Sequenz. In den 25 Zyklen im Thermocycler wird jeweils das Template denaturiert, der Primer an die komplementäre Zielsequenz hybridisiert und danach am 3'-Ende um ein fluoreszierendes ddNTP erweitert. Danach wurden die Ansätze bei 4 °C gelagert.

Für die Einzelproben wurde je ein Reaktionsansatz nach folgendem Mastermix in beschriftete PCR-Reaktionsgefäße geben.

Tabelle 19: Mastermix Primerextension

	Volumen [µl / Probe]	Volumen Mix [µl]
SNaPshot Multiplex Reaktionsmix	5	5
PCR-Produkt	1	1
SNaPshot Primer (0,2 µM)	0,13	z.B. 3 x 0,13
ddH₂O	ad 10	ad 10

Für den Mix mit z.B. 3 Templates benötigt man je 0,13 µl SNaPshot Primer. Die Differenz auf das Gesamtvolumen des Mastermixes wurde mit Wasser ausgeglichen.

Bevor die Ansätze mit den Kontrollproben aus Schritt 2 in den Thermocycler gestellt wurden, durchmischte man sie gründlich mit dem Vortex.

2.2.5.4. Post-Extension Treatment

Nach der Primerextension ist es wichtig, die nicht inkorporierten fluoreszent markierten ddNTPs aus den Proben zu entfernen. Nicht gebundene ddNTPs können zu nicht erwünschten Co-Migrationen mit den zu untersuchenden Teilstücken führen. Mit einer Phosphatase-Behandlung werden die 5'-Phosphatgruppen der ddNTPs entfernt und mögliche störende Eingriffe verhindert.

Zu den Reaktionsansätzen aus 2.2.5.3. wurde 1 Unit (0,2 µl) Antarctic Phosphatase gegeben, gründlich auf den Vortex durchmischt und für 1 Stunde bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Das Enzym wurde durch eine Inkubation für 15 Minuten bei 75 °C auf dem Heizblock inaktiviert und die Lagerung der Proben erfolgte bei 4 °C bis zu 24 Stunden vor der Elektrophorese, bei längerer Lagerung bei -20 °C.

2.2.5.5. Detektion der Extended Primer-Fragmente mit dem ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer

Die fluoreszent markierten Primer aus 2.2.5.4. und die Kontrollreaktion aus 2.2.5.2. wurden mittels Kapillar-Gelelektrophorese auf dem automatischen Sequenzierungsgerät der Größe nach aufgetrennt und detektiert.

In einem Reaktionsgefäß wurden 9 µl Hi-Di Formamid und 0,5 µl GeneScan-120-LIZ Size Standard als Marker für jedes zu untersuchende SNaPshot Produkt in einem Mastermix zusammenpipettiert und gründlich auf dem Vortex durchmischt. Dazu gab man 0,5 µl des SNaPshot Produktes hinzu. Bis zum Beladen des Genetic Analyzers bewahrte man die Proben bei 4 °C im Kühlschrank auf. Vor der Elektrophorese wurden die Proben automatisch durch den Genetic Analyzer durchmischt und bei 95 °C für 5 Minuten denaturiert.

3. Ergebnisse

3.1. Das Picken von Lymphoblastoid-Einzelzellen

Ziel unserer Untersuchung war es zu zeigen, mit welcher Verteilungshäufigkeit die Trägerin einer Sequenzveränderung im *REP-1* Gen das Wildtyp-Allel oder ein mutiertes Allel des *REP-1* in Lymphoblastoidzelllinien exprimiert. Dazu mussten von Trägerinnen mit bekannter *REP-1*-Mutation EBV-transformierte Lymphoblastoidzellen isoliert und anschließend mit verschiedenen Methoden die Expression des veränderten Allels untersucht werden. Dabei war es wichtig nur eine einzelne Zelle zu isolieren, um nicht fälschlicherweise die Allele weiterer Zellen in die Ergebnisse miteinzubeziehen. Anfängliche Versuche mit einer Eigenkonstruktion aus einem dünnen Glasröhrchen scheiterten, da ein zu großes Volumen mit Lymphozyten unkontrolliert durch die Kapillarkwirkung aufgenommen wurde. Dabei wurde ein Kapillarglasröhrchen (\varnothing 1 mm) in der Mitte durch einen Bunsenbrenner so erhitzt, dass es bei Erreichen eines zähplastischen Zustandes in die Länge gezogen und beide Stücke getrennt werden konnten. Der an der Trennstelle entstehende Glasfaden wurde abgebrochen und die kleine Öffnung an der Vorderseite unter dem Mikroskop begradigt. Die Hinterseite verband man über ein kleines Gummischläuchen mit einer Pasteurpipette und ein Volumen konnte pipettiert werden, das nicht exakt zu definieren war. Bei dieser Methode war durch die Möglichkeit des Mitpipettierens weiterer Lymphozyten ein großer Unsicherheitsfaktor vorhanden und die Ergebnisse zeigten keine aussagekräftige Relevanz. Deshalb wurde dieses Verfahren weiterhin nicht mehr verwendet.

Bessere Ergebnisse erzielte man bei der Benutzung einer Micropipette 1-10 μ l. Unter dem Mikroskop bei 20 x Vergrößerung konnte das versehentliche Miteinpipettieren einer zweiten Lymphoblastoid- Zelle mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden (siehe 2.2.2.).

3.2. Gradienten RT-PCR

Für die Amplifikation der auf der RNA, der isolierten Lymphoblastoideinzelzellen, zu untersuchenden Genabschnitte mittels RT-PCR, mussten zuerst gen-spezifische

Primerpaare getestet werden. Dazu verwendete man eine Gradienten RT-PCR. Die Proben der Gradienten RT-PCR (Schritt 2.2.3.2.) wurden auf ein 2 % Agarosegel aufgetragen (siehe 2.2.4.). Je nachdem ob die Primerkombination und die Reaktionsbedingungen zueinander passten, entstand ein PCR-Produkt. Die optimale Annealingtemperatur erzeugt die stärkste Amplifikation und stellt sich als am stärksten fluoreszierende Bande dar. Die entsprechende Annealingtemperatur im Thermocycler (Cyclone gradient Peq lab) entsprach der Primerannealingtemperatur.

Tabelle 20: Primerkombinationen und optimierte Annealingtemperaturen

Primerpaare	Primerannealing [°C]
REP-10-15a-REP-1-15ub	55
REP-12ea-REP-1-15ub	57,5
REP5-6a-REP5-6b	60
REP7-9a-REP7-9b	60
REP-10-13a-REP-10-13b	60
REP-14-15a-REP-14-15b	60

3.3. ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit

Eine weitere Möglichkeit die Expression der mRNA aus Lymphoblastoidzellen zu untersuchen, war die Fragmentanalyse mit dem ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit. Dabei wurden SNaPshot Primer eingesetzt, die an ihrem 3'-Ende um ein einziges fluoreszent markiertes ddNTP verlängert wurden, das komplementär zur polymorphen Base des SNP war. In einer nachfolgenden kapillarelektrophoretischen Analyse wurden dann diese Primer der Größe nach aufgetrennt und durch laser-induzierte Fluoreszenz die fluoreszent markierten ddNTPs detektiert. Je nach Sequenz, ob Wildtyp oder Mutation, konnten Peaks in unterschiedlichen Höhen an den Positionen der verlängerten Primer vermessen werden.

3.3.1. Untersuchte Mutationen

38. * => Mutation: D601S (c.1833C/A) REP-1 EXON 15

```
1 CT GAA ACA CTT TTC CAG GAA ATC TGC CCC A
2                               1815           1830           1845
3 GCT GAA ACA CTT TTC CAG GAA ATC TGC CCC AAT GAA GAT TTC TGT CCC CCT
4 GCT GAA ACA CTT TTC CAG GAA ATC TGC CCC ACT GAA GAT TTC TGT CCC CCT
5 Ala Glu Thr Leu Phe Gln Glu Ile Cys Pro Asn Glu Asp Phe Cys Pro Pro
6                               595           600           605
```

617. * => Mutation: R270X (c.838C-T) REP-1 EXON 6

```
AA AAT ATT ACC AGG ATT CTT GCA TTT CGA GAA GGA
      810           825           840
AAA AAT ATT ACC AGG ATT CTT GCA TTT CGA GAA GGA TGA GTG GAA CAG
AAA AAT ATT ACC AGG ATT CTT GCA TTT CGA GAA GGA CGA GTG GAA CAG
TTT TTA TAA TGG TCC TAA GAA CGT AAA GCT CTT CCT GCT CAC CTT GTC
Lys Asn Ile Thr Arg Ile Leu Ala Phe Arg Glu Gly Arg Val Glu Gln
      260           265           270
```

673. * => Mutation: c.1168ins50bp REP-1 EXON 8

```
T GGG CGG TAT GGC AAC ACT CCA TTT TTG TTT CCT TTA TAT GGC CA
1125           1140           1155           1170
CTT GGG CGG TAT GGC AAC ACT CCA TTT TTG TTT CCT TTA TAT GGC CAT ATG GCC
CTT GGG CGG TAT GGC AAC ACT CCA TTT TTG TTT CCT TTA TAT GGC CAA GGA GAA
Leu Gly Arg Tyr Gly Asn Thr Pro Phe Leu Phe Pro Leu Tyr Gly Gln Gly Glu
365           370           375           380
```

716. * => Mutation: c.581del14bp REP-1 EXON 5

```
GGT GCT GAA GTG ACA GGG GAA AAA GAA AAC CAT TGT GAT G
540           555           570           585
AAT GGT GCT GAA GTG ACA GGG GAA AAA GAA AAC CAT TGT GAT G--- --- ---
AAT GGT GCT GAA GTG ACA GGG GAA AAA GAA AAC CAT TGT GAT GAT AAA ACT TGT
Asn Gly Ala Glu Val Thr Gly Glu Lys Glu Asn His Cys Asp Asp Lys Thr Cys
170           175           180           185

      600           615
--- CCA TCA ACT TCA GCA GAA GAC
GTG CCA TCA ACT TCA GCA GAA GAC
Val Pro Ser Thr Ser Ala Glu Asp
      190           195
```

Legende zu zu den Fragmentsequenzen 38*, 716*, 617*, 673*:

1. Zeile: Sequenz SNaPshot Primer
2. Zeile: Nummerierung Basenpaare (Transkript)
3. Zeile: Basensequenz mit Mutation
4. Zeile: Wildtyp Basensequenz
5. Zeile: Aminosäuresequenz
6. Zeile: Aminosäurenummerierung

3.3.2. Verdünnungsreihe PCR-Templates

Für die Verdünnungsreihe wurden zwei Allele unterschiedlicher PCR-Templates eingesetzt, bestehend aus einer genomischen Patienten-DNA (männliches Genom mit Mutation, d.h. Basenaustausch von Cytosin gegen Thymin) und einer genomischen Vergleichs-DNA (männlich mit Wildtyp). Da CHM eine X-chromosomale Krankheit ist, tragen die beiden männlichen DNA-Spender jeweils nur ein einzelnes Allel.

Zuerst mussten die DNA-Proben mittels einer PCR vervielfältigt werden. Dazu wurde jedes Reaktionsgefäß mit 200 ng der jeweiligen DNA-Probe befüllt. Anschließend erfolgte der Ansatz des Master-Mix nach unten folgendem Pipettierschema. Davon wurden 40 µl in jedes Reaktionsgefäß dazugegeben und gemischt. Nun wurde das PCR-Programm auf die entsprechende Primer-Annealing Temperatur und 35 Zyklen eingestellt und das PCR-Gerät gestartet.

Nach Beendigung des Programms wurden die Proben aus dem Gerät entnommen und auf einem Agarosegel detektiert oder bis zur weiteren Bearbeitung im Kühlschrank aufbewahrt. Für die Verdünnungsreihe wurden beide Amplimer in verschiedenen Verhältnissen (siehe Tabelle 22) ad 10 µl zusammengemischt und davon 5 µl in 2.2.5.1. eingesetzt. Dadurch wurden Konduktorinnen mit bestimmten Mengenverhältnissen an Allelen simuliert. Mit diesem Versuch sollte gezeigt werden, dass die Fragmentanalyse und das ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit quantitativ arbeiten.

Material:

- genomische Patienten-DNA (617.1) zu 100 ng / µl
- genomische Vergleichs-DNA (0005) zu 100 ng / µl
- Go Taq-Polymerase
- PCR-Puffer
- $MgCl_2$ (50 mM)
- dNTP-Lösung (1,25 mM)
- Forward- und Reverse-Primer (REP 4-6 a / b) zu 10 pmol / µl

Tabelle 21: Mastermix PCR

Material	Volumen [μ l]
PCR-Puffer	10
MgCl₂ (25 mM)	4
dNTPs (1,25 mM)	8
ddH₂O	22
Taq-DNA-Polymerase	0,2
DNA (100 ng / μl)	2
Forward-Primer	2
Reverse-Primer	2
Gesamt	50

Aus den Ergebnissen (siehe Tab. 22 und Fig. 7 A-G) war ersichtlich, dass die Fragmentanalyse quantitativ gearbeitet hat. Je nach Mischungsverhältnis der Allele der zwei DNAs, stellten sich die Peaks in vergleichbarer Höhe dar, d.h. umso mehr Ausgangstemplate eingesetzt wurde, umso höher und größer prägten sich die Peaks aus.

617.1 [µl]	10		9		7		5		3		1		0	
0005 [µl]	0		1		3		5		7		9		10	
617.1 [%]	100		90		70		50		30		10		0	
0005 [%]	0		10		30		50		70		90		100	
Ergebnis	Peak	Fläche	Peak	Fläche	Peak	Fläche	Peak	Fläche	Peak	Fläche	Peak	Fläche	Peak	Fläche
617.1	4012	52998	4481	71710	2816	36305	1970	27387	1608	21478	571	8822	0	0
0005	0	0	416	6049	875	10851	1428	19115	2671	35250	3815	57504	3741	51279
Summe	4012	52998	4897	77759	3691	47156	3398	46502	4279	56728	4386	66326	3741	51279
617.1 [%]	100	100	91,5	92,2	76,3	77	58	59	37,6	37,9	13	13,3	0	0
0005 [%]	0	0	8,5	7,8	23,7	23	42	41	62,4	62,1	87	86,7	100	100
	siehe Abb. 7a		siehe Abb. 7b		siehe Abb. 7c		Siehe Abb. 7d		siehe Abb. 7e		siehe Abb. 7f		siehe Fig. 7g	

Tabelle 22: Verdünnungsreihe PCR- Templates

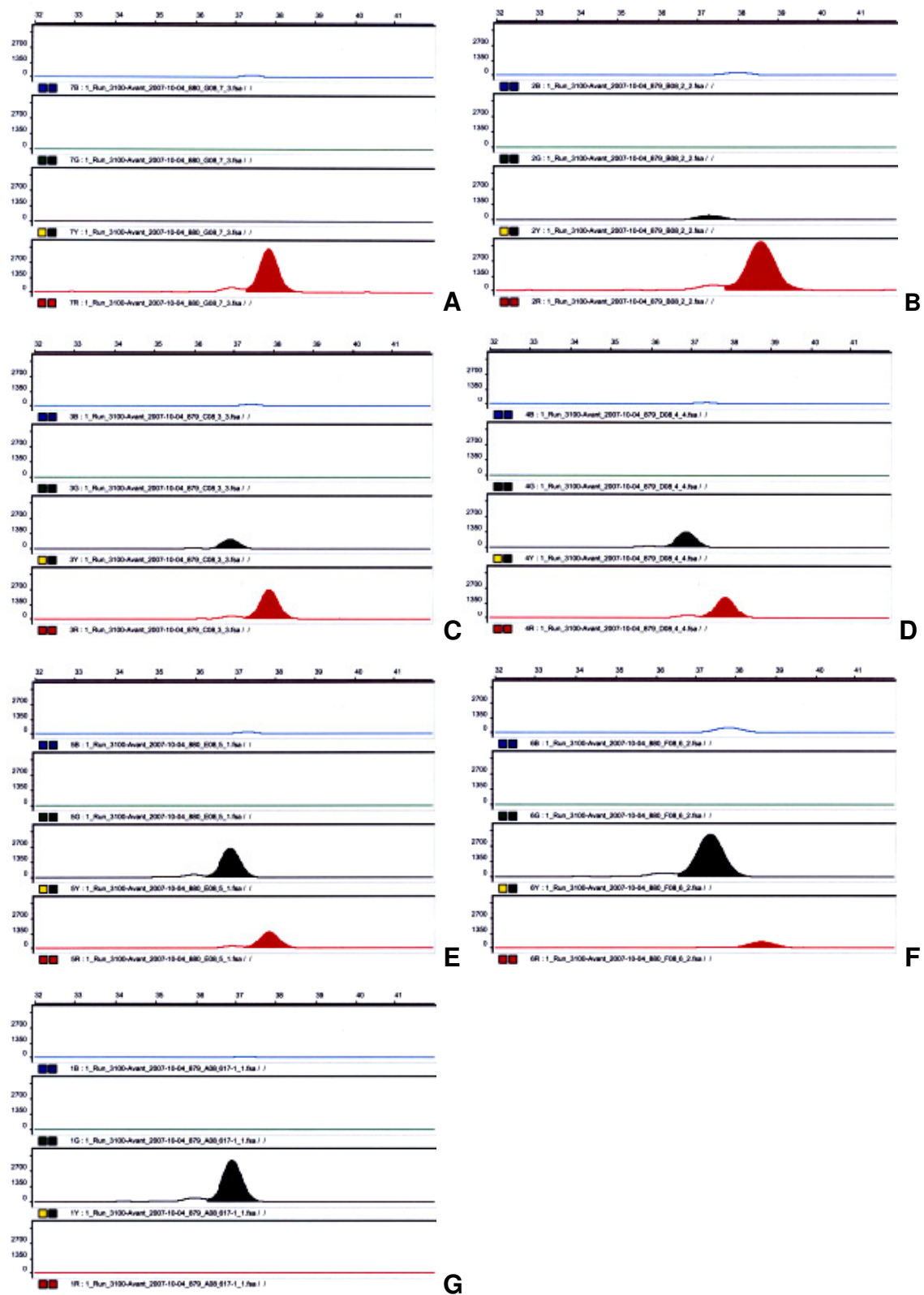


Abb. 7: Verdünnungsreihe DNA 0005 gegen 617.1 (Verhältnisse in %) (A) 0 : 100 (B) 10 : 90 (C) 30 : 70 (D) 50 : 50 (E): 70 : 30 (F): 90 : 10 (G): 100 : 0

3.3.3. Fragmentanalyse

Tabelle 23: Probandin 38.2.

WP	WF	MP	MF	Ant WP	Ant MP	Ant WF	Ant MF	AP	AF
0	0	1256	14510	0,000	1,000	0,000	1,000	1256	14510
61	617	1319	16217	0,044	0,956	0,037	0,963	1380	16834
89	1050	3355	41417	0,026	0,974	0,025	0,975	3444	42467
59	564	1904	22804	0,030	0,970	0,024	0,976	1963	23368
75	804	3638	45729	0,020	0,980	0,017	0,983	3713	46533
0	0	1242	13959	0,000	1,000	0,000	1,000	1242	13959
0	0	1936	23028	0,000	1,000	0,000	1,000	1936	23028
0	0	1036	11471	0,000	1,000	0,000	1,000	1036	11471
0	0	636	6953	0,000	1,000	0,000	1,000	636	6953
0	0	1394	15439	0,000	1,000	0,000	1,000	1394	15439
\bar{X}_a					0,988		0,990		
\bar{X}_i				0,012		0,01			

Tabelle 24: Probandin 38.4.

WP	WF	MP	MF	Ant WP	Ant MP	Ant WF	Ant MF	AP	AF
164	1862	4331	53455	0,036	0,964	0,034	0,966	4495	55317
85	904	2640	30265	0,031	0,969	0,029	0,971	2725	31169
129	1563	4722	57902	0,027	0,973	0,026	0,974	4851	59465
116	1302	5343	66403	0,021	0,979	0,019	0,981	5459	67705
1009	6498	7375	99374	0,120	0,880	0,061	0,939	8384	105872
214	2270	6578	77109	0,032	0,968	0,029	0,971	6792	79379
222	2371	7327	88219	0,029	0,971	0,026	0,974	7549	90590
101	1269	4916	59193	0,020	0,980	0,021	0,979	5017	60462
927	5752	7474	97492	0,110	0,890	0,056	0,944	8401	103244
646	3888	7457	94283	0,080	0,920	0,040	0,960	8103	98171
\bar{X}_a					0,949		0,966		
\bar{X}_i				0,051		0,034			

Tabelle 25: Konduktorin 673.1.

WP	WF	MP	MF	Ant WP	Ant MP	Ant WF	Ant MF	AP	AF
3019	36265	108	1134	0,965	0,035	0,970	0,030	3127	37399
3554	43141	70	719	0,981	0,019	0,984	0,016	3624	43860
2412	28276	112	1272	0,956	0,044	0,957	0,043	2524	29548
5093	61473	96	1071	0,981	0,019	0,983	0,017	5189	62544

0	0	442	5678	0,000	1,000	0,000	1,000	442	5678
5353	60661	141	1436	0,974	0,026	0,977	0,023	5494	62097
7489	87945	123	1167	0,984	0,016	0,987	0,013	7612	89112
777	8985	198	2237	0,797	0,203	0,801	0,199	975	11222
7447	111274	233	2002	0,970	0,030	0,982	0,018	7680	113276
7515	102512	0	0	1,000	0,000	1,000	0,000	7515	102512
Ø X_a				0,956	1,000	0,960	1,000		
Ø X_i				0,000	0,044	0,000	0,040		

Tabelle 26: Konduktorin 716.1.

WP	WF	MP	MF	Ant WP	Ant MP	Ant WF	Ant MF	AP	AF
1286	15368	649	8196	0,665	0,335	0,652	0,348	1935	23564
1896	22598	0	0	1,000	0,000	1,000	0,000	1896	22598
796	9295	1251	15789	0,389	0,611	0,371	0,629	2047	25084
328	3930	624	7965	0,345	0,655	0,330	0,670	952	11895
6276	75776	245	2914	0,962	0,038	0,963	0,037	6521	78690
837	9225	1099	12143	0,432	0,568	0,432	0,568	1936	21368
1702	19398	790	9279	0,683	0,317	0,676	0,324	2492	28677
0	0	1367	16314	0,000	1,000	0,000	1,000	1367	16314
1254	14091	1181	14350	0,515	0,485	0,495	0,505	2435	28441
1457	15963	1472	18277	0,497	0,503	0,466	0,534	2929	34240
Ø X_a				0,765	0,667	0,823	0,651		
Ø X_i				0,333	0,235	0,349	0,177		

Legende zu Tab. 23-26:

WP: Wildtyp Peakhöhe

WF: Wildtyp Peakfläche

MP: Mutation Peakhöhe

MF: Mutation Peakfläche

Ant WP: Anteil Wildtyp Peakhöhe aus AP

Ant MP: Anteil Mutation Peakhöhe aus AP

Ant WF: Anteil Wildtyp Peakfläche aus AF

Ant MF: Anteil Mutation Peakfläche aus AF

AP: Summe Wildtyp Peakhöhe und Mutation Peakhöhe

AF: Summe Wildtyp Peakfläche und Mutation Peakfläche

Ø X_a: Durchschnitt aktives X-Chromosom

Ø X_i: Durchschnitt inaktiviertes X-Chromosom

Probandin 38.2 besitzt in Exon 15 eine funktionsneutrale Missense-Mutation und kein Stopcodon. In den 10 untersuchten Proben wurde zu 100 % die Sequenzvariante exprimiert. Diese Zellen wiesen eine Restaktivität des inaktivierten X-Chromosoms von ca. 1,1 % auf. (siehe Tab. 23)

Ihre Schwester, Probandin 38.4 trägt die gleiche Sequenzvariante wie Patient 38.2. Wieder wurde zu 100 % die Mutation exprimiert. Zu ca. 4 % konnte eine Restaktivität für den Wildtyp nachgewiesen werden. (siehe Tab. 24)

Konduktorin 673.1 besitzt eine Insertion von 50 Basenpaaren in Exon 8. Zu 90 % der Proben wurde der Wildtyp, mit einer Restaktivität von ca. 4 % für die Mutation, exprimiert. In den restlichen 10 % der Proben (= 1 Probe), in denen die Mutation exprimiert wurde, konnte keine Restaktivität nachgewiesen werden. (siehe Tab. 25)

Konduktorin 716.1 hat eine Deletion mit 14 Basenpaaren in Exon 5. Bei ihr kam es zu einer gleichmäßigen Verteilung von Zellen, die die Mutation (50 %) und die den Wildtyp (50 %) exprimieren. Die Proben in denen der Wildtyp exprimiert wurde, hatte das inaktivierte X-Chromosom mit der Mutation eine Restaktivität von ca. 20 %. Die andere Hälfte der Proben, in denen vorwiegend die Mutation exprimiert wurde, wies im Durchschnitt eine Restaktivität von ca. 34 % für den Wildtyp auf. Bei dieser Mutation griff die Lyonisierung nicht vollständig, sondern es kam zu einem erhöhten Maß an Restaktivität. (siehe Tab. 26)

Für Konduktorin 617.3 konnten keine PCR-Produkte hergestellt werden.

4. Diskussion

Carrel et al. konnten anhand der Untersuchung von Polymorphismen zeigen, dass Gene (hier *REP-1* Gen) der X-Inaktivierung entkommen und vom aktiven und inaktivierten X-Chromosom exprimiert werden. Zu untersuchen war, ob eine Restaktivität des inaktivierten X-Chromosoms neben Polymorphismen auch bei pathologischen Sequenzvariationen (Mutationen) entsteht.

4.1. Prüfung der Methode des ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit

Eine kapillarelektrophoretische Untersuchung einer Verdünnungsreihe der PCR-Produkte (3.4.2.) mit dem ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit sollte zeigen, dass die absolute Menge an Ausgangstemplate, sich direkt auf die Höhe und Größe der Peaks auswirkt. Hierfür gibt es eine Reihe von Faktoren die das Ergebnis beeinflussen.

Neben der Konzentration an eingesetzter DNA ist auch die Qualität der genomischen DNA in Bezug auf Alter und Aufreinigungsqualität ein wichtiger Faktor, da sie sich mit der PCR-Effizienz potenzieren und damit die Menge an amplifiziertem Template erhöht wird. In Zellen variiert die Menge an RNA. Sie besitzen so viele mRNA Kopien, wie für die Funktion der Zelle nötig sind. Das bedeutet, dass aktive gesunde Zellen mehr mRNA Kopien besitzen, als mutierte nekrotische oder apoptotische Zellen und somit die Kopienzahl des Amplifikats entscheidend geprägt wird. Ebenso entscheidend ist die Zyklenzahl der PCR/ RT-PCR Reaktion, mit der die Kopienzahl des Amplifikats exponentiell steigt. Ein weiterer wichtiger Faktor ist das Volumen des PCR-Produkts, dass dann in die SNaPshot Reaktion eingebracht wird.

Aus dem Vergleich der Verdünnungsstufen mit dem Ergebnis aus der Kapillarelektrophorese (siehe 3.4.3.) ergab sich eine Abweichung von bis zu 10 %. Diese Abweichung entstand entweder durch die unterschiedliche Qualität der eingebrachten genomischen DNA oder durch mögliche Pipettierfehler.^{13,25}

Durch die kapillarelektrophoretische Untersuchung der Verdünnungsreihe wurde gezeigt, dass die Menge an Template sich grundsätzlich direkt auf die Größe und Höhe der Peaks auswirkt. Dies konnte anhand der Abbildung 7 gezeigt werden. Verschoob man das Mischungsverhältnis der DNAs mehr auf die Seite der DNA die

keine Mutation hatte (0005), prägte sich mehr der schwarze Peak für die Wildtypbase Cytosin aus. Wurde mehr DNA eingesetzt, bei der es durch die Mutation zu einem Basenaustausch von Cytosin zu Thymin kam, stieg der rote Peak.

Für die Untersuchung der Lymphoblastoidzellen bedeutete dies, dass eine größere Menge an RNA in den Einzelzellen, größere Peaks nach sich zieht und umgekehrt. Ebenso kann die Menge an Ausgangstemplate, welches durch die PCR beeinflusst wird (z. B. Zyklenzahl), die Peaks verändern. Damit konnte gezeigt werden, dass das ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit nicht nur qualitativ arbeitet, sondern auch in unserem Fall semiquantitativ (= Vergleich von Peaks zueinander).

4.2. Untersuchung auf Inaktivierung mit dem ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit

Das Ergebnis der Fragmentanalyse (siehe 3.4.3.) des *REP-1* Gens in Lymphoblastoidzellen von heterozygoten Trägerinnen von Sequenzveränderungen wurde durch zwei Faktoren entscheidend geprägt.

1. Zum Einen durch die zufallsbedingte Lyonisierung auf Stammzellebene, bei der eine gleichmäßige Verteilung der Expression des Wildtyps oder der Mutation zwischen den Zellen zu erwarten gewesen wäre. Hier könnte es durch zufällige ausschließliche Isolation von Einzelzellen eines einzelnen Sequenztyps zur Verschiebung des Gleichgewichtes kommen. Eine Lösung hierfür wäre den Umfang der Stichprobe zu erhöhen, um einen Fehler bei der Einzelzellisolation zu kompensieren.

2. Ebenso ein Grund für eine Verschiebung könnte der Gebrauch von Zellkulturen gewesen sein, in denen sich die eine oder andere Form besser entwickelt hat. Es besteht die Möglichkeit, dass Zellen mit Mutation einen Vorteil besitzen und sich dadurch besser entwickeln oder die Mutation einen Nachteil birgt und die Zellen weniger stabil sind oder sogar abgebaut werden.

Zudem wurden die Lymphoblastoidzellen für die Zellkultur aus Blut isoliert, in dem die Allelverteilung nicht zwingend mit der in den Zellen im Auge gleichzusetzen ist.

Auf zellulärer Ebene ist die Expression einer bestimmten Restaktivität des inaktivierten X-Chromosoms ein weiterer Punkt der entscheidend für das Ergebnis dieser Untersuchung ist. Dies spricht gegen die Hypothese von Lyon, dass entweder

das eine oder andere X-Chromosom aktiv ist und zu 100% exprimiert wird und das inaktive X-Chromosom zu 100% still ist ²⁸.

Bei den Probandinnen 38.2 und 38.4 kam es aus oben genannten Gründen zu keiner gleichmäßigen Verteilung der Expression der beiden Allele. In allen untersuchten Zellen von 38.2 und 38.4 wurde das Wildtypallel lyonisiert (inaktiviert) und die Sequenzvariation exprimiert. Da es sich hier um eine Missensemutation handelte und nicht um eine Stopcodonmutation, blieb die RNA stabil und konnte exprimiert werden. Im Gegensatz dazu Konduktorin 617.3, welche eine Stopcodonmutation trägt.

Konduktorin 716.1 war die einzige Probandin, bei der es in den 10 untersuchten Zellen zu einer gleichmäßigen Verteilung der Lyonisierung kam. Die Lyonisierung war jedoch für beide Varianten nicht vollständig und es bestand eine Restaktivität für das jeweils andere Allel. Diese Konduktorin ist ein Musterbeispiel, da sowohl die Lyonisierung als auch eine Restaktivität des *REP-1* Gens durch das inaktivierte X-Chromosom nachzuweisen war.

Bei Konduktorin 617.3 kam es durch den Basenaustausch in Exon 6 zu einem vorzeitigen Stopcodon und dadurch kommt der sog. Nonsense mediated RNA decay zum Tragen. Der Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) bezeichnet einen biologischen (Qualitätskontroll-) Mechanismus, bei dem fehlerhafte mRNA in Zellen abgebaut wird. Dieser Mechanismus wurde bisher in jedem untersuchten eukaryotischen Lebewesen gefunden, mit anderen Worten: er ist phylogenetisch hochkonserviert.

Fehlerhafte mRNA-Transkripte entsprechen nicht immer den Voraussetzungen für ein korrekt gefaltetes, funktionierendes Protein. Durch Mutationen, Lese- und Schreibfehler oder Alternatives Spleissen entstehen fehlerhafte mRNAs, die zu einem vorzeitigen Translationsterminationscodon, sog. Prämatüre Stopcodons (PTCs), führen. Die Translation dieser mRNAs führt zu fehlerhaften Genprodukten und hätte verschiedene schädliche Auswirkungen in Form von schwerwiegenden Krankheitsbildern, weswegen ein Kontrollmechanismus in Kraft tritt, der NMD genannt wird.

PTCs mit mehr als 50 Nukleotiden vor der letzten Exon-Intron-Exon Verbindung werden als fehlerhaft erkannt und lösen NMD aus, wodurch in einem spleiß- und translationsabhängigen Prozess im Zytoplasma der Zelle diese fehlerhafte mRNA abgebaut wird. Das natürliche Stop-Codon liegt meist im letzten Exon.

Bei Konduktorin 617.3 war wohl das Allel mit der Mutation aktiv und zudem die Lyonisierung vollständig, d. h. es bestand keine Restaktivität für den Wildtyp. In Folge dessen kam vermutlich NMD durch das vorzeitige Stopcodon voll zu tragen. Somit konnte kein Template in der RT-PCR Reaktion aus der durch NMD abgebauten mRNA von Lymphoblastoidzellen hergestellt werden.³⁵

In der Auswertung von Peakgröße und Peakfläche, die sich beide aus der fluoreszierenden Markierung ergeben, kam es zu geringfügigen Diskrepanzen (ca. 5 % bei Konduktorin 716.1). An dem Punkt, wo quantitativ das meiste Fragment ist, ist die Leuchtkraft am stärksten. Idealerweise sollte hier der Peak seine höchste Stelle haben. Je nach Steigung des Peaks, kann es aber im Verhältnis von Peakgröße und Peakfläche zu einer geringfügigen Abweichung kommen. Grund ist, dass in Bereichen mit flachem Kurvenverlauf einige Restanteile vorkommen, die unterhalb der Fehlergrenze der Messmethode liegen und nicht erfasst werden. Im Zweifelsfall sollte für die Auswertung die Messwerte der Peakgröße herangezogen werden.

Durch unsere Untersuchung konnten wir die These von Carrel et al. bestätigen, dass humane X-gebundene Gene – hier das *REP-1* Gen - der X-Inaktivierung entkommen können und sowohl vom aktiven als auch vom inaktivierten X-Chromosom exprimiert werden. Dies konnten wir sowohl für 2 Probandinnen einer Familie mit einem Polymorphismus, als auch für 2 Konduktorinnen mit pathogenen Sequenzveränderungen (Deletion, Insertion) nachweisen, wobei aber die *REP-1* Allele jeweils unterschiedlich stark exprimiert wurden.

Der Einfluß der Mutation auf das Expressionsverhältnis der *REP1* Allele muss nun in weiteren Untersuchungen an einer Stichprobe mit höherer Zellzahl und weiteren Konduktorinnen mit verschiedenen Mutationstypen verifiziert werden.

5. Zusammenfassung

Chorioideremie (CHM) ist eine X-chromosomal rezessiv vererbte Augenkrankheit. Charakteristisch für die Krankheit ist die progressive Degeneration der Photorezeptoren, des retinalen Pigmentepithels (RPE) und der Choriokapillaren (CHC) als Folge von Mutationen im *REP-1* Gen. Hemizygoten Männer klagen in der ersten oder zweiten Lebensdekade über Nachtblindheit, gefolgt von progredienten Gesichtsfeldausfällen, verminderter Sehschärfe und geringer Myopie. In höherem Alter zeigt die Mehrheit der untersuchten Patienten mit CHM ein gutes zentrales Sehvermögen. Im Endstadium kommt es zu einer zunehmenden Verminderung der Sehschärfe und des zentralen Sehvermögens^{21,29,40}.

Frauen als Konduktorinnen (heterozygot) zeichnen sich durch ein meist asymptomatisches Krankheitsbild aus. Sie weisen jedoch deutliche Veränderungen in Form einer mottenfraß-ähnlichen, gefleckten Pigmentveränderung in der Peripherie des Fundus auf. Die feingranuläre Hyperpigmentierung und manchmal Atrophie des RPE deuten auf einen Gendefekt eines X-chromosomalen *REP-1* Gens hin. Das mosaikartige Muster der Netzhautpigmentierung kann auf die zufallsbedingte Inaktivierung des X-Chromosoms zurückgeführt werden (=Lyonisierung). Eine Funktionsstörung, bedingt durch eine vorwiegende Aktivität des mutierten Allels, führt zur stärkeren Ausprägung von CHM. Bei einigen Frauen kann dies im höheren Alter zu Nachtblindheit, Photophobie oder gelegentlich zur Einschränkung des Sehfeldes führen.

Das zu untersuchende Patientengut bestand aus 5 Trägerinnen bekannter Sequenzveränderung auf dem *REP-1* Gen. Drei Konduktorinnen zeigten pathogene Sequenzveränderungen, die zu einem vorzeitigen Translationsstop führen (Deletion, Insertion, Nonsensemutation). Zwei Probandinnen zeigen einen Polymorphismus in Form einer funktionsstabilen Missensemutation.

Mit einer molekulargenetischen Untersuchungsreihe des *REP-1* Gens sollte die Verteilungshäufigkeit ermittelt werden, inwiefern eine Trägerin für Sequenzveränderungen des *REP-1* Gens den Wildtyp oder ein sequenzverändertes Allel in Lymphoblastoidzelllinien exprimiert. Dazu wurden von Konduktorinnen mit bekannten pathogenen *REP-1*-Mutation und Probandinnen mit benignen Missense-Mutationen Einzelzellen aus EBV-transformierten Lymphoblastoidzelllinien isoliert

und deren RNA über die RT-PCR auf die Expression des veränderten Allels untersucht.

Die Fragmentanalyse mit dem ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit ermöglichte die Untersuchung des exprimierten Alleles auf qualitative und quantitative Weise. Dabei wurde ein zur Zielsequenz komplementärer Primer um ein einziges ddNTP verlängert, welches komplementär zum SNP war. Die fluoreszent markierten Primer wurden kapillarelektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt. So konnte die Expression der Allele untersucht werden. Durch eine Verdünnungsreihe von Kontrolltemplates konnte nachgewiesen werden, dass die eingesetzte Methodik (sowohl die PCR, als auch die Kapillarelektrophorese) quantitativ arbeitet. Für die eigentliche Untersuchung wurden je Zellkultur 10 Zellen gewonnen. Für Probandin 38.2 wurde in den 10 untersuchten Zellen zu 100 % die Mutation exprimiert. Diese Zellen wiesen eine Restaktivität des inaktivierten X-Chromosoms von ca. 1,1 % auf. Bei Probandin 38.4 wurde auch zu 100 % die Mutation exprimiert. Zu ca. 4 % konnte eine Restaktivität für den Wildtyp nachgewiesen werden.

Konduktorin 673.1 exprimiert in den untersuchten Zellen zu 90 % den Wildtyp mit einer Restaktivität von 4 % für die Mutation. In den restlichen 10 % der Proben in denen die Mutation exprimiert wurde, konnte keine Restaktivität für den Wildtyp nachgewiesen werden.

Bei Konduktorin 716.1 kam es zu einer gleichmäßigen Verteilung der Allele mit Mutation und Wildtyp. Die Zellen in denen der Wildtyp exprimiert wurde, hatte das inaktivierte X-Chromosom mit der Mutation eine Restaktivität von 20 %. Die andere Hälfte der Proben, in denen vorwiegend die Mutation exprimiert wurde, wies im Durchschnitt eine Restaktivität von 34 % für den Wildtyp auf. Bei diesen 10 Zellen griff die Lyonisierung nicht, sondern es kam zu einem erhöhten Maß an Restaktivität. Durch ein vorzeitiges Stopcodon in Exon 6 bei Konduktorin 617.3, konnte durch den NMD (= nonsense mediated decay) kein PCR-Produkt hergestellt werden.

Als Fazit konnte die These von Carrel et al. bestätigt werden, dass humane X-gebundene Gene (hier *REP-1* Gen) der X-Inaktivierung entkommen können und daher sowohl vom aktiven als auch vom inaktivierten X-Chromosom exprimiert werden. In unserer Untersuchung konnte dies einerseits für Polymorphismen als auch für zwei pathologische Sequenzveränderungen (Deletion bzw. Insertion) gezeigt werden.

6. Literaturverzeichnis

6.1. Referenzen

1. Alexandrov K, Horiuchi H, Steele Mortimer O, Seabra MC, Zerial M. Rab escort protein-1 is a multifunctional protein that accompanies newly prenylated rab proteins to their target membranes. *EMBO J.* 13[22], 5262-5273. 1994.
2. Alexandrov K, Simon I, Yurchenko V, Iakovenko A, Rostkova E, Scheidig AJ, Goody RS. Characterization of the ternary complex between Rab7, REP-1 and Rab geranylgeranyl transferase. *Eur.J Biochem.* 265[1], 160-170. 1999.
3. Alory C, Balch WE. Molecular evolution of the Rab-escort-protein/guanine-nucleotide-dissociation-inhibitor superfamily. *Mol.Biol.Cell.* 14[9], 3857-3867. 2003.
4. Anant JS, Desnoyers L, Machius M, Demeler B, Hansen JC, Westover KD, Deisenhofer J, Seabra MC. Mechanism of Rab geranylgeranylation: formation of the catalytic ternary complex. *Biochemistry.* 37[36], 12559-12568. 1998.
5. Andres DA, Seabra MC, Brown MS, Armstrong SA, Smeland TE, Cremers FP, Goldstein JL. cDNA cloning of component A of Rab geranylgeranyl transferase and demonstration of its role as a Rab escort protein. *Cell* 73, 1091-1099. 1993.
6. Beverly SM. Enzymatic Amplification of RNA by PCR (RT-PCR). Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidmann JG, Smith JA, Struhl K, editors. *Current Protocols in Molecular Biology.* [15.5]. 2001. Indianapolis, John Wiley & Sons, Inc.
7. Carrel L, Cottle AA, Goglin KC, Willard HF. A first-generation X-inactivation profile of the human X chromosome. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 96[25], 14440-14444. 1999.
8. Carrel L, Willard HF. Heterogeneous gene expression from the inactive X chromosome: an X-linked gene that escapes X inactivation in some human cell lines but is inactivated in others. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 96[13], 7364-7369. 1999.
9. Casey PJ, Seabra MC. Protein prenyltransferases. *Journal of Biological Chemistry* 271[10], 5289-5292. 1996.

10. Cremers FP, Armstrong SA, Seabra MC, Brown MS, Goldstein JL. REP-2, a Rab escort protein encoded by the choroideremia-like gene. *Journal of Biological Chemistry* 269, 2111-2117. 1994.
11. Cremers FP, Sankila EM, Brunsmann F, Jay M, Jay B, Wright A, Pinckers AJ, Schwartz M, van de Pol DJ, Wieringa B. Deletions in patients with classical choroideremia vary in size from 45 kb to several megabases. *American Journal of Human Genetics* 47, 622-628. 1990.
12. Donnelly P, Menet H, Fouanon C, Herbert O, Moisan JP, Le Roux MG, Pascal O. Missense mutation in the choroideremia gene. *Human Molecular Genetics* 3, 1017. 1994.
13. Frischmeyer PA, Dietz HC. Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Hum Mol. Genet.* 8[10], 1893-1900. 1999.
14. Gelehrter TD, Collins FS. Principles of Medical Genetics. 1990. Baltimore, Williams and Wilkins.
15. Ghosh M, McCulloch C, Parker JA. Pathological study in a female carrier of choroideremia. *Can.J.Ophthalmol.* 23[4], 181-186. 1988.
16. Goedbloed J. Mode of inheritance in choroideremia. *Ophthalmologica* 104, 308-315. 1942.
17. Heckenlively JR, Bird AC. Choroideremia. Heckenlively JR, editor. Retinitis pigmentosa. 176-187. 1988. New York, J.B. Lippincott Co.
18. Ho YK, Loew A, Blundell T, Bax B. Phosducin Induces A Structural Shift On Transducin gamma? That Internalizes The G Subunit Farnesyl Group. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 39[Suppl], S442. 1998.
19. Hume AN, Collinson LM, Rapak A, Gomes AQ, Hopkins CR, Seabra MC. Rab27a regulates the peripheral distribution of melanosomes in melanocytes. *J.Cell Biol.* 152[4], 795-808. 2001.
20. Jimenez-Sierra JM, Ogden TE, Van Boemel GB. Choroideremia. Jimenez-Sierra JM, Ogden TE, Van Boemel GB, editors. Inherited Retinal Diseases - A Diagnostic Guide. 22-25. 1989. St. Louis, The CV Mosby Company.
21. Kärnä J. Choroideremia. A clinical and genetic study of 84 Finnish patients and 126 female carriers. *Acta Ophthalmol.Suppl.* 176, 1-68. 1986.
22. Larijani B, Hume AN, Tarafder AK, Seabra MC. Multiple factors contribute to inefficient prenylation of Rab27a in Rab prenylation diseases. *Journal of Biological Chemistry* 278[47], 46798-46804. 2003.

23. Lehninger AL. Replikation und Transkription der DNA. Biochemie. 2[32], 731-762. 1985. Weinheim, Verlag Chemie.
24. Leung KF, Baron R, Seabra MC. Thematic review series: lipid posttranslational modifications. geranylgeranylation of Rab GTPases. *J Lipid Res.* 47[3], 467-475. 2006.
25. Lewis BP, Green RE, Brenner SE. Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 100[1], 189-192. 2003.
26. Ling PD, Huls HM. Isolation and immortalization of Lymphocytes. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidmann JG, Smith JA, Struhl K, editors. Current Protocols in Molecular Biology. [28.2]. 2005. Indianapolis, John Wiley & Sons, Inc.
27. Löffler G. Basiswissen Biochemie und Pathobiochemie. 4, 353-354. 2001. Berlin, Springer.
28. Lyon M. Gene Action in X-chromosome of mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* 190, 372. 1961.
29. MacDonald IM, Chen MH, Addison DJ, Mielke BW, Nesslinger NJ. Histopathology of the retinal pigment epithelium of a female carrier of choroideremia. *Can.J.Ophthalmol.* 32[5], 329-333. 1997.
30. MacDonald IM, Mah DY, Ho YK, Lewis RA, Seabra MC. A practical diagnostic test for choroideremia. *Ophthalmology* 105[9], 1637-1640. 1998.
31. MacDonald IM, Sereda C, McTaggart K, Mah D. Choroideremia gene testing. *Expert.Rev.Mol.Diagn.* 4[4], 478-484. 2004.
32. McTaggart KE, Tran M, Mah DY, Lai SW, Nesslinger NJ, MacDonald IM. Mutational analysis of patients with the diagnosis of choroideremia. *Human Mutation* 20[3], 189-196. 2002.
33. Merry DE, Janne PA, Landers JE, Lewis RA, Nussbaum RL. Isolation of a candidate gene for choroideremia. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 89, 2135-2139. 1992.
34. Nesslinger N, Mitchell G, Strasberg P, MacDonald IM. Mutation analysis in Canadian families with choroideremia. *Ophthalmic Genetics* 17[2], 47-52. 1996.
35. Noensie EN, Dietz HC. A strategy for disease gene identification through nonsense-mediated mRNA decay inhibition. *Nat.Biotechnol.* 19[5], 434-439. 2001.

36. Pereira-Leal JB, Hume AN, Seabra MC. Prenylation of Rab GTPases: molecular mechanisms and involvement in genetic disease. *FEBS Lett.* 498[2-3], 197-200. 2001.
37. Preising M, Ayuso C. Rab escort protein 1 (REP1) in intracellular traffic: a functional and pathophysiological overview. *Ophthalmic Genet* 25[2], 101-110. 2004.
38. Pschyrembel W. Klinisches Wörterbuch. 259. 2002. Berlin, W.de.Gruyter.
39. Rak A, Pylypenko O, Niculae A, Goody RS, Alexandrov K. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of monoprenylated Rab7 GTPase in complex with Rab escort protein 1. *J Struct.Biol.* 141[1], 93-95. 2003.
40. Rudolph G, Preising M, Kalpadakis P, Haritoglou C, Lang G, Lorenz B. Phenotypic variability in three carriers from a family with choroideremia and a frameshift mutation 1388delCCinsG in the REP-1 gene. *Ophthalmic Genetics* 24[4], 203-214. 2003.
41. Sankila EM, Tolvanen R, van den Hurk JA, Cremers FP, de la Chapelle A. Aberrant splicing of the CHM gene is a significant cause of choroideremia. *Nat.Genet.* 1[2], 109-113. 1992.
42. Schwartz M, Rosenberg T, van den Hurk JA, van de Pol DJ, Cremers FP. Identification of mutations in Danish choroideremia families. *Human Mutation* 2, 43-47. 1993.
43. Schwartz SB, Aleman TS, Cideciyan AV, Swaroop A, Jacobson SG, Stone EM. De novo mutation in the RP1 gene (Arg677ter) associated with retinitis pigmentosa. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 44[8], 3593-3597. 2003.
44. Seabra MC. New insights into the pathogenesis of choroideremia: a tale of two REPs. *Ophthalmic Genetics* 17[2], 43-46. 1996.
45. Seabra MC. Nucleotide dependence of Rab geranylgeranylation. Rab escort protein interacts preferentially with GDP-bound Rab. *Journal of Biological Chemistry* 271[24], 14398-14404. 1996.
46. Seabra MC, Brown MS, Goldstein JL. Retinal degeneration in choroideremia: deficiency of rab geranylgeranyl transferase. *Science* 259[5093], 377-381. 1993.
47. Seabra MC, Brown MS, Slaughter CA, Sudhof TC, Goldstein JL. Purification of component A of Rab geranylgeranyl transferase: possible identity with the choroideremia gene product. *Cell* 70[6], 1049-1057. 1992.

48. Seabra MC, Goldstein JL, Sudhof TC, Brown MS. Rab geranylgeranyl transferase. A multisubunit enzyme that prenylates GTP-binding proteins terminating in Cys-X-Cys or Cys- Cys. *Journal of Biological Chemistry* 267[20], 14497-14503. 1992.
49. Seabra MC, Ho YK, Anant JS. Deficient geranylgeranylation of Ram/Rab27 in choroideremia. *Journal of Biological Chemistry* 270[41], 24420-24427. 1995.
50. Shen F, Seabra MC. Mechanism of digeranylgeranylation of Rab proteins. Formation of a complex between monogeranylgeranyl-Rab and Rab escort protein. *Journal of Biological Chemistry* 271[7], 3692-3698. 1996.
51. Strachan T, Read AP. Human Molecular Genetics. 2. 1999. Oxford, BIOS Scientific Publishers Ltd.
52. Stryer L. Biochemistry. 4. 1995. New York, W.H. Freeman and Company.
53. Syed N, Smith JE, John SK, Seabra MC, Aguirre GD, Milam AH. Evaluation of retinal photoreceptors and pigment epithelium in a female carrier of choroideremia. *Ophthalmology* 108[4], 711-720. 2001.
54. Tabor S. RNA-Dependent DNA Polymerases. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidmann JG, Smith JA, Struhl K, editors. Current Protocols in Molecular Biology. [3.7]. 1987. Indianapolis, John Wiley & Sons, Inc.
55. Tariverdian G, Busmaier W. Humangenetik. 3. 2004. Heidelberg, Springer.
56. Tolmachova T, Anders R, Abrink M, Bugeon L, Dallman MJ, Futter CE, Ramalho JS, Tonagel F, Tanimoto N, Seeliger MW, Huxley C, Seabra MC. Independent degeneration of photoreceptors and retinal pigment epithelium in conditional knockout mouse models of choroideremia. *J Clin. Invest.* 116[2], 386-394. 2006.
57. Van Bokhoven H, Schwartz M, Andreasson S, van den Hurk JA, Bogerd L, Jay M, Ruther K, Jay B, Pawlowitzki IH, Sankila EM. Mutation spectrum in the CHM gene of Danish and Swedish choroideremia patients. *Human Molecular Genetics* 3, 1047-1051. 1994.
58. Van Bokhoven H, van den Hurk JA, Bogerd L, Philippe C, Gilgenkrantz S, de Jong P, Ropers HH, Cremers FP. Cloning and characterization of the human choroideremia gene. *Human Molecular Genetics* 3[7], 1041-1046. 1994.
59. Van Bokhoven H, von Genderen C, Molloy CM, van de Pol DJ, Cremers CW, von Aarem A, Schwartz M, Rosenberg T, Geurts van Kessel AH, Ropers HH. Mapping of the choroideremia-like (CHML) gene at 1q42-qter and mutation

- analysis in patients with Usher syndrome type II. *Genomics* 19[2], 385-387. 1994.
60. van den Hurk JA, Schwartz M, Van Bokhoven H, van de Pol TJ, Bogerd L, Pinckers AJ, Bleeker Wagemakers EM, Pawlowitzki IH, Ruther K, Ropers HH, Cremers FP. Molecular basis of choroideremia (CHM): mutations involving the Rab escort protein-1 (REP-1) gene. *Human Mutation* 9[2], 110-117. 1997.
 61. van den Hurk JA, van de Pol TJ, Molloy CM, Brunsmann F, Ruther K, Zrenner E, Pinckers AJ, Pawlowitzki IH, Bleeker Wagemakers EM, Wieringa B, Ropers HH, Cremers FPM. Detection and characterization of point mutations in the choroideremia candidate gene by PCR-SSCP analysis and direct DNA sequencing. *American Journal of Human Genetics* 50, 1195-1202. 1992.
 62. Voytas D. Agarose Gel Electrophoresis. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidmann JG, Smith JA, Struhl K, editors. *Current Protocols in Molecular Biology*. [2.5A]. 2000. Indianapolis, John Wiley & Sons, Inc.
 63. Waardenburg PJ. Chorioideremie als Erbmerkmal. *Acta Ophthalmologica* 20, 235-274. 1942.
 64. Wegscheider E, Poloschek CM, Preising MN, Lorenz B. Fundus Autofluorescence in Carriers for Choroideremia. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 46[5], 4088. 2005.
 65. Wegscheider E, Preising MN, Lorenz B. Fundus autofluorescence in carriers of X-linked recessive retinitis pigmentosa associated with mutations in RPGR, and correlation with electrophysiological and psychophysical data. *Graefes Arch.Clin.Exp.Ophthalmol.* 242[6], 501-511. 2004.

6.2. Internetreferenzen

<http://www.ABgene.com>

<http://www.genomic.unimelb.edu.au/mdi/>

<http://www.hgmd.org>

<http://www.retina-international.org/sci-news/repmut.htm>

<http://www.retinascience.de>

7. Danksagung

Zu aller Anfang ein Dankeschön an Frau Prof. Dr. med. Birgit Lorenz, die durch eine Aufgabenstellung und durch die Bereitstellung von Materialien und der Laborgerätschaft diese Dissertation möglich gemacht hat.

Ein großer Dank gebührt Herrn Dr. rer. medic. Dipl.-Biol. Markus Preising für die intensive Betreuung bei allen Laborarbeiten und Auswertung von Ergebnissen. In schwierigen Situationen war er ein engagierter Ansprechpartner und nahm sich stets der Lösung der Probleme an.

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

Nicht zu vergessen ist mein Freund Roland Krempf, der mich bei der Gestaltung des Layouts unterstützt hat. Herzlichen Dank!

Ich danke meiner lieben Freundin Julia, die mir durch Gespräche und durch ihre Anwesenheit zu neuer Motivation verhalf.

Den größten Dank spreche ich meiner Familie, meinem Bruder Maximilian, meinem Opa und meiner Mutter aus, die mir immer zur Seite stehen und mir ein erfolgreiches Studium ermöglicht haben.

8. Curriculum vitae

Name: Willer
Vorname: Mario Peter
Geburtsdatum: 09. März 1977
Geburtsort: Landshut
Wohnort: Bahnhofstraße 16, 84030 Ergolding
Familienstand: ledig
Mutter: Willer Maximiliane, Hausfrau
Geschwister: Bruder Maximilian, Schüler
Schulbildung: 1983-1987 Grundschule Seligenthal, Landshut
1987-1998 Maristengymnasium Furth
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Grundwehrdienst: 1998-1999 VBK 66, Landshut
Ausbildung: 1999-2002 Lehre zum Zahntechniker,
Dentallabor Patschke, Ergolding
Juli 2002 Gesellenprüfung
Studium: April 2002 Immatrikulation zum Studium der
Zahnmedizin an der Universität
Regensburg
April 2003 Naturwissenschaftliche Vorprüfung
September 2004 Zahnärztliche Vorprüfung
Juni 2007 Staatsexamen
Juli 2007 Approbation als Zahnarzt
Nov. 2007 Vorbereitungsassistent, Wolfratshausen
Dez. 2008 Vorbereitungsassistent, München

Ergolding, den 09. Februar 2009