

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR HUMANGENETIK
PROF. DR. BERNHARD WEBER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Mutationsanalyse in ABCA4-assoziierten Netzhautdystrophien mittels der Didesoxymethode nach Sanger

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Nina-Veronika Ingeborg Lenhardt

2014

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR HUMANGENETIK
PROF. DR. BERNHARD WEBER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Mutationsanalyse in ABCA4-assoziierten Netzhautdystrophien mittels der Didesoxymethode nach Sanger

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Nina-Veronika Ingeborg Lenhardt

2014

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernhard Weber
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Herbert Jäggle
Tag der mündlichen Prüfung: 21. Mai 2015

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
1. Einleitung.....	1
1.1. ABCA4 <i>ATP-binding cassette, sub-family A, member 4</i>	1
1.2. Die Netzhaut des Menschen	4
1.3. Hereditäre Erkrankungen der zentralen Netzhaut - Die Makuladystrophien 6	
1.3.1. Morbus Stargardt	6
1.3.2. Zapfen-Stäbchen-Dystrophie	9
1.3.3. Altersabhängige Makuladegeneration.....	10
1.3.4. Genotyp-Phänotyp-Modell der mit ABCA4-Mutationen assoziierten Netzhauterkrankungen.....	13
1.4. Zielsetzung der Arbeit	14
2. Material und Methoden	17
2.1. Das Patientenkollektiv	17
2.1.1. Patienten mit M. Stargardt- und Zapfen-Stäbchen-Dystrophie.....	17
2.1.2. Patienten mit altersabhängiger Makuladegeneration	19
2.2. Material	20
2.2.1. Patienten-DNA	20
2.2.2. Oligonukleotid-Primer.....	20
2.2.3. Enzyme und Kits	23
2.2.4. Chemikalien	23
2.2.5. Puffer und Lösungen.....	24
2.2.6. Verbrauchsmaterial	24
2.2.7. Geräte	25
2.2.8. Software.....	26
2.3. Methoden	26
2.3.1. ABCR400 Genchip-Diagnostik.....	26
2.3.2. Polymerase-Kettenreaktion.....	28
2.3.3. Horizontale Gelelektrophorese.....	32
2.3.4. Reinigung von PCR-Produkten	33
2.3.5. Direkte Sequenzierung.....	33
2.3.6. Auswertung der Sequenzen.....	36
2.3.7. Beurteilung der potentiellen Spleiß-Stellen-Veränderungen	36

3. Ergebnisse	38
3.1. Identifikation neuer Sequenzvariationen	38
3.2. Analyse möglicher Effekte der neuen Varianten auf Proteinebene	44
3.2.1. Potentielle Spleiß-Stellen-Veränderungen	46
3.2.2. Einteilung der Mutationen und potentiell pathogenen Sequenzvariationen in Schweregrade.....	47
4. Diskussion	50
4.1. Verteilung und Mutationstypen der detektierten Sequenzvarianten im ABCA4-Gen.....	50
4.2. Evaluation der potentiellen Spleiß-Stellen-Veränderungen	50
4.3. Detektionsrate neuer Mutationen mittels Sequenzierung	52
4.4. Detektion von drei potentiell pathogenen Sequenzveränderungen	56
4.4.1. Potentiell komplexe Krankheitsallele	56
4.4.2. Potentiell nicht krankheitsverursachende Polymorphismen	57
4.5. Evaluation des Genotyp-Phänotyp-Modells der ABCA4-assoziierten Erkrankungen	57
4.6. Zusammenhang zwischen dem ABCA4-Gen und AMD	59
4.7. Evaluation des ABCR400 Genchips.....	61
5. Zusammenfassung und Ausblick	63
Anhang	64
Abbildungsverzeichnis	76
Tabellenverzeichnis	77
Abkürzungsverzeichnis	79
Literaturverzeichnis	83
Danksagung	91

1. Einleitung

Krankhafte Veränderungen der Netzhaut sind häufig die Ursache von starken Seheinschränkungen bis hin zur vollständigen Erblindung. Neben erworbenen Netzhautschäden handelt es sich bei diesen Defekten teils um multifaktorielle Krankheitsgeschehen, wie bei der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD), teils um monogenetische Erkrankungen, welche häufig bereits in frühen Jahren auffällig werden. Bei den rezessiv vererbten Degenerationen der zentralen Netzhaut spielt das *Adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette, sub-family A, member 4* (ABCA4)-Gen eine wichtige Rolle. Veränderungen in diesem Gen sind mit dem Morbus Stargardt (M. Stargardt, STGD) (Allikmets et al., 1997a), der autosomal rezessiven Zapfen-Stäbchen-Dystrophie (arZSD) (Maugeri et al., 2000), der autosomal rezessiven Retinitis pigmentosa (arRP) (Martinez-Mir et al., 1998), aber auch der AMD assoziiert (Allikmets et al., 1997b) (siehe 1.3).

Die Aufklärung der molekulargenetischen Architektur sowie der daraus resultierenden zellulären Mechanismen, die zur Ausbildung dieser Krankheiten führen, liefert Einblicke in deren Pathophysiologie. Davon ausgehend wird die Grundlage für jede kausale Diagnostik geliefert, es können aber auch Ansätze zur Entwicklung einer geeigneten Therapie erarbeitet werden. Dies macht die Aufdeckung der Hintergründe von hereditären Krankheiten zu einem essentiellen Bestandteil klinischer Forschung.

1.1. **ABCA4 *ATP-binding cassette, sub-family A, member 4***

ABCA4 ist ein Transmembranprotein, ein *ATP-binding cassette* (ABC)-Transporter der Unterfamilie A. Die ABC-Transporter schließen eine große Anzahl von Transportproteinen ein, die in allen Lebewesen und den meisten Geweben und Organen vorkommen. Beim Menschen sind 48 ABC-Transporter bekannt, die in sieben Subfamilien (ABCA bis ABCG) unterteilt sind. Sie dienen dem Transport unterschiedlichster Stoffe durch die Zellmembranen und einige davon sind mit der Entwicklung von Erbkrankheiten assoziiert. Die zwölf ABC-Transporter der Unterfamilie A des Menschen werden mit dem Transport von Lipiden in Verbindung

gebracht. Sowohl die Sequenz als auch die Proteinstruktur der verschiedenen ABCA-Transporter sind einander sehr ähnlich (Molday et al., 2009). Das ABCA4-Gen wurde von Allikmets et al. (1998) auf dem Chromosom 1p22.3-p22.2 lokalisiert. Der Genort hat eine Größe von ca. 150 Kilo-Basenpaaren (kb) und setzt sich aus 50 Exonen zusammen, deren Größe zwischen 33 Basenpaaren (bp) bis 266 bp variiert. Die kodierende Sequenz hat eine Länge von 6819 bp und kodiert für ein 2273 Aminosäuren Protein (Allikmets et al., 1998).

Das ABCA4-Protein wird fast ausschließlich in retinalen Fotorezeptorzellen exprimiert. Es wurde in den Außensegmenten sowohl der Zapfen als auch der Stäbchen der menschlichen Retina lokalisiert (Molday et al., 2009). Bei der Entsorgung der bei der Fototransduktion anfallenden, potentiell reaktiven Retinal-Derivate spielt der ABCA4-Transporter eine entscheidende Rolle.

Durch die Reaktion eines Teils des in der visuellen Signaltransduktionskaskade anfallenden *all-trans*-Retinals mit Phosphatidylethanolamin (PE) entsteht N-retinylidene-PE (N-Ret-PE). N-Ret-PE wird durch den ABCA4-Transporter aus dem Lumen auf die zytoplasmatische Seite der Zellmembran befördert, wo es umgewandelt und erneut in die Signaltransduktionskaskade eingeschleust werden kann. ABCA4 dient somit der Aufrechterhaltung der Homöostase in den Fotorezeptoren (Sun et al., 1999, Molday et al., 2009).

Das ABCA4-Protein besteht aus zwei aufeinanderfolgenden Hälften. Jede davon besteht aus einem Transmembransegment, dem eine große extrazelluläre Domäne (ECD), eine Transmembrandomäne (TMD) und eine stark konservierte Nukleotid-bindende Domäne (NBD) folgen. Die TMD bestehen aus fünf hydrophoben α -helikalen Segmenten, die durch kurze hydrophile Schlingen verbunden sind. Jede ECD beinhaltet multiple Oligosaccharid-Ketten. Am verlängerten Carboxy-terminalen Ende des ABCA4-Proteins befindet sich ein konserviertes sechs Aminosäuren umfassendes VFVNFA-Motiv, das höchstwahrscheinlich bei der Faltung des Proteins eine Rolle spielt (Molday et al., 2000, Suarez et al., 2002). Der Aufbau des ABCA4-Proteins ist modellhaft in Abbildung 1 (a) und 1(b) dargestellt, welche aus Molday et al. (2009) entnommen wurde.

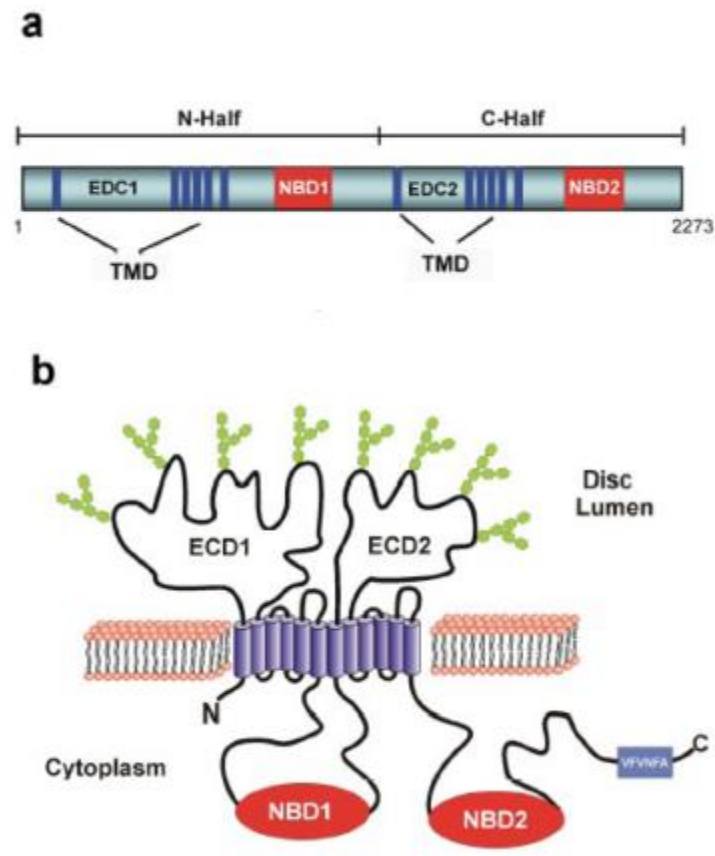


Abbildung 1: Strukturmerkmale des ABCA4-Transporters. (a) lineares Diagramm des ABCA4-Proteins; (b) topologisches Modell des ABCA4-Proteins in der Zellmembran. Jede ECD beinhaltet dabei multiple Oligosaccharid-Ketten. Abbildung entnommen aus Molday et al. (2009).

Mutationen im ABCA4-Gen verursachen unterschiedliche Formen der Netzhautdystrophie (siehe 1.3). Die pathogenen Sequenzveränderungen weisen eine starke Heterogenität auf, so kommen die häufigsten krankheitsassoziierten ABCA4-Allele (wie z.B. c.5882G>A, p.Gly1961Glu; c.2588G>C, p.Gly863Ala; c.3113C>T, p.Ala1038Val) lediglich bei ca. zehn Prozent der STGD-Patienten vor (Allikmets, 2000b). Pathogene Mutationen sind fast gleichmäßig über das gesamte ABCA4-Gen verteilt und der größte Anteil liegt als sogenannte *Missense*-Mutationen vor (Lewis et al., 1999). Daneben treten *Nonsense*-, *Frameshift*- und *In Frame*-Mutationen, Spleiß-Stellen-Veränderungen, große Deletionen und zum Teil komplexe *Rearrangements* auf (*Human Gene Mutation Database*, HGMD®, <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>, Stenson et al., 2003). Zum jetzigen Zeitpunkt sind in der Online-Datenbank HGMD® insgesamt 482 krankheitsassoziierte ABCA4-Allele gelistet (HGMD®, <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>, (Stenson et al., 2003). Zudem sind zahlreiche als nicht pathogen eingestufte Polymorphismen

bekannt (Retina International, <http://www.retina-international.org/files/sci-news/abcrmut.htm>). Die Heterozygotenwahrscheinlichkeit für ein krankheitsassoziiertes ABCA4-Allel liegt bei 1:10 bis 1:50 (Ducroq et al., 2006).

In dieser Studie wurden die 50 Exone des ABCA4-Gens bei 62 Patienten mit unterschiedlichen Makuladystrophie-Formen, einschließlich STGD, Zapfen-Stäbchen-Dystrophie (ZSD) und AMD, durch direktes Sequenzieren auf pathogene Mutationen untersucht.

1.2. Die Netzhaut des Menschen

Die Netzhaut ist die innerste Schicht der Wand des menschlichen Augapfels. Ihre Funktion ist es, Lichtreize aufzunehmen, zu verarbeiten und die entsprechenden Informationen an das Sehzentrum des Gehirns weiterzuleiten. Dazu ist sie von außen nach innen aus folgenden Schichten aufgebaut. Dem einschichtigen Pigmentepithel folgt die äußere Körnerschicht, die aus den Fotorezeptorzellen (Zapfen und Stäbchen) besteht. Anschließend wird die innere Körnerschicht durch Horizontalzellen, bipolare und amakrine Zellen, sowie Ganglienzellen gebildet. In der Nervenfaserschicht, die zusammen mit der Membrana limitans interna die Netzhaut zum Glaskörper hin begrenzt liegen die Axone der Ganglienzellen.

In den Zellen des retinalen Pigmentepithels (RPE) sind melaninhaltige Pigmentkörnchen eingelagert, wodurch das RPE zum Schutz der Retina als Lichtfilter fungiert. Als Verbindung zwischen Retina und Choroidea spielt das RPE bei der Versorgung der Netzhaut eine wichtige Rolle. Außerdem nimmt es Stoffwechselprodukte der ihm anliegenden Sinneszellschicht sowie abgestoßene Zellmembranbestandteile auf und verarbeitet diese.

Die Sinneszellschicht, ist aus etwa 120 Millionen hell-dunkel wahrnehmenden Stäbchen und sechs Millionen farbwahrnehmenden Zapfen zusammengesetzt. Durchdringt das einfallende Licht die inneren Zellschichten der Retina, trifft es auf diese Fotorezeptorzellen, welche den Lichtreiz in elektrische Signale umwandeln. Von diesen Sensorzellen, den ersten Neuronen der Sehbahn, wird der neuronale Reiz an die bipolaren Zellen (zweites Neuron der Sehbahn) und von diesen an die

Ganglienzellen (drittes Neuron der Sehbahn) weitergegeben. Die in der Nervenfaserschicht verlaufenden Axone der Ganglienzellen vereinigen sich an der Sehnervenpapille zum Nervus opticus und verlassen den Augapfel. Die Papille, in der sich keine Fotorezeptoren befinden, wird auch als blinder Fleck bezeichnet.

Den Horizontal- und amakrinen Zellen kommen die Aufgaben der Kontrastverstärkung und Bewegungsdetektion zu, indem sie die Neuronen der Retina horizontal verschalten.

In der Mitte der Netzhaut befindet sich die Macula lutea (gelber Fleck), in deren Zentrum mit einem Durchmesser von 0,2 mm die Fovea centralis liegt. Diese Grube ist die Stelle des schärfsten Sehens. Im Gegensatz zur Peripherie der Netzhaut, wo man vorwiegend lichtempfindliche Stäbchen findet, sind hier ausschließlich farbwahrnehmende Zapfen vorhanden. Eine maximale Reizauflösung wird an diesem Retinaort durch Vermeidung von Signalkonvergenz erreicht. Das heißt, jede einzelne Sinneszelle gibt ihre Signale über eine bipolare Zelle an eine Ganglienzelle weiter. Weiterhin verlaufen im Bereich der Fovea centralis keine Kapillaren und die den Zapfen nachgeschalteten Anteile der Retina sind zur Seite verlagert, um eine Streuung des einfallenden Lichts weitestgehend zu vermeiden.

Die Lichtempfindlichkeit der Zapfen ist im Vergleich zu den Stäbchen erheblich geringer. So ist bei Dämmerungslicht die Reizschwelle der Zapfen bereits unterschritten und Lichtreize werden nur noch von den Stäbchen verarbeitet und weitergeleitet. Dies führt dazu, dass bei schwacher Beleuchtung zum einen keine Farben wahrgenommen werden können und zum anderen das scharfe Sehen eingeschränkt ist.

Bei der Augenspiegelung kann man den, durch die durchscheinenden Kapillaren der Choroidea rotgefärbten, Augenhintergrund sehen. Die Retina selbst ist transparent, man kann jedoch Netzhautgefäße, RPE, Aderhautstrukturen, Macula lutea bzw. eventuelle Veränderungen dieser Strukturen beurteilen (Trepel, 2004, Greenstein 2000, Welsch, 2003).

1.3. Hereditäre Erkrankungen der zentralen Netzhaut - Die Makuladystrophien

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden Patienten molekulargenetisch untersucht, die an einer Degeneration der zentralen Netzhaut, der sogenannten Makula, in Form eines M. Stargardt oder einer ZSD leiden, bzw. deren Symptomatik und Befunde nicht eindeutig einem bekannten makulären Krankheitsbild zugeordnet werden können. Ebenfalls in diese Studie mit einbezogen wurden Patienten mit der genetisch komplexen altersabhängigen Makuladegeneration, da auch hier ein Zusammenhang mit dem ABCA4-Gen diskutiert wird (Allikmets et al., 1997b). An dieser Stelle sollen STGD, ZSD und AMD näher erläutert werden. Da in dieser Studie keine Patienten untersucht wurden, die an Retinitis pigmentosa (RP) leiden, wird auf spezielle Ausführungen zu diesem Krankheitsbild verzichtet.

1.3.1. Morbus Stargardt

Morbus Stargardt ist die häufigste Form der hereditären Makuladystrophien mit einer geschätzten Prävalenz von 1:8.000 – 1:10.000 in den USA (Klaver and Allikmets, 2003). Der Krankheitsbeginn ist meist in den ersten beiden Lebensdekaden und geht mit einer bilateralen, progressiven Minderung des zentralen Sehens, bis auf einen Visus von ca. 0,1 einher (Augustin, 2007). Trotz des starken progredienten Visusverlustes bleibt das periphere Sehen dabei zeitlebens weitgehend normal (*Online Mendelian Inheritance in Man*, OMIM, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/> MIM number: 248200). Typische Fundusveränderungen des M. Stargardt sind die unscharf begrenzten, unregelmäßigen gelblichen Flecken auf Höhe des RPE. Die Verteilung der Flecken ist variabel, meist jedoch befinden sie sich in der Makularegion. Zu Beginn der Erkrankung sind bei den Patienten oft nur minimale ophthalmoskopische Veränderungen zu sehen, im weiteren Verlauf tritt jedoch neben den Flecken auch eine Atrophie des makulären RPE auf, die zu dem charakteristischen Bild der Schießscheibenmakulopathie führt. Später kann die Makula durch ausgeprägte RPE-Defekte oder geographische Atrophien das Erscheinungsbild sog. „*beaten bronze*“ erhalten (Yanoff, 2004). Bei der Fluoreszenzangiographie fehlt typischerweise, aber nicht zwingend die Aderhautfluoreszenz am hinteren Pol, was als sog. *Dark* oder *Silent Choroid*

bezeichnet wird. Das Elektretinogramm (ERG) und das Elektrokulogramm (EOG) sind in den frühen Stadien normal, können sich aber später leicht verändert zeigen. In der Histologie zeigen sich Lipofuszinansammlungen im RPE, womit sowohl die gelblichen Flecken als auch die fluoreszenzangiographischen Auffälligkeiten erklärt werden. Der Verlauf der Krankheit variiert stark von Patient zu Patient und auch innerhalb von Familien. In manchen Fällen kann eine Abgrenzung zur ZSD (siehe 1.3.2) schwierig sein. Bisher gibt es für den M. Stargardt keine Therapie (Yanoff, 2004).

Sehr selten liegen dem M. Stargardt Mutationen im *elongation of very long chain fatty acids protein 4* (ELOVL4)-Gen zugrunde, ein Krankheitsbild mit autosomal dominantem Erbgang (Bernstein et al., 2001). Der Erbgang des M. Stargardt ist jedoch zum überwiegenden Teil autosomal rezessiv. Zugrunde liegend sind homozygote oder *compound* heterozygote Sequenzveränderungen im ABCA4-Gen (Allikmets et al., 1997a).

Durch den Defekt des ABCA4-Transporters (siehe 1.1) kann das bei der visuellen Signaltransduktionskaskade anfallende, aus all-*trans*-Retinal und PE gebildete N-Ret-PE nicht mehr vom Lumen auf die zytoplasmatische Seite der Zellmembran der Außensegmente der Fotorezeptoren befördert werden. Dies führt zur Akkumulation von N-Ret-PE und all-*trans*-Retinal in der Zellmembran (Weng et al., 1999, Molday et al., 2009). Durch die Reaktion aus N-Ret-PE mit all-*trans*-Retinal entsteht di-retinoid pyridinium-PE (A2PE) (Ben-Shabat et al., 2002). Diese Vorgänge sind schematisch in Abbildung 2 dargestellt, welche aus Molday et al. (2009) entnommen ist.

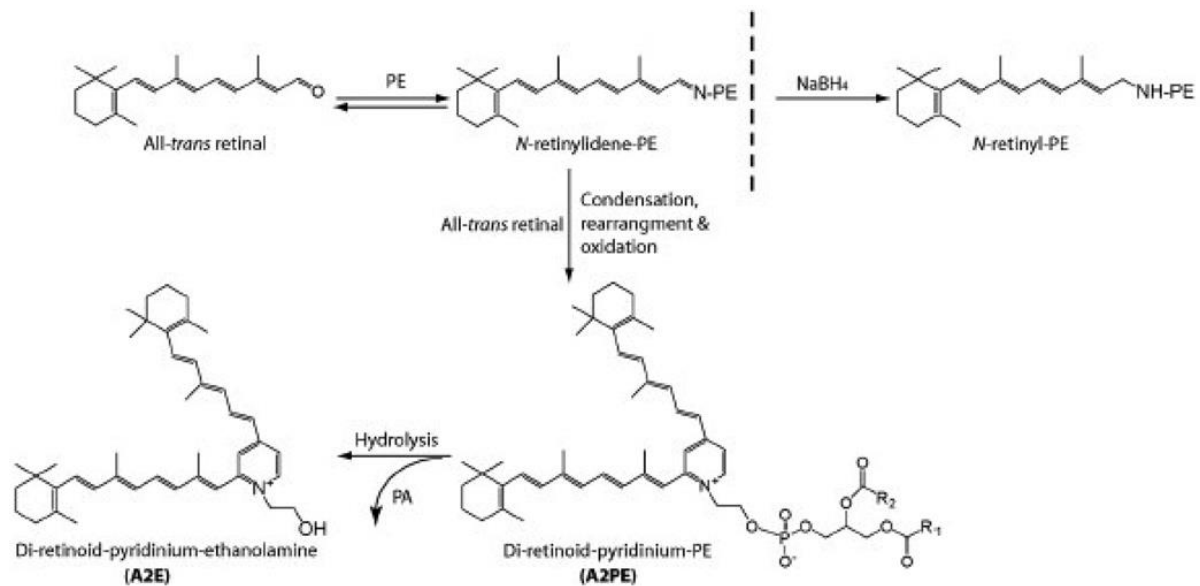


Abbildung 2: Reaktionen die, bei Verlust von ABCA4-Aktivität, zur Bildung von A2E führen. All-trans-Retinal reagiert mit PE und bildet dadurch N-Ret-PE, welches sich mit all-trans-Retinal verbinden kann, wodurch A2PE in den Außensegmenten entsteht. Nach der Phagozytose kann A2PE durch lysosomale Enzyme in den RPE-Zellen zu A2E und Phosphatidsäure (PA) hydrolysiert werden. Die Reduktion von N-RET-PE zu N-retinyl-PE durch NaBH₄ ist ebenfalls gezeigt. (Molday et al., 2009)

Die bei der ständigen Erneuerung der Außensegmentmembran anfallende gealterte Membran wird von angrenzenden RPE-Zellen phagozytiert. Hier kommt es in den Phagolysosomen zum enzymatischen Abbau der Membranteile und zur Hydrolyse von A2PE zu N-retinylidene-N-retinylethanolamin (A2E). A2E kann nicht weiter abgebaut werden und akkumuliert somit in den Zellen des RPE (Mata et al., 2000, Ben-Shabat et al., 2002, Molday et al., 2009). Hier wirkt sich A2E auf verschiedene Arten zytotoxisch auf die RPE-Zellen aus.

Neben einer Zellmembranschädigung (Sparrow et al., 1999, De and Sakmar, 2002) kann es zur Freisetzung von pro-apoptischen Proteinen aus Mitochondrien führen (Suter et al., 2000). Der phagolysosomale Abbau von Phospholipiden aus den phagozytierten Außensegmenten der Fotorezeptoren wird durch A2E inhibiert (Finnemann et al., 2002) und durch verminderte lysosomale Ansäuerung wird der Abbau von Proteinen und Glykosaminoglykanen gehemmt (Holz et al., 1999). Nicht abgebautes Material sammelt sich so in den RPE-Zellen.

Des Weiteren entstehen aus A2E unter Einfluss von blauem Licht hochreaktive Epoxide (Sparrow et al., 2002, Radu et al., 2004), welche die Fragmentierung von Desoxyribonukleinsäure (DNA) hervorrufen (Sparrow et al., 2003). Blaues Licht leitet in A2E-haltigen Zellen des RPE die Apoptose ein (Sparrow and Cai, 2001).

Der durch die oben genannten Mechanismen bedingte Funktionsverlust des RPE bzw. der Zelltod der RPE-Zellen führt zwangsläufig zum Untergang der Fotorezeptorzellen und somit zu einem Sehstärkeverlust (Weng et al., 1999, Molday et al., 2009).

Der Begriff Fundus Flavimaculatus (FFM) bezeichnete früher ein separates, dem M. Stargardt ähnliches Krankheitsbild. Es wird jetzt als eine spät beginnende, langsam progressive Form des M. Stargardt angesehen (Noble and Carr, 1979, Gelissen and De Laey, 1985). Sehr selten liegen dem M. Stargardt Mutationen im ELOVL4-Gen zugrunde, ein Krankheitsbild mit autosomal dominantem Erbgang (Bernstein et al., 2001).

1.3.2. Zapfen-Stäbchen-Dystrophie

Die Zapfen-Stäbchen-Dystrophie (ZSD) ist der Oberbegriff für eine genetisch und phänotypisch heterogene Gruppe von Netzhautdegenerationen, bei denen die Zapfenfunktion stärker oder früher beeinträchtigt wird, als die Funktion der Stäbchen.

Die Prävalenz der ZSD liegt etwa zwischen 1:20.000 bis 1:40.000 (Hamel, 2007). Symptomatisch werden betroffene Patienten meist in den ersten beiden Lebensdekaden durch progrediente Visusminderung, Blendungsempfindlichkeit, Farbwahrnehmungsstörungen und Zentralskotome. Zu Beginn der Erkrankung kommt es zentral und parazentral zu Gesichtsfeldausfällen, bei weiterem Fortschreiten ist auch das periphere Sehen beeinträchtigt. Die ophthalmoskopische Untersuchung kann unauffällig bleiben, häufig zeigen sich aber ausgeprägte Veränderungen des RPE am hinteren Pol. In späteren Stadien können periphere Knochenkörperchen, Gefäßverengungen und eine Abblassung der Papille auftreten. Im ERG fällt zunächst die Minderung der zapfenabhängigen, später auch der stäbchenabhängigen Reizantwort auf, bis es schließlich zum völligen Fehlen einer

Reizantwort kommt. Auch das EOG ist in fortgeschrittenen Stadien reduziert (Augustin, 2007).

Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es keine Therapie, die das Fortschreiten der Erkrankung aufhalten oder die Sehkraft wiederherstellen könnte (Hamel, 2007).

Einer ZSD kann sowohl ein autosomal dominanter, als auch ein autosomal rezessiver oder X-chromosomaler Erbgang zugrunde liegen. Zahlreiche Gene sind für die unterschiedlichen Formen der ZSD beschrieben (Kohl, 2009). Das bedeutendste unter den mit der autosomal rezessiven ZSD assoziierten Genen ist das ABCA4-Gen (Maugeri et al., 2000) (siehe 1.1). Mutationen in diesem Gen wurden ursprünglich zwar als Ursache des M. Stargardt (siehe 1.3.1) identifiziert (Allikmets et al., 1997a), in weiteren Arbeiten wurde jedoch nachgewiesen, dass sie auch der arZSD (Maugeri et al., 2000) und der arRP (Martinez-Mir et al., 1998) zugrunde liegen und eine Assoziation mit AMD wird diskutiert (Allikmets et al., 1997b). Die Differenzierung zwischen einem M. Stargardt und einer arZSD ist klinisch nicht immer möglich und im Spätstadium wird auch die klinische Abgrenzung zur arRP schwierig. Die Krankheitsbilder gehen ineinander über (Augustin, 2007).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden neben den Patienten, die mit einem M. Stargardt oder einer ZSD diagnostiziert wurden auch Patienten untersucht, die keinem der beiden Krankheitsbilder eindeutig zugeordnet werden konnten.

1.3.3. Altersabhängige Makuladegeneration

Die altersabhängige Makuladegeneration ist eine häufige Erkrankung des alternden Auges, bei der es durch Schäden an der Netzhaut der Makula zu einem zentralen Sehschärfeverlust kommt (Bird, 2010). Sie ist der häufigste Grund für eine Verschlechterung der Sehstärke im Alter. Studien in den USA haben gezeigt, dass bis zu 30% der Menschen ab 75 Jahren an milden Formen der AMD leiden, während bei etwa sieben Prozent dieser Altersgruppe weiter fortgeschrittene Stadien zu finden sind (Allikmets et al., 1997b). In der westlichen Welt ist die AMD ursächlich für über 50% der Erblindungsfälle (Bird, 2010).

Klinisch können im Spätstadium die trockene und die feuchte bzw. exsudative Form der AMD voneinander abgegrenzt werden. Die Merkmale der trockenen AMD, die bei ca. 80% der Patienten vorliegt sind Unregelmäßigkeiten in der Pigmentierung des RPE, Drusen im oder unter dem RPE und geographische Atrophie. Typischerweise liegt eines oder mehrere dieser Merkmale vor. Etwa 20% der Patienten weisen eine feuchte AMD auf. Dabei kommt es entweder zur serösen Netzhautablösung oder einer choroidalen bzw. retinalen Neovaskularisation oder beidem. Starke Sehkraftverluste gehen mit einer geographischen Atrophie des RPE oder der exsudativen Form der Krankheit einher (Allikmets et al., 1997b).

Auch bezüglich der therapeutischen Möglichkeiten muss eine Unterscheidung zwischen feuchter und trockener AMD gemacht werden. So liegt gegen die trockene Form der AMD neben sich in der Frühphase befindenden chirurgischen Therapieansätzen (Joussen et al., 2007, Caramoy et al., 2010) aktuell keine anerkannte Behandlungsmöglichkeit vor. Hier kann lediglich Prophylaxe betrieben werden, um die Krankheitsentwicklung oder -progression hinauszuzögern (Damico et al., 2012). Dies geschieht z.B. durch die Vermeidung von Risikofaktoren wie Rauchen (Seddon et al., 1996, Tomany et al., 2004) und Adipositas (Seddon et al., 2003) oder die Zufuhr bestimmter hochdosierter Nahrungsergänzungsmittel wie Antioxidantien (v.a. Vitamin C, Vitamin B und β -Carotin), Spurenelemente (Zink) und ungesättigte Omega-3-Fettsäuren, deren protektive Wirkung in mehreren Studien dokumentiert werden konnte (AREDSRG, 2001b, AREDSRG, 2001a, Christen et al., 2011).

Bei der feuchten Form der AMD hingegen gibt es neben den oben genannten prophylaktischen gute therapeutische Möglichkeiten. Neben der thermischen Fotokoagulation (MPSG, 1991) und der fotodynamischen Therapie mit Verteporfin (Wormald et al., 2005) stellt die intravitreale Injektion von *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)-Inhibitoren heute die Therapie der Wahl dar (DOG, 2009). Der VEGF ist der für die choroidale Neovaskularisation entscheidende stimulierende Faktor (Miller et al., 1994, Aiello et al., 1995). Durch seine Inhibition kann daher der zum Sehkraftverlust führende Prozess gehemmt werden (Adamis et al., 1996). Drei Präparate finden derzeit in Deutschland Anwendung. Ranibizumab (Rosenfeld et al., 2006) als Mittel der Wahl, Bevacizumab (Chen et al., 2007, Aisenbrey et al., 2007) im

off-label-use und Pegaptanib (Gonzales, 2005) im Rahmen der *second-line*-Therapie (DOG, 2012). Alternativ kommen auch unterschiedliche Kombinationen der oben genannten Therapieformen oder z.B. Kombinationen mit intravitrealen Steroiden zum Einsatz um die synergistischen Effekte der einzelnen Methoden zu nutzen (Chaudhary et al., 2007, Liggett et al., 2006, Wormald et al., 2005, Figurska et al., 2010).

Bei der AMD handelt es sich um eine multifaktorielle Krankheit. Sowohl Umweltfaktoren wie Zigarettenrauchen (Seddon et al., 1996, Tomany et al., 2004), Adipositas (Seddon et al., 2003) und Ernährung (Cho et al., 2004, Tan et al., 2009), (Seddon et al., 2010), als auch genetische Faktoren (Seddon et al., 1997, Seddon et al., 2005) spielen bei ihrer Entstehung eine begünstigende bzw. hemmende Rolle.

Dabei wird von Allikmets et al. (1997b) auch auf das ABCA4-Gen als genetischer Suszeptibilitätsfaktor verwiesen. Wobei zu beachten ist, dass zwischen dem rezessiven M. Stargardt (Allikmets et al., 1997a) und der trockenen altersabhängigen Makuladegeneration klinisch gewisse Ähnlichkeiten zu verzeichnen sind (Allikmets et al., 1997b). Auch histopathologisch bestehen Parallelen zwischen beiden Krankheiten, wie die Ansammlung von Drusen im und unter dem RPE und die progressive Atrophie des RPE der Makula, was in beiden Fällen früher oder später zum Funktionsverlust der Fotorezeptoren und damit zur Verschlechterung der Sehstärke führt (Allikmets et al., 1997b, Sun et al., 1999). Die Ergebnisse der von Allikmets et al. (1997b) durchgeführten molekulargenetischen Untersuchungen deuten darauf hin, dass das Vorliegen einer monoallelischen pathogenen ABCA4-Variante für die AMD disponieren könnte. Alternativ wird diskutiert, dass auch zwei milde Mutation oder eine milde in Kombination mit einer moderaten Mutation das Risiko an einer AMD zu erkranken erhöhen, so lange die Restfunktion des ABCA4-Transporters ausreichend ist (Maugeri et al., 1999) (siehe 1.3.4). Von einigen anderen Arbeiten wurden die Resultate der Studie von Allikmets et al. (1997b) nicht bestätigt bzw. angefochten und sogar widerlegt (Dryja, 1998, Klaver, 1998, Stone et al., 1998, De La Paz et al., 1999, Rivera et al., 2000), während weitere Studien ebenfalls auf eine Assoziation zwischen AMD und ABCA4 hindeuten (Souied et al., 2000, Allikmets, 2000a, Fritsche et al. 2012).

1.3.4. Genotyp-Phänotyp-Modell der mit ABCA4-Mutationen assoziierten Netzhauterkrankungen

Mutationen im ABCA4-Gen verursachen ein Spektrum an verwandten Netzhautdegenerationen unterschiedlicher Schweregrade. Bei den rezessiv vererbten Krankheiten stellt der M. Stargardt den mildesten Phänotyp, die arZSD einen moderaten bis schweren Phänotyp und die arRP den schwersten Phänotyp dar (Maugeri et al., 1999). Das von mehreren Autoren vorgestellte Genotyp-Phänotyp-Modell (Maugeri et al., 1999, van Driel et al., 1998, Cremers et al., 1998, Shroyer et al., 1999, Rozet et al., 1998) schlägt vor, dass der Schweregrad der Erkrankung invers linear von der Restfunktion des ABCA4-Transportes abhängig ist. Dazu werden die pathogenen Mutationen in verschiedene Schweregrade eingeteilt, von mild, über moderat bis schwer, was sich jeweils auf die Restfunktion des ABCA4-Transportes bezieht. Eine schwere Mutation geht mit einem kompletten Funktionsverlust des Proteins einher, bzw. hat schädlichen Einfluss auf das Überleben der Fotorezeptoren. Bei einer milden Mutation bleibt eine Partialfunktion des Transportes erhalten, bei einer moderaten Mutation ist diese Restfunktion geringer. Laut dieses Modells verursacht das Vorliegen zweier schwerer Mutationen, sogenannter Null-Mutationen, eine arRP. Eine arZSD wird durch ein Null-Allel in Kombination mit einer moderaten Mutation ausgelöst. Einem M. Stargardt können entweder zwei moderate Mutationen oder die Kombination einer milden mit einer Null-Mutation zugrunde liegen (Maugeri et al., 1999, van Driel et al., 1998, Rozet et al., 1998, Cremers et al., 1998). Auch die AMD, deren Zusammenhang mit Mutationen im ABCA4-Gen noch nicht endgültig geklärt ist (siehe 1.3.3), würde in dieses Modell passen. Liegt durch eine einzelne schwere oder moderate Mutation oder eventuell auch bei zwei milden Mutationen bzw. einem milden zusammen mit einem moderaten pathogenen ABCA4-Allel eine zwar ausreichende, aber eingeschränkte ABCA4-Restfunktion vor, würde das Risiko eine AMD zu entwickeln steigen (Maugeri et al., 1999, van Driel et al., 1998, Lewis et al., 1999). In Abbildung 3 ist das Genotyp-Phänotyp-Modell graphisch dargestellt.


ABCA4-Aktivität									
Phänotyp	Normal	Normal/ AMD			STGD		arZSD	arRP	
ABCA4-Allel 1		moderat	schwer	mild	moderat	schwer	schwer	schwer	
ABCA4-Allel 2			mild		mild	moderat	mild	moderat	schwer

Abbildung 3: Genotyp- Phänotyp-Modell. Darstellung der Korrelation zwischen der ABCA4-Transporter-Restaktivität und der Schwere des Krankheitsbildes. Die arRP ist der schwerste rezessiv vererbte Phänotyp, STGD der mildeste. Eine Prädisposition für AMD liegt eventuell vor bei einem moderat oder schwer pathogenen ABCA4-Allel, bzw. zwei milden Mutationen oder einer Kombination aus milder und moderater Mutation. Die Abbildung wurde übernommen und angepasst nach Maugeri et al. (2000).

Allerdings stellt dieses Modell wohl nur eine starke Vereinfachung der tatsächlichen Verhältnisse dar. So lässt es zum Beispiel Umwelteinflüsse oder die Möglichkeit der Beeinflussung des Krankheitsverlaufes durch andere Gene (Epistasis) völlig außer Acht (Klevering et al., 2005, Zhang et al., 1999). Da mit den, zum Zeitpunkt dieser Arbeit, gängigen Untersuchungsmethoden nur ca. 60% der ABCA4-Mutationen nachgewiesen werden können (Lewis et al., 1999), muss auch in Betracht gezogen werden, dass unentdeckte Mutationen die Ausbildung des Phänotyps bedingen könnten. Außerdem muss bedacht werden, dass die Einteilung der pathogenen Mutationen in die drei Kategorien mild, moderat und schwer oft auf theoretischen Überlegungen und nicht auf experimentellen Untersuchungen basiert. Die Restaktivität des ABCA4-Proteins kann sich folglich anders verhalten, als vorhergesagt (Klevering et al., 2005).

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Mutationen im ABCA4-Gen verursachen unterschiedliche Formen der Makuladegeneration, wie den autosomal-rezessive M. Stargardt, die autosomal-rezessive Zapfen-Stäbchen-Dystrophie und die autosomal rezessive Retinitis pigmentosa (Allikmets et al., 1997a, Maugeri et al., 2000, Martinez-Mir et al., 1998). Beim ABCA4-Gen handelt es sich um ein großes genomisch etwa 150 kb

umfassendes Gen, das in 50 Exonen ein Transkript von 6819 bp kodiert. Die krankheitsassoziierten Sequenzveränderungen sind heterogen (Allikmets, 2000b) und über die gesamte kodierende Region des Gens zufällig verteilt (Lewis et al., 1999). Da das direkte Sequenzieren nach der Kettenabbruchmethode von Sanger et al. (1977) in der molekulargenetischen Routinediagnostik der oben genannten Krankheiten aufwendig und kostspielig ist, wird in dieser Arbeit auf den ABCR400 Genchip (siehe 2.3.1) zurückgegriffen. Dieser Genchip testet nach der *arrayed primer extension* (APEX) -Methode auf bereits bekannte, auf dem Chip enthaltene Sequenzvariationen (Jaakson et al., 2003). Zum Zeitpunkt dieser Studie waren 486 Polymorphismen und Mutationen in die Chip-Diagnostik eingeschlossen (siehe Tabelle 16). Bei dieser Analyse-Technik kann pro Patient häufig nur eine der beiden zu erwartenden pathogenen Sequenzveränderungen detektiert werden, was die Frage nach der zweiten Mutation offen lässt. Im Rahmen der Routinediagnostik des humangenetischen Instituts mittels ABCR400 Genchip wurde bei 54 Patienten lediglich ein Mutationsallel detektiert.

Primäres Ziel dieser Studie war es daher durch direkte Sanger-Sequenzierung (Sanger et al., 1977, siehe 2.3.5) aller ABCA4-Exone und benachbarter intronischer Bereiche das zweite krankheitsverursachende ABCA4-Allel zu detektieren. Dies dient zum einen der Diagnosesicherung, was für die Prognose des einzelnen Patienten und für die Risikoabschätzung bei der Familienplanung bedeutsam ist. Zum anderen soll das Spektrum der bekannten Mutationen erweitert werden, um eine breitere Basis für Diagnostik und Forschung am ABCA4-Gen und den damit assoziierten Erkrankungen zu bieten. Eine sich daraus ergebende Fragestellung ist, ob es in allen Fällen möglich ist, eine zusätzliche Mutation zu finden bzw. falls nicht, bei welchem Prozentsatz. Weiter müsste in diesem Fall diskutiert werden, ob die Ursache dafür in gewissen Einschränkungen der Detektionsmethode liegt oder ob bei den untersuchten Patienten tatsächlich nur eine ABCA4-Mutation vorliegt.

In der Literatur wird eine Assoziation zwischen dem ABCA4-Gen und der AMD kontrovers diskutiert (Allikmets et al., 1997b, Rivera et al., 2000, Stone et al., 1998, De La Paz et al., 1999) (siehe 1.3.3). Im Zuge dieser Doktorarbeit wurden daher auch AMD-Patienten eingeschlossen, um einen Zusammenhang zwischen ABCA4-Veränderungen und AMD-Pathogenese weiter zu untersuchen.

Schließlich soll das in früheren Arbeiten vorgeschlagene Genotyp-Phänotyp-Modell zu ABCA4-Defekten (Maugeri et al., 1999, Cremers et al., 1998, Rozet et al., 1998, van Driel et al., 1998) (siehe 1.3.4) in Bezug auf die neu entdeckten Sequenzvarianten geprüft werden. Gleichzeitig soll abgeschätzt werden, wie nützlich die gegenwärtige Version des ABCR400 Genchip für die molekulargenetische Diagnostik des ABCA4-Gens ist.

2. Material und Methoden

2.1. Das Patientenkollektiv

2.1.1. Patienten mit M. Stargardt- und Zapfen-Stäbchen-Dystrophie

Im Rahmen der molekulargenetischen Routinediagnostik wird die genomische DNA von M. Stargardt-, bzw. ZSD-Patienten mit dem ABCR400 Genchip (ASPER Biotech, Tartu, Estland) auf Veränderungen im ABCA4-Gen geprüft. Dieser Genchip funktioniert nach der APEX-Methode und testet zum Zeitpunkt dieser Studie 486 bekannte Mutationen und Polymorphismen welche in Tabelle 16 im Anhang aufgelistet sind (Jaakson et al., 2003). Einzelheiten zum ABCR400 Genchip sind dem Gliederungspunkt 2.3.1 zu entnehmen.

Patienten, bei denen, in den Jahren 2003-2006, durch diese Untersuchung nur eines der beiden zu erwartenden pathogenen ABCA4-Allele identifiziert werden konnte, wurden in diese Studie eingeschlossen. Insgesamt handelt es sich hierbei um 35 Personen mit der Diagnose M. Stargardt, 13 ZSD-Patienten und sechs Patienten die an einer Form der Makuladegeneration leiden, die keinem der beiden Krankheitsbild klar zugeordnet werden kann (siehe Tabelle 1, siehe 1.3). Insgesamt 25 der 54 Patienten wurden von Herrn Prof. Dr. med. U. Kellner und Frau Dr. med. A. Renner (damalige Affiliation: Augenklinik des Universitäts-Klinikums Benjamin Franklin, Berlin) überwiesen. Sechs weitere Patienten wurden der Studie über Herrn Dr. TJL de Ravel vom Centrum voor Menselijke Erfelijkheid in Leuven, Belgien zugeführt und weitere 23 Personen wurden durch Augenärzte aus verschiedenen Städten Deutschlands bzw. London und Innsbruck überwiesen. Der Tabelle 1 ist die jeweils bekannte, durch den ABCR400 Genchip detektierte, monoallelische Mutation eines jeden Patienten zu entnehmen. Bei fünf dieser Patienten (G03-3007, G05-0478, G04-0186, M06-0197, G03-2788) und einem an AMD erkrankten Patienten (L-0100-GA, siehe 2.1.2) sind zwei Mutationen, in Exon 12 und 21 angegeben. Die beiden Sequenzveränderungen p.Leu541Pro und p.Ala1038Val liegen jedoch als komplexes Allel auf einem Chromosom vor und sind daher als monoallelische Mutation zu werten (Rivera et al., 2000). Die Nomenklatur bezieht sich, wie auch bei allen

anderen in dieser Arbeit beschriebenen Variationen, auf internationale Empfehlungen von den Dunnen and Antonarakis (2000). Als ABCA4-complementary DNA (cDNA) Referenzsequenz wurde die *National Center for Biotechnology Information (NCBI) Reference Sequence: NM_000350 (Nucleotide Database, NCBI, Bethesda, Maryland, USA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/105990540>)* verwendet.

Tabelle 1: STGD- und ZSD-Patienten, sowie Patienten, die weder dem einen noch dem anderen Krankheitsbild eindeutig zugeordnet werden konnten, mit initial bekannter monoallelischer Mutation bei Diagnosestellung.

Patienten-ID	Durch den ABCR400 Genchip detektierte Mutation			
	Exon	Nukleotidveränderung	Effekt auf Proteinebene	Referenz
STGD-Patienten				
G03-1814	17	c.2588G>C	p.Gly863Ala	Allikmets et al., 1997a
G03-2346	17	c.2588G>C	p.Gly863Ala	Allikmets et al., 1997a
G03-3214	39	c.5565-10T>C	Spleiß-Stellen-Veränderung	Rivera et al., 2000
G03-3217	17	c.2588G>C	p.Gly863Ala	Allikmets et al., 1997a
G03-3232	39	c.5565-10T>C	Spleiß-Stellen-Veränderung	Rivera et al., 2000
G03-3537	44	c.6079C>T	p.Leu2027Phe	Allikmets et al., 1997a
G03-3675	39	c.5565-10T>C	Spleiß-Stellen-Veränderung	Rivera et al., 2000
G03-3687	35	c.4916T>G	p.Leu1639X	nicht vorherbeschrieben
G04-0186	12/21	c.1622T>C, c.3113C>T	p.Leu541Pro, p.Ala1038Val	Rivera et al., 2000
G04-0860	45	c.6229C>T	p.Arg2077Trp	Allikmets et al., 1997a
G04-1886	48	c.6529G>A	p.Asp2177Asn	Allikmets et al., 1997b
G04-2042	28	c.4139C>T	p.Pro1380Leu	Lewis et al., 1999
G04-2403	33	c.4773+1G>T	Spleiß-Stellen-Veränderung	Rivera et al., 2000
G04-3175	40	c.5714+5G>A	Spleiß-Stellen-Veränderung	Rivera et al., 2000
G05-0022	40	c.5714+5G>A	Spleiß-Stellen-Veränderung	Rivera et al., 2000
G05-1110	42	c.5882G>A	p.Gly1961Glu	Allikmets et al., 1997b
G05-1365	30	c.4535C>T	p.Pro1512Leu	Fumagalli et al., 2001
G05-1854	42	c.5882G>A	p.Gly1961Glu	Allikmets et al., 1997b
G05-2251	15	c.2300T>A	p.Val767Asp	Simonelli et al., 2000
G05-2281	21	c.3113C>T	p.Ala1038Val	Allikmets et al., 1997a
G05-2423	8	c.1018T>C	p.Tyr340His	Lewis et al., 1999
M05-0011-2	42	c.5882G>A	p.Gly1961Glu	Allikmets et al., 1997b
M05-0025	42	c.5882G>A	p.Gly1961Glu	Allikmets et al., 1997b
M06-0005	42	c.5882G>A	p.Gly1961Glu	Allikmets et al., 1997b
M06-0006-1	21	c.3113C>T	p.Ala1038Val	Allikmets et al., 1997a
M06-0012	39	c.5565-10T>C	Spleiß-Stellen-Veränderung	Rivera et al., 2000
M06-0069	42	c.5882G>A	p.Gly1961Glu	Allikmets et al., 1997b
M06-0088	29	c.4283C>T	p.Thr1428Met	Allikmets et al., 1997b
M06-0103	47	c.6415C>T	p.Arg2139Trp	Lewis et al., 1999
M06-0126	42	c.5882G>A	p.Gly1961Glu	Allikmets et al., 1997b
M06-0159	18	c.2690C>T	p.Thr897Ile	Simonelli et al., 2000

Patienten-ID	Durch den ABCR400 Genchip detektierte Mutation			
	Exon	Nukleotidveränderung	Effekt auf Proteinebene	Referenz
M06-0171	29	c.4297G>A	p.Val1433Ile	Lewis et al., 1999
M06-0197	12/21	c.1622T>C, c.3113C>T	p.Leu541Pro, p.Ala1038Val	Rivera et al., 2000
M06-0212	42	c.5882G>A	p.Gly1961Glu	Allikmets et al., 1997b
M06-0204	13	c.1928T>G	p.Val643Gly	Rosenberg et al., 2007
ZSD-Patienten				
G03-2000	28	c.4234C>T	p.Gln1412X	Maugeri et al., 1999
G03-2408	30	c.4537delC	p.Gln1513fsX12	Aguirre-Lamban et al., 2009
G03-2788	12/21	c.1622T>C, c.3113C>T	p.Leu541Pro, Ala1038Val	Rivera et al., 2000
G04-1645	42	c.5882G>A	p.Gly1961Glu	Allikmets et al., 1997b
G04-1885	43	c.5923G>C	p.Gly1975Arg	Rivera et al., 2000
G05-0444	42	c.5882G>A	p.Gly1961Glu	Allikmets et al., 1997b
G05-1080	42	c.5882G>A	p.Gly1961Glu	Allikmets et al., 1997b
G05-2615	38	c.5413A>G	p.Asn1805Asp	Paloma et al., 2001
M06-0037	30	c.4469G>A	p.Cys1490Tyr	Lewis et al., 1999
ZSD0402	45	c.6148G>C	p.Val2050Leu	Allikmets et al., 1997a
ZSD0410	39	c.5565-10T>C	Spleiß-Stellen-Veränderung	Rivera et al., 2000
ZSD0422	31	c.4610C>T	p.Thr1537 Met	Rivera et al., 2000
G05-0867	13	c.1928T>G	p.Val643Gly	Rosenberg et al., 2007
Patienten, welche weder STGD noch ZSD eindeutig zugeordnet werden können				
G03-3007	12/21	c.1622T>C, c.3113C>T	p.Leu541Pro, p.Ala1038Val	Rivera et al., 2000
G03-3269	6	c.768G>T	Spleiß-Stellen-Veränderung	Maugeri et al., 1999
G03-3301	12	c.1622T>C, c.3113C>T	p.Leu541Pro, p.Ala1038Val	Rivera et al., 2000
G05-0478	12/21	c.1622T>C, c.3113C>T	p.Leu541Pro, p.Ala1038Val	Rivera et al., 2000
M05-0012	39	c.5565-10T>C	Spleiß-Stellen-Veränderung	Rivera et al., 2000
M06-0180	39	c.5565-10T>C	Spleiß-Stellen-Veränderung	Rivera et al., 2000

2.1.2. Patienten mit altersabhängiger Makuladegeneration

Der Zusammenhang zwischen der Entwicklung von AMD und Mutationen im ABCA4-Gen ist unzureichend geklärt (siehe 1.3.3). Von Frau Dr. med. M. Fleckenstein, Universitäts-Augenklinik Bonn, wurden Patienten, die eine AMD mit Stargardt-ähnlichen Augenhintergrund-Veränderungen aufweisen an das Institut für Humangenetik Regensburg überwiesen, um sie auf Variationen im ABCA4-Gen zu untersuchen. Dies geschah, um individuelle Ursachen der Krankheitsentwicklung zu untersuchen und die Assoziation von AMD mit dem ABCA4-Gen, auch im Hinblick auf das in 1.3.4 näher erläuterte Genotyp-Phänotyp-Modell weiter zu erforschen. Bei sechs dieser Patienten wurde mit dem ABCR400 Genchip eine Mutation gefunden. Sie wurden zusammen mit zwei, an normal verlaufender AMD erkrankten Kontroll-

Patienten, bei denen ebenfalls eine pathogene Veränderung im ABCA4-Gen entdeckt wurde in diese Studie aufgenommen. Die Patienten und deren bekannte Mutation sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: AMD-Patienten mit bekannter ABCA4-Mutation und AMD-Phänotyp.

Patienten-ID	Durch den ABCR400 Genchip detektierte Mutation			
	Exon	Nukleotidveränderung	Effekt auf Proteinebene	Referenz
STGD-ähnlicher AMD-Phänotyp				
H-0053MW	35	c.4859_4864delATAACAinsTCCT	p.Asn1620IlefsX25	Webster et al., 2001
H-0142GM	13	c.1928 T>G	p.Val643Gly	Rosenberg et al., 2007
H-0144HK	21	c.3113 C>T	p.Ala1038Val	Allikmets et al., 1997a
L-0099MK	21	c.3113 C>T	p.Ala1038Val	Allikmets et al., 1997a
L-0100-GA	12, 21	c.1622T>C, c.3113C>T	p.Leu541Pro, p.Ala1038Val	Rivera et al., 2000
M-0013GA	33	c.4773+3A>G	Spleiß-Stellen-Veränderung	Braun et al., 2013
Normaler AMD-Phänotyp				
H-193-GA	6	c.634C>T	p.Arg212Cys	Gerber et al., 1998
W-042-GA	48	c.6529G>A	p.Asp2177Asn	Allikmets et al., 1997b

2.2. Material

2.2.1. Patienten-DNA

Die verwendete Patienten-DNA wurde bereits im Rahmen der Routinediagnostik aus peripheren Lymphozyten präpariert und anschließend bei - 20°C aufbewahrt.

2.2.2. Oligonukleotid-Primer

Die Oligonukleotid-Primer für die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, siehe 2.3.2) und das *Cycle Sequencing* (siehe 2.3.5) wurden von der Firma Metabion, Martinsried, Deutschland bezogen. Sie wurden so ausgewählt, dass die Sequenzierung von einem DNA-Strang her ausreichend war, um das jeweilige Exon und 20 Basen im vorangehenden, sowie 10 Basen im nachfolgenden Intron lesen zu können. Lediglich bei Exon 4 war es dazu nötig beide Richtungen des DNA-Stranges (*forward* und *reverse*) zu sequenzieren. Zur Ermittlung der passenden Primersequenzen wurde die *Primer3-Software* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>, siehe 2.2.8) genutzt. Zusätzlich wurde mittels Kontrolle durch die *Human BLAT Search – Software* (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>, siehe 2.2.8) darauf geachtet, dass

die Primer nicht über bekannten Einzelpolymorphismen (sog. single nucleotide polymorphisms, SNPs) liegen. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Oligonukleotid-Primer IDs und Sequenzen für PCR und Cycle Sequencing.

Exon	Primer	Richtung	Sequenz (5'-3')
1	ABCA4 ex1-F	<i>Forward</i>	AATCTGGTCTTCGTGTGGTC
	ABCR-Ex1/GC	<i>Reverse</i>	GTTTATTTGCTCCACACCTC
2	ABCA4 ex2 F	<i>Forward</i>	GATCTGAGGAGGGCTGTGTC
	ABCA4 ex2 R	<i>Reverse</i>	TTTCTAGACAAAAGGCCCAGA
3	ABCR3-For	<i>Forward</i>	CCTGCTTGGTCTCCATGAC
	ABCA4 ex3 R	<i>Reverse</i>	ACACTCAGTGCTCCATGCTC
4	ABCR4-GC_neu	<i>Forward</i>	CCTTATTAATGAGGCTTTGTC
	ABCRex4R	<i>Reverse</i>	ATAGGTGAGGGAAATGATGC
5	ABCA4 ex5 F	<i>Forward</i>	CCATTTCCCCTTCAACACCC
	ABCR5-Rev	<i>Reverse</i>	GTGCTTCCCTCCCCTCCAG
6	ABCR6-For	<i>Forward</i>	CTACCACAGGGCAGTTTCTA
	ABCA4-ex6-R	<i>Reverse</i>	CTGGAGCTTTTGCAAGGATT
7	ABCR Ex7-GC	<i>Forward</i>	GATCAGACTGTGCCTATGTG
	ABCR7 Ex7-Rev	<i>Reverse</i>	ATAAGTGGGGTAAATGGTGG
8	ABCR8-for	<i>Forward</i>	AGATTATGACTGTAGCTGCC
	ABCA4 ex8 R	<i>Reverse</i>	CCCAGGTTTGGTTTCACCTA
9	ABCR 9-GC	<i>Forward</i>	AGGTTACAAGCAATGGGGAG
	ABCR9-rev	<i>Reverse</i>	TCTGGGAGGTCCAGGGTAC
10	ABCA4-ex10-F2	<i>Forward</i>	CCAAAAGTTCTCTCTCACTTTTCT
	ABCA4-ex10-R	<i>Reverse</i>	CCAATAGCGATTAACCTTTTCC
11	ABCA4 ex11 F	<i>Forward</i>	AAGCTCACCAGCTCTTCAGG
	ABCR-Ex11-R	<i>Reverse</i>	AGCTCTGGCCCCACTCATG
12	ABCA4 ex12 F	<i>Forward</i>	ACAGCAGCCCTTATCCTGTG
	ABCR_ex12Rneu	<i>Reverse</i>	AGTCTCAATCCCTTTCTCTC
13	ABCR_ex13F	<i>Forward</i>	TCGGGAGGTGTGAGTGAGC
	ABCA4-ex13-R	<i>Reverse</i>	GTCAGAGCTCCATGCTCTCC
14	ABCR14-for	<i>Forward</i>	CTGCCTCTACCAGGTACAG
	ABCR14-Rev2	<i>Reverse</i>	AATCCAGGCACATGAACAGG
15	ABCA4-ex15-F	<i>Forward</i>	AGCACATGGAGTGTGCGTAG
	ABCA4-ex15-R	<i>Reverse</i>	TGCCCTGTACATTTTAGCC
16	ABCR16F	<i>Forward</i>	CTGTTGCATTGGATAAAAGGC
	ABCR16-GC	<i>Reverse</i>	GATGAATGGAGAGGGCTGG
17	ABCA4-ex17-F	<i>Forward</i>	CTGCGTAAGGTAGGATAGGG
	ABCR17-GC	<i>Reverse</i>	CACACCGTTTACATAGAGGGC
18	ABCR18F	<i>Forward</i>	CTCTCCCCTCCTTTCTG
	ABCR18-GC/2	<i>Reverse</i>	CTTTTCTCGCCTCTG
19	ABCR-Ex19-F	<i>Forward</i>	AGGTGACGTTATAGGCAGAA
	ABCR-Ex19-R	<i>Reverse</i>	TGGGAAAGAGTAGACAGCCG
20	ABCA4-ex20-F	<i>Forward</i>	GCCCTCCTAAGGCATGTTG
	ABCR-Ex20-R	<i>Reverse</i>	TATCTCTGCCTGTGCCAG
21	ABCR-Ex21-F	<i>Forward</i>	GTAAGATCAGCTGCTGGAA

Exon	Primer	Richtung	Sequenz (5'-3')
	ABCR-Ex21R	Reverse	GAAGCTCTCCTGCTCCAAGC
22	ABCA4-ex22-F	Forward	AGGTACCCCCACAATGCCA
	ABCA4-ex22-R	Reverse	AGCCCAGCCCAGGAGACTG
23	ABCREx23-GC	Forward	TTTTTGCAACTATATAGCCAGG
	ABCR-Ex23-R	Reverse	AGCCTGTGTGAGTAGCCATG
24	ABCR-Ex24F	Forward	GCATCAGGGAGAGGCTGTC
	ABCA4-ex24-R	Reverse	CCTGCAGAAGTACCCAGTGTT
25	ABCA4-ex25-F	Forward	GGTAACCTCACAGTCTTCC
	ABCA-ex25-R	Reverse	GGGAACGATGGCTTTTTGC
26	ABCA4 26F	Forward	ACTGTGTGCTTACGTTTTTG
	ABCR26-rev1	Reverse	GATGGAACCTGGGAGGGAG
27	ABCA4-ex27-F	Forward	TCATTGCTGACTTAAATGAAGAGG
	ABCA4-ex27-R	Reverse	CTAAAGAGGGTGCTCCTTGC
28	ABCR28-GC	Forward	ACGTGTGACATCTCCATGCC
	ABCR28-Rev	Reverse	CCCTTCTAAGCAGCATGTGA
29	ABCR29-GC	Forward	AGGCTCTGAGTTGCATGATG
	ABCR29-Rev	Reverse	CTGCCATCTTGAACCCACC
30	ABCA4-ex30-F	Forward	AAGAAAGGGCCTGGGTCTAA
	ABCA4-ex30-R-1	Reverse	TGCCAGTTTGAAATGTTAGTTTG
31	ABCR31-For	Forward	TATAAGTCCTCAAGTCCAAG
	ABCR31-GC	Reverse	AATATCTTCTACAGGGAGCC
32	ABCR32-For	Forward	TAACGGCACTGCTGTACTTG
	ABCR32-GC	Reverse	TCATGGCTGTGAGGTGTGC
33	ABCR EX33-For	Forward	TTCATGTTTCCCTACAAAACCC
	ABCR33-GC	Reverse	AAAATCCTACTCAAATCTCCAG
34	ABCR EX33-For	Forward	TTCATGTTTCCCTACAAAACCC
	ABCR34_R	Reverse	TCAGCAGGAGGAGGGATGGA
35	ABCA4-ex35-F	Forward	ACCAAACCCTTCTGCTT
	ABCA4-ex35-R	Reverse	CCATCCAAATCAGCACTTCG
36	ABCR36-GC	Forward	GTATCTTCTCCTCCTTCTGC
	ABCR36-Rev	Reverse	CACACAAGCTCCACCTTGG
37	ABCR37-GC	Forward	CAGGTCTGAGAGGTTAAGT
	ABCR37-Rev	Reverse	CCACCAGGCTTCTCTTCAG
38	ABCA4-ex38-F	Forward	GGACTCTGGCCAGTTCACA
	ABCR_ex38R	Reverse	ACACATACTCTACTATCCTAC
39	ABCR39-For2	Forward	GGTTTGCCCCGTTTCCAAC
	ABCR39-Rev	Reverse	TCCCAGCTTTGGACCCAG
40	ABCA4-ex40-F	Forward	TTTGGCTCTTGCTCAGTTCC
	ABCA4-ex40-R	Reverse	GCCAGGCTTTGAGAATGTAGA
41	ABCR41-For	Forward	GAAAGGACAGTGCCAAGGAC
	ABCR41-GC	Reverse	TCTAACCAGCACCTCCAAC
42	ABCA4-ex42-F	Forward	GCCTGCCCATGTCAATAT
	ABCR-ex42-R	Reverse	AGAGCTGATGTTCCGGAAGC
43	4RX-For	Forward	CTTACCCTGGGGCCTGAC
	ABCR43-GC	Reverse	CTCAGAGCCACCCTACTATAG
44	ABCR-Ex44-F	Forward	GTCATCCCTCCACTCCTTG

Exon	Primer	Richtung	Sequenz (5'-3')
	ABCR-Ex44-R	Reverse	TGCACTCTCATGAAACAGGC
45	ABCR45-GC	Forward	CTTGTCTTCTCCAAATGGCA
	ABCR-ex45-R2	Reverse	GAGCAACACAGGAAACAGTCC
46	ABCR Ex46 for	Forward	GAAGCAGTAATCAGAAGGGC
	ABCR46-GC	Reverse	CCTCACATTCTTCCATGCTG
47	ABCR47-for	Forward	CACATCCCACAGGCAAGAG
	ABCRex47R	Reverse	ATCCACAGAAGGCAACAAGG
48	ABCR-ex48-F2	Forward	TACCTTAGGCCCAACCACT
	ABCA4-ex48-R	Reverse	CCCAATAAACAGAGGGCAAG
49	ABCR_ex49Fneu	Forward	GGCTGTATGTGAACTGTGGA
	ABCA4-ex49R	Reverse	GGCATATCTGAGCCTTGGAG
50	ABCR50-F	Forward	AAACCAAGATGACGCGAGTC
	ABCR-ex50-R2	Reverse	AGGTGTTCCAGGTGAGCAA

2.2.3. Enzyme und Kits

Tabelle 4 gibt einen Überblick über die verwendeten Enzyme, bzw. listet das benutzte Kit-System sowie Hersteller und Bestellnummer auf.

Tabelle 4: Verwendete Enzyme und Kit-Systeme.

Enzym/ Kit-System	Verwendung	Hersteller	Bestellnummer
Taq-DNA-Polymerase	PCR	Institut für Humangenetik, Universität Regensburg	
HPLC- Taq-DNA-Polymerase	PCR	Institut für Humangenetik, Universität Regensburg	
<i>AccuPrime GC-Rich</i> DNA-Polymerase	PCR	Invitrogen; Cat. No	12337-016
Exonuklease	Verdau	USB	70073X
Antarktische Alkalische Phosphatase (AAP)	Verdau	New England Biolabs	M0289L
<i>BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit</i>	Sequenzierung	Applied Biosystems	4337451

2.2.4. Chemikalien

Tabelle 5 fasst die wichtigsten der verwendeten Chemikalien, ihre Bezugsquelle und die Bestellnummer zusammen.

Tabelle 5: Benutzte Chemikalien.

Chemikalien	Verwendung	Hersteller	Bestellnummer
dNTP-Set 100 mM	PCR	Genaxxon	M3015.4100
Ethanol absolute	DNA-Fällung	J.T. Baker	UN 1170
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Gelelektrophorese	Merck	1084181
Borsäure	Gelelektrophorese	Merck	1.001.651.000
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Gelelektrophorese	USB	75825

Chemikalien	Verwendung	Hersteller	Bestellnummer
<i>GeneRuler DNA Ladder Mix</i>	Gelelektrophorese	Fermentas	SM0331
Ethidiumbromid-Lösung 0,07%ig	Gelelektrophorese	AppliChem	A 2273.0015
Hi-Di Formamide	Sequenzierung	Applied Biosystems	4311320
Isopropanol	DNA-Fällung	J.T. Baker	M9634
<i>BigDye Terminator v1.1 5x Sequencing Buffer</i>	Sequenzierung	Applied Biosystems	4336697
<i>AccuPrime 5x Buffer A</i>	PCR	Invitrogen	12337-016
Triton X 100	PCR	Sigma	93426-1L
Kaliumchlorid	PCR	Merck	1049361

2.2.5. Puffer und Lösungen

An dieser Stelle sind die benutzten Puffer und Lösungen sowie ihre Zusammensetzungen in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Verwendete Puffer und Lösungen mit Zusammensetzungen.

Puffer/Lösung	Verwendung	Zusammensetzung
Agarosegel (1%)	Gelelektrophorese	1%,(w / v) Agarose in 1x TBE-Puffer
10xTBE (Tris-Borat-EDTA)	Gelelektrophorese	1M Tris; 1M Borsäure; 20mM EDTA (pH 7.5)
10x Reaktionspuffer (10/15 mM MgCl ₂)	PCR	500mM KCl, 100mM Tris (pH 9), 10/ 15 mM MgCl ₂ , 1% Triton X 100 (w/v)
10x DNA-Auftragspuffer	Gelelektrophorese	Tris/HCl (pH7,5; 10mM); Natrium Acetat (5 mM); EDTA (2 mM); Glycerol (10%) Bromphenolblau; 0,001% (w/v) Xylencanol

2.2.6. Verbrauchsmaterial

Tabelle 7 gibt einen Überblick über die wichtigsten benutzten Verbrauchsmaterialien.

Tabelle 7: Verwendetes Verbrauchsmaterial.

Material	Verwendung	Hersteller
Agarose LE	Gelelektrophorese	Biozym
Eppendorf- Cuos 0,5 ml	Verschieden	Sarstedt
Eppendorf- Cuos 1,5 ml	Verschieden	Sarstedt
15 mL Falcon Tube	Verschieden	Sarstedt
50 mL Falcon Tube	Verschieden	Sarstedt
10 µL, 20 µL, 100 µL, 1000 µL Pipetten	Verschieden	Eppendorf
10µL, 100µL, 1000µL Pipettenspitzen	Verschieden	Omnitip
Reaktionsgefäße PCR-Streifen und zugehörige Deckel	Verschieden	LMS / Brand
CR-Platten	Verschieden	Peqlab
Adhesive PCR Film	Verschieden	Peqlab
96-Well-Plate	Sequenzierung	Applied Biosystems
96-Well-Plate-Septa	Sequenzierung	Applied Biosystems

Material	Verwendung	Hersteller
Einmalhandschuhe	Verschieden	Kimberly –Clark
Nitrilhandschuhe	Verschieden	VWR International

2.2.7. Geräte

In Tabelle 8 sind alle benutzten Geräte und deren Hersteller aufgelistet.

Tabelle 8: Verwendete Geräte.

Gerät	Verwendung	Hersteller
Thermocycler T3000	Verschieden	Biometra
Thermocycler Mastercycler ep gradient S	Verschieden	Eppendorf
Thermocycler T3	Verschieden	Biometra
Thermocycler T-Gradient	Verschieden	Biometra
Thermocycler T-Professional Basic Gradient	Verschieden	Biometra
Thermocycler T-Professional Basic	Verschieden	Biometra
Milli-Q-Synthesis Reinstwasseranlage	Verschieden	Millipore
Kühlschränke	Verschieden	Liebherr
Gefrierschränke Liebherr Premium	Verschieden	Liebherr
Gefrierschrank	Verschieden	GFL Burgwedel
Vortex Genie II	Verschieden	Scientific Industries
Zentrifuge Microspin, Tisch Cups	Verschieden	Hartenstein
Zentrifuge Mini, Tisch Cups	Verschieden	Qualitron
Zentrifuge Mini, Mini 8er Stripes	Verschieden	Labnet
Zentrifuge SIGMA 4K15	Verschieden	Sigma
Zentrifuge 5415C, Tisch Cups	Verschieden	Eppendorf
Elektrophoresekammer, Blue Marine 200	Gelelektrophorese	Serva
Waage Kern EW 820-2NM	Gelelektrophorese	Kern
Mikrowelle KOR-6D07	Gelelektrophorese	DAEWOO
Magnetrührer IKA big Squid (ocean)	Gelelektrophorese	IKA-Labortechnik
Netzgerät, Electrophoresis Power Supply EV 215	Gelelektrophorese	Consort
Biostep Dark Hood DH30/32	Geldokumentation	Biostep
ND-1000 Spectrophotometer, Nano Drop	Konzentrationsbestimmung DNA	NanoDrop
Abi3130xl Genetic Analyzer	Sequenzierung	Applied Biosystems

2.2.8. Software

- *Argus 3.0-Software*: Geldokumentation
- *SeqScape software v.2.5.0 (Applied Biosystems)*
- *Sequencing analysis v.5.2 (Applied Biosystems)*
- *Primer3-Software*: <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/> (Rozen and Skaletsky, 2000)
- *UCSC Genome Bioinformatics, Human BLAT Search (Kent, 2002)*:
<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>
- Institutseigenes *Splice Site Prediction* – Programm (Penotti, 1991, Berg and von Hippel, 1987)
- *Splice Site Prediction* – Programm des *Berkeley Drosophila Genome Project (BDGP)* (Reese et al., 1997): http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html

2.3. Methoden

2.3.1. ABCR400 Genchip-Diagnostik

Im Rahmen der molekulargenetischen Routinediagnostik wird die DNA von Patienten mit Verdacht auf M. Stargardt oder ZSD mit dem ABCR400 Genchip der Firma ASPER Biotech (Tartu, Estland) auf Sequenzveränderungen getestet. Der Genchip, dem die sogenannte APEX-Methode zugrunde liegt, testete zum Zeitpunkt dieser Studie auf 486 bekannte, auf dem Chip enthaltene Mutationen und Polymorphismen (siehe Tabelle 16).

Die APEX-Methode, auch *solid-phase minisequencing* genannt (Pastinen et al., 1997) ist eine Sequenzierungsreaktion auf solider Unterlage, mit der Sequenzveränderungen detektiert werden können. Das Prinzip dieser Methode wird im Folgenden dargestellt, genauere Informationen sind Jaakson et al. (2003) zu entnehmen.

Für jede zu untersuchende Veränderung werden spezifische Oligonukleotide, am 5'-Ende gebunden und auf einem Glasträger angeordnet (Abbildung 4, i). Das freie 3'-Ende dieses Primers grenzt dabei unmittelbar an die zu untersuchende variable Stelle an. Die zu untersuchenden DNA-Abschnitte, durch PCR vervielfältigt und anschließend fragmentiert, werden auf den *Array* gegeben und binden an die auf dem Glasträger gebundenen komplementären Oligonukleotide (Abbildung 4, ii).

Ebenfalls hinzugegeben werden vier unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) und eine DNA-Polymerase. Dadurch kommt es bei entsprechenden Temperaturen zu einer sequenzspezifischen Verlängerung der Primers an dessen 3'-Ende mit einem fluoreszenzmarkierte ddNTP (Abbildung 4, iii). Zur Minimierung von Hintergrundsignalen wird der Glasträger danach gewaschen, um überschüssige ddNTPs und die DNA-Fragmente, die als Matrize gedient haben zu entfernen. Daraufhin können an den Positionen der auf dem Glasträger aufgebracht Oligonukleotide ddNTP-spezifische Fluoreszenzsignale abgelesen werden (siehe Abbildung 4, iv).

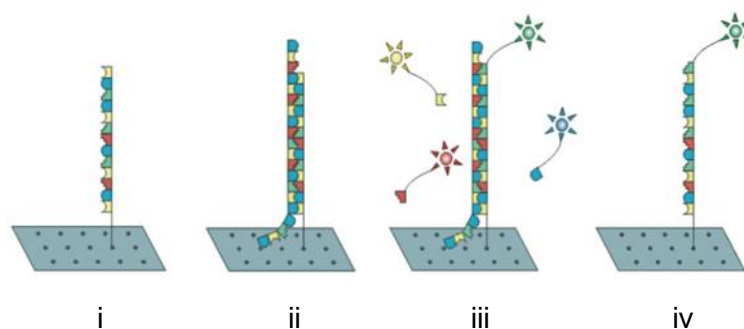


Abbildung 4: Prinzip der APEX-Methode: i: Oligonukleotide sind auf dem Glasträger angeordnet; ii: komplementäre DNA-Fragmente binden an Oligonukleotide; iii: sequenzspezifische Verlängerung der Primer am 3'-Ende mit fluoreszenzmarkierten ddNTPs; iv: DNA-Matrize und ddNTPs sind abgewaschen und das Fluoreszenzsignal wird detektiert (Jaakson et al., 2003)

Diese Informationen werden anschließend mit der *GenoramaTM genotyping Software* (Asper Biotech, Tartu, Estonia, www.asperbio.com) analysiert und es kann abgelesen werden, welches Nukleotid sich an der untersuchten Position befindet. Es werden immer Strang und Gegenstrang untersucht. Für eine komplette APEX-Analyse werden weniger als vier Stunden benötigt. Mit dieser Methode ist es möglich homozygote und heterozygote Basenveränderungen, sowie kleine Deletionen und Insertionen sehr effizient zu detektieren.

Ein großer Vorteil dieses Genchips ist die große Flexibilität durch die Möglichkeit einer ständigen Anpassung an neuen Varianten, um die der Array jederzeit erweitert werden kann (Jaakson et al., 2003, Pastinen et al., 1997).

2.3.2. Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR ist eine Standardmethode zur Vervielfältigung definierter DNA-Abschnitte. Hierbei werden dem Reaktionsansatz neben der zu amplifizierenden (genomischen) DNA auch Primer und Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP) im Überschuss sowie eine hitzestabile *Thermus aquaticus* (Taq)-DNA-Polymerase und Puffer zugegeben.

Die drei Phasen, Denaturierung, Renaturierung und Elongation werden bei der PCR zyklisch wiederholt. Durch Erhitzen auf 94°C kommt es zum Auftrennen des DNA-Doppelstranges, d.h. zur Denaturierung. In der Renaturierungsphase wird das Reaktionsgemisch abgekühlt damit die Primer an die komplementäre DNA-Sequenz binden können (sog. *Annealing*). Primer sind Oligonukleotide, die spezifisch an die 3'-Enden des zu amplifizierenden DNA-Segments binden und dieses so begrenzen. Die unterschiedlichen optimalen *Annealing*-Temperaturen (T_A) der einzelnen Primer-Paare, wurden durch Temperaturgradienten ausgetestet und sind in Tabelle 9 aufgelistet.

In der Elongationsphase werden die freien Nukleotide, die sich an die DNA-Einzelstränge anlagern vom freien 5'-OH-Ende des Primers ausgehend durch die Taq-DNA-Polymerase verknüpft. Diese Synthese eines komplementären DNA-Strangs findet bei 72°C statt (Jansohn, 2007).

Um die PCR-Ergebnisse zu optimieren wurde den Reaktionsansätzen Magnesiumchlorid ($MgCl_2$, 1.0 mM/ 1.5 mM) und in einigen Fällen auch Formamid zugefügt. Beides wurde zusammen mit den dNTPs und einem 10x Reaktionspuffer zum *Premix* (siehe unten) gemischt. Ob zum Gelingen einer PCR Formamid nötig war und wie viel $MgCl_2$ zugegeben werden musste ist der Tabelle 9 zu entnehmen.

Der *Premix* (20,8 μ l) wurde wie folgt pipettiert:

10x Reaktionspuffer (10/15mM $MgCl_2$)	2,5 μ l
dNTPs (je 2,5 mM)	2 μ l
Formamid (100%, optional)	1 μ l
H ₂ O	ad 20,8 μ l

Der Reaktionsansatz (25 μ l) wurde wie folgt pipettiert:

<i>Premix</i>	20,8 μ l
Taq-DNA-Polymerase	0,2 μ l
Primer <i>forward</i> (10 μ M)	1,0 μ l
Primer <i>reverse</i> (10 μ M)	1,0 μ l
DNA (10 ng/ μ l)	2,0 μ l

Als Standard-PCR-Protokoll wurde ein *Touch Down*-Programm verwendet:

Initiale Denaturierung	94°C	3 min	
Denaturierung	94°C	30 sec	} x 2
<i>Annealing</i>	T _A + 6°C	30 sec	
Elongation	72°C	30 sec	} x 2
Denaturierung	94°C	30 sec	
<i>Annealing</i>	T _A + 3°C	30 sec	} x 26
Elongation	72°C	30 sec	
Denaturierung	94°C	30 sec	} x 26
<i>Annealing</i>	T _A	30 sec	
Elongation	72°C	30 sec	} x 26
Finale Elongation	72°C	3 min	
Pause	10°C		

In den Fällen, in denen das PCR-Produkt mit diesem Protokoll zu schwach oder unspezifisch war wurden einer oder mehrere der folgenden Parameter verändert:

- Verdopplung des Taq-Polymerase-Volumens von 2 μ l auf 4 μ l (und entsprechende Verringerung des *Premix*-Volumens um 2 μ l auf 18,8 μ l)
- Verwendung der *high performance liquid chromatography* (HPLC)-Taq DNA Polymerase anstelle der Standard-Taq-DNA-Polymerase
- Erhöhung der Anzahl der Zyklen auf insgesamt 35 Zyklen

Bei welchen Exonen welche Variationen im Reaktionsansatz bzw. PCR-Protokoll nötig waren, um ein besseres Resultat zu erzielen ist der Tabelle 9 zu entnehmen.

Im Falle von Exon 10 war es auf Grund der GC-reichen Sequenz weder mit der Standard-Taq-DNA-Polymerase noch mit der HPLC-Taq-DNA-Polymerase möglich ein ausreichend starkes PCR-Produkt zu erhalten. Hier wurde mit der *AccuPrime* Taq-Polymerase gearbeitet, wobei sich der Reaktionsansatz (25 μ l) wie folgt zusammensetzt:

<i>AccuPrime</i> Taq-Polymerase (200 U)	0,2 µl
<i>5x Buffer A</i>	5,0 µl
H ₂ O	15,8 µl
Primer <i>forward</i> (10µM)	1,0 µl
Primer <i>reverse</i> (10µM)	1,0 µl
DNA (10 ng/ µl)	2,0 µl

Das Standard-PCR-Protokoll wurde beibehalten.

Die korrekte Auswertung von Exon 34 war zunächst nicht möglich. Was letztlich darauf zurückzuführen war, dass sich in der Sequenz des initial verwendeten Oligonukleotids (34 *Forward* Primer) ein Einzelnukleotidpolymorphismus (c.4878-16delGT, Briggs et al., 2001) befindet. Um unklare Resultate zu vermeiden, wurde die PCR dieses Exons daraufhin mit den 33 *Forward* und 34 *Reverse* Primern durchgeführt, was möglich war, da zwischen den beiden Exonen 33 und 34 nur 131 Basenpaare liegen.

Die Lagerung der PCR-Produkte erfolgte im Kühlschrank bei ca. 4°C.

Tabelle 9: PCR-Bedingungen der einzelnen Exone und zur Sequenzierung verwendete Primer.

Exon	PCR-Bedingungen	Sequenzierprimer
1	1.0 mM MgCl ₂ , ohne Formamid, T _A : 58°C TD	<i>Reverse</i>
2	1.0 mM MgCl ₂ , ohne Formamid, T _A : 58 °C TD	<i>Forward/Reverse</i>
3	1.0 mM MgCl ₂ , ohne Formamid, T _A : 60°C TD	<i>Reverse</i>
4	1.0.mM MgCl ₂ , ohne Formamid, T _A : 60°TD	<i>Forward/Reverse</i>
5	1.5 mM MgCl ₂ , mit Formamid, T _A : 58°C TD	<i>Forward</i>
6	1.0 mM MgCl ₂ , ohne Formamid, T _A : 58°C TD	<i>Reverse</i>
7	1.0 mM MgCl ₂ , ohne Formamid, T _A : 58°C TD	<i>Forward/Reverse</i>
8	1.5 mM MgCl ₂ , ohne Formamid, T _A : 58°C TD	<i>Reverse</i>
9	1.0 mM MgCl ₂ , ohne Formamid, T _A : 58°C TD	<i>Forward</i>
10	<i>AccuPrime, Buffer A, T_A: 58°C TD</i>	<i>Forward und Reverse</i>
11	1.0 mM MgCl ₂ , ohne Formamid, T _A : 60°C TD	<i>Forward</i>
12	1.0 mM MgCl ₂ , ohne Formamid, T _A : 58°C TD 0,4µl Taq-DNA-Polymerase	<i>Forward</i>
13	1.0 mM MgCl ₂ , mit Formamid, T _A : 60°C TD 0,4µl Taq-DNA-Polymerase, 35 Zyklen	<i>Reverse</i>
14	1.0 mM MgCl ₂ , ohne Formamid, T _A : 58°C TD	<i>Reverse</i>
15	1.0 mM MgCl ₂ , mit Formamid, T _A : 58°C TD HPLC-Taq-DNA-Polymerase, 35 Zyklen	<i>Forward</i>
16	1.0 mM MgCl ₂ , ohne Formamid, T _A : 56°C TD	<i>Reverse</i>

Exon	PCR-Bedingungen	Sequenzierprimer
17	1.0 mM MgCl ₂ , mit Formamid, T _A : 58°C TD	<i>Reverse</i>
18	1.0 mM MgCl ₂ , ohne Formamid, T _A : 58°C TD	<i>Forward</i>
19	1.5 mM MgCl ₂ , ohne Formamid, T _A : 58°C TD	<i>Reverse</i>
20	1.0 mM MgCl ₂ , ohne Formamid, T _A : 58 °C TD	<i>Reverse</i>
21	1.5 mM MgCl ₂ , mit Formamid, T _A : 56°C TD	<i>Reverse</i>
22	1.0 mM MgCl ₂ , mit Formamid, T _A : 60°C TD	<i>Forward</i>
23	1.5 mM MgCl ₂ , ohne Formamid, T _A : 58°C TD	<i>Forward</i>
24	1.0 mM MgCl ₂ , ohne Formamid, T _A : 58°C TD 0,4µl Taq-DNA-Polymerase, 35 Zyklen	<i>Reverse</i>
25	1.0 mM MgCl ₂ , ohne Formamid, T _A : 58°C TD	<i>Forward</i>
26	1.0 mM MgCl ₂ , mit Formamid, T _A : 48°C TD	<i>Forward</i>
27	1.0 mM MgCl ₂ , ohne Formamid, T _A : 58°C TD 0,4µl Taq-DNA-Polymerase, 35 Zyklen	<i>Reverse</i>
28	1.0 mM MgCl ₂ , mit Formamid, T _A : 56°C TD	<i>Forward</i>
29	1.0 mM MgCl ₂ , mit Formamid, T _A : 54°C TD	<i>Forward</i>
30	1.0 mM MgCl ₂ , ohne Formamid, T _A : 58°C TD 0,4µl Taq-DNA-Polymerase, 35 Zyklen	<i>Forward</i>
31	1.5 mM MgCl ₂ , ohne Formamid, T _A : 56°C TD	<i>Reverse</i>
32	1.5 mM MgCl ₂ , ohne Formamid, T _A : 58°C TD	<i>Reverse</i>
33	1.0 mM MgCl ₂ , ohne Formamid, T _A : 58°C TD	<i>Forward</i>
34	1.0 mM MgCl ₂ , ohne Formamid, T _A : 58°C TD	<i>Reverse</i>
35	1.0 mM MgCl ₂ , ohne Formamid, T _A : 58°C TD	<i>Reverse</i>
36	1.0 mM MgCl ₂ , ohne Formamid, T _A : 58°C TD	<i>Reverse</i>
37	1.5 mM MgCl ₂ , ohne Formamid, T _A : 58°C TD	<i>Reverse</i>
38	1.0 mM MgCl ₂ , ohne Formamid, T _A : 58°C TD HPLC-Taq-DNA-Polymerase, 35 Zyklen	<i>Forward</i>
39	1.0 mM MgCl ₂ , ohne Formamid, T _A : 56°C TD	<i>Forward</i>
40	1.0 mM MgCl ₂ , ohne Formamid, T _A : 58°C TD 35 Zyklen	<i>Reverse</i>
41	1.0 mM MgCl ₂ , ohne Formamid, T _A : 58°C TD	<i>Forward</i>
42	1.0 mM MgCl ₂ , ohne Formamid, T _A : 58°C TD	<i>Reverse</i>
43	1.0 mM MgCl ₂ , ohne Formamid, T _A : 58°C TD	<i>Reverse</i>
44	1.0 mM MgCl ₂ , ohne Formamid, T _A : 58°C TD	<i>Reverse</i>
45	1.0 mM MgCl ₂ , ohne Formamid, T _A : 58°C TD 35 Zyklen	<i>Reverse</i>
46	1.0 mM MgCl ₂ , ohne Formamid, T _A : 58°C TD	<i>Reverse</i>
47	1.0 mM MgCl ₂ , ohne Formamid, T _A : 56°C TD	<i>Forward</i>
48	1.0 mM MgCl ₂ , ohne Formamid, T _A : 58°C TD HPLC-Taq-DNA-Polymerase, 35 Zyklen	<i>Reverse</i>
49	1.0 mM MgCl ₂ , mit Formamid, T _A : 60°C TD	<i>Reverse</i>
50	1.0 mM MgCl ₂ , ohne Formamid, T _A : 58°C TD 0,4µl Taq-DNA-Polymerase, 35 Zyklen	<i>Reverse</i>

2.3.3. Horizontale Gelelektrophorese

Werden geladene Moleküle einem elektrischen Feld ausgesetzt, so bewegen sie sich in Richtung der Elektrode mit entgegengesetztem Vorzeichen. Diese Tatsache wird bei der horizontalen Gelelektrophorese in Agarosegel zur Auftrennung von DNA-Fragmenten genutzt. Unter neutralen Bedingungen liegen Nukleinsäuren aufgrund ihres Phosphatrückgrats als Anionen vor und wandern daher von der Kathode zur Anode. Da die Wanderungsgeschwindigkeit im Agarosegel vor allem von der Molekülgröße abhängt, können die DNA-Fragmente der Größe nach aufgetrennt werden.

Zur Analyse der durch die PCR erhaltenen DNA-Fragmente von bis zu ca. 500 bp Länge wurde 1% (w/v) Agarose verwendet. Durch das Aufkochen in 150 ml 1x TBE-Puffer werden 1,5 g Agarose gelöst und nach dem Abkühlen der Lösung auf 40-50 °C mit ca. 1 Tropfen des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid versetzt. Die Lösung wird in den mit Taschenschablonen ausgestatteten Gelschlitten gefüllt und erstarrt nach ca. 30 Minuten, woraufhin das so entstandene Agarosegel in der Gelkammer mit 1x TBE-Puffer überschichtet wird. Bevor man 5 µl zu analysierenden DNA-Proben in die Geltaschen pipettiert, werden diese mit ca. 2 µl Auftragspuffer gemischt. Dieser dient einerseits dazu, durch Glycerin die Dichte der Proben zu erhöhen, damit diese in die Taschen sinken. Außerdem enthält er die Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol, die anzeigen, wie weit das Gel bereits gelaufen ist.

Ein 1kb - Größenstandard wird ebenfalls auf das Gel aufgetragen, um die Größe der erhaltenen PCR-Produkte abzuschätzen. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei ca. 120 Volt, über einen Zeitraum von ca. 30 Minuten. Zur Auswertung werden die Ethidiumbromid-markierten DNA-Banden mit dem Gel-Dokumentationssystem unter ultraviolettem Licht sichtbar gemacht, fotografiert und ausgedruckt (Jansohn, 2007).

Diese Methode wurde verwendet, um den Erfolg einer PCR zu überprüfen bzw. die Konzentration des PCR-Produkts abzuschätzen.

2.3.4. Reinigung von PCR-Produkten

Damit die Sequenzierreaktion optimal verlaufen kann, müssen die PCR-Produkte vor der Weiterbearbeitung von den überschüssigen dNTPs und Primern der PCR gereinigt werden. Die PCR-Primer würden mit den Sequenzierprimern konkurrieren und genauso Neusynthesen starten. Die Sequenzen des Gegenstranges, die dadurch ebenfalls entstünden, würden eine Auswertung unmöglich machen. Auch ein verändertes Verhältnis zwischen dNTPs und ddNTPs würde das *Cycle Sequencing* stören (Jansohn, 2007).

Durch den Verdau mit einer Exonuklease (Exo) und einer antarktischen alkalischen Phosphatase (AAP) wird die zu sequenzierende DNA von überschüssigen dNTPs und Primern befreit. Dabei spaltet die Exonuklease einzelne, sich am Ende einer Nukleinsäurekette befindenden Nukleotide ab, während die AAP DNA am 5'-Ende dephosphoryliert, wodurch die erneute Ausbildung von Phosphodiesterbindungen verhindert wird. (Kobori et al., 1984).

Der Reaktionsansatz (5 µl) wurde wie folgt pipettiert:

PCR-Produkt (25 ng/ µl)	1,00 µl
Exo (5000 U)	0,10 µl
AAP (5000 U)	0,25 µl
H ₂ O	3,65 µl

Im Fall von Exon 10 das mit der *AccuPrime* Taq-Polymerase vervielfältigt wurde, wurde das PCR-Produkt für den Verdau eins zu fünf mit Reinstwasser verdünnt.

Standard-Programm für den Verdau:

37°C	15 min	Temperaturoptimum
80°C	15 min	Deaktivierung der Enzyme

2.3.5. Direkte Sequenzierung

Das Kettenabbruchverfahren nach Sanger et al. (1977) zur DNA-Sequenzierung basiert auf dem zufälligen Einbau von ddNTPs bei der Neusynthese von DNA nach einer einzelsträngigen Matrize. Didesoxynukleotide besitzen keine 3'-OH-Gruppe,

weswegen die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung nicht möglich ist und es somit, nach deren Einbau zu einem Abbruch der Synthese kommt. Der Einbau eines ddNTPs anstelle eines dNTPs ist rein zufällig, so kommt es wahrscheinlichshalber an jeder einzelnen Stelle der zu untersuchenden Sequenz zu Syntheseabbrüchen. Den Syntheseanfang stellt in allen Fällen der zugegebene Primer (entweder *forward* oder *reverse*) dar. Durch einen der PCR ähnlichen Prozess, dem *Cycle Sequencing*, entstehen so DNA-Fragmente mit identischem 5'-Ende, die sich in ihrer Länge, die durch das ddNTP am 3'-Ende festgelegt ist unterscheiden. Die Didesoxynukleotide sind dabei basenspezifisch fluoreszenzmarkiert. Die Syntheseprodukte werden in einem Polyacrylamidgel der Größe nach aufgetrennt und die vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe können durch ein laseroptisches System detektiert werden, wodurch die einzelnen ddNTPs identifiziert werden können (Jansohn, 2007). Die Gelelektrophorese, die Rohdatenerfassung und deren direkte Umsetzung in die Sequenz werden von einem automatischen Sequenziergerät übernommen. Hierbei handelt es sich um den *3130xl Genetic Analyzer* von *Applied Biosystems*.

Das beim *Cycle Sequencing* verwendete *BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit* (BD) enthält die benötigten ddNTPs, dNTPs und eine Taq-DNA-Polymerase. Es wurden die gleichen Primer benutzt, wie auch bei der PCR. Mit welchem Primer bei der jeweiligen Sequenzierreaktion gearbeitet wurde, ist der Tabelle 9 zu entnehmen.

Der Reaktionsansatz (10 µl) des *Cycle Sequencing* wurde wie folgt pipettiert:

BD 1.1	0,3 µl
<i>Sequencing Buffer (5x)</i>	2,0 µl
Primer <i>forward/ reverse</i> (10µM)	1,0 µl
Gereinigtes PCR-Produkt	5,0 µl
H ₂ O	1,7 µl

Standard-*Cycle Sequencing* -Protokoll:

1. Initiale Denaturierung	94°C	5 min	} x 25
2. Denaturierung	94°C	30 sec	
3. <i>Annealing</i>	58°C	30 sec	
4. Elongation	60°C	3 min	
5. Finale Elongation	60°C	5 min	
6. Pause	15°C		

Um die durch das *Cycle Sequencing* entstandenen DNA-Fragmente in möglichst reiner Form in den Sequenzierautomaten laden zu können wird im Anschluss an die Sequenzierreaktion eine Ethanol-fällung durchgeführt (Jansohn, 2007).

Dazu werden jeder Probe (10 µl)

Natriumacetat (3M) 2 µl

Ethanol (95%) 25 µl

zugegeben. Der Ansatz wird gut gemischt und 20 min. bei 4200 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Nachdem man den Überstand abpipettiert hat, müssen die Proben auf Küchenkrepp bei maximal 800 rpm kurz überkopfzentrifugiert werden. Das erhaltene Präzipitat wird daraufhin mit

Ethanol (70%) 40 µl

gewaschen, erneut gut gemischt und 15 min. zentrifugiert. Nachdem das Präzipitat wie oben beschrieben vom Überstand getrennt worden ist, wird es in

Hi-Di-Formamid 10 µl

aufgenommen und in eine Sequenzierplatte überführt.

Im Falle von Exon 10, bei dem man die PCR wie oben beschrieben mit der *AccuPrime* Taq-Polymerase durchgeführt hat, wurde statt einer Ethanol-fällung eine Fällung mit Isopropanol gemacht. Dabei wird einer Probe (10 µl)

Isopropanol (75%) 38 µl

zugefügt, sie wird gut gemischt und bei Raumtemperatur 15 min. inkubiert. Anschließend gibt man sie für 25 min. bei 14000 rpm und Raumtemperatur in die Zentrifuge. Nachdem der Überstand abgenommen wurde, wird dieser Schritt mit

Isopropanol (75%) 150 µl

wiederholt. Der Überstand wird wiederum abgenommen und das Präzipitat wird ca. 30 min. luftgetrocknet, woraufhin es in

Hi-Di-Formamid 20 µl

gelöst wird. Davon werden 10 µl in eine Sequenzierplatte pipettiert.

Die Sequenzierplatten werden in das Sequenziergerät gestellt, welches die restlichen Arbeitsschritte bis zur fertigen Sequenz automatisch ausführt.

2.3.6. Auswertung der Sequenzen

Die vom Sequenziergerät gelieferten Sequenzen wurden mit Hilfe der *Sequencing analysis* bzw. *SeqScape Software* (siehe 2.2.8) ausgewertet. Dazu müssen die vom Sequenzierer prozessierten Daten in das Programm geladen werden, welches die Nukleotidabfolge der Exone inklusive der 20 vorhergehenden, sowie der zehn nachfolgenden Basen automatisch mit einer ihm zur Verfügung gestellten Referenz-Sequenz vergleicht. Es wurde die ABCA4-cDNA Referenz-Sequenz NM_000350 (*Nucleotide Database, NCBI, Bethesda, Maryland, USA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/105990540>*) benutzt. Stößt das Programm auf eine Stelle, an der sich die beiden Sequenzen unterscheiden, so wird diese hervorgehoben, um vom Untersucher beurteilt werden zu können. Wurde dabei eine tatsächliche Abweichung entdeckt, ist basierend auf der Referenzsequenz die Position der Veränderung bestimmt worden. Das „A“ des Startcodons „ATG“ entspricht dabei der Position 1.

Die Nomenklatur der Sequenzvariationen wurde ermittelt (den Dunnen and Antonarakis, 2000) und durch die Suche in den Online-Datenbanken *Human Gene Mutation Database* (HGMD®, <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>, (Stenson et al., 2003)) und *Mutation Database, Mutations of the ATP-binding Cassette Transporter Retina (ABCR, ABCA4)* (Retina International, <http://www.retina-international.org/files/sci-news/abcrmut.htm>) wurde geprüft, ob es sich um bereits bekannte Variationen im ABCA4-Gen handelt. War dies nicht der Fall wurde die Sequenzveränderung mit *Sequencing Analysis v.5.2* dokumentiert.

2.3.7. Beurteilung der potentiellen Spleiß-Stellen-Veränderungen

Wurde bei der Sequenzanalyse eine Veränderung entdeckt, die sich in unmittelbarer Nähe der Spleiß-Konsensussequenzen befand wurden jeweils mit dem institutseigenem *Splice Site Prediction*-Programm (Penotti, 1991, Berg and von Hippel, 1987) und dem Programm des BDGP (Reese et al., 1997, siehe 2.2.8) *Splice Scores* für die Wildtyp- und die veränderte Sequenz berechnet. Mit Hilfe dieser Werte lässt sich abschätzen, wie wahrscheinlich eine Veränderung des Spleiß-Verhaltens durch Sequenzveränderung ist. Das institutseigene Programm benötigt für die

Berechnung des *Splice Scores* der Donor-Spleiß-Stelle die letzten drei Basen des Exons sowie die 6 ersten Basen des darauffolgenden Introns. Dabei kann bei einem Wert von null bis elf von einer potentiellen Spleiß-Stelle ausgegangen werden. Die Akzeptor-Spleiß-Stelle wird durch Angabe der letzten 16 Basen des Introns sowie der ersten Base des Exons berechnet. Hierbei nimmt man bei einem Wert zwischen null und 20 eine Spleiß-Stelle an. Die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um eine tatsächliche Donor- bzw. Akzeptor-Spleiß-Stelle handelt ist umso größer, je kleiner der *Splice-Score* ist. Mit dem Programm des BDGP können in einer vorgegebenen Sequenz die potentiellen Spleiß-Stellen detektiert werden. Diese werden mit einem Wert von 0,40 bis 0,99 angegeben, wobei ein höherer Wert die höhere Wahrscheinlichkeit für eine Spleiß-Stelle anzeigt.

3. Ergebnisse

Im Rahmen der genetischen Routinediagnostik des M. Stargardt und der autosomal rezessiven Form der Zapfen-Stäbchen-Dystrophie wurde das ABCA4-Gen mittels des ABCR400 Genchip der Firma ASPER Biotech auf bekannte Sequenzvariationen hin getestet. Bei den 54 in dieser Studie untersuchten Patienten konnte durch diese Methode jeweils nur eine (monoallelische) pathogene Mutation detektiert werden. Zur Identifikation weiterer potentiell krankheitsverursachender genetischer Variationen wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit die 50 Exone des ABCA4-Gens dieser Patienten direkt sequenziert.

Acht AMD-Patienten, bei denen mittels *Array*-Analyse eine monoallelische Mutation im ABCA4-Gen gefunden wurde, wurden ebenfalls in diese Studie aufgenommen. Sechs dieser Patienten zeigten eine STGD-ähnlichen, zwei einen AMD-typischen Krankheitsverlauf.

Insgesamt konnten durch das direkte Sequenzieren 37 zusätzliche Sequenzveränderungen nachgewiesen werden (siehe 3.1).

3.1. Identifikation neuer Sequenzvariationen

Um die verschiedenen Sequenzvarianten zu detektieren, wurden die einzelnen Exone mittels PCR vervielfältigt und anschließend nach der Sanger-Kettenabbruchsmethode (Sanger et al., 1977) direkt sequenziert.

Insgesamt wurden bei den 62 untersuchten Patienten, zusätzlich zu den vom ABCR400 Genchip detektierten Varianten, weitere 37 Sequenzvariationen entdeckt. Davon waren 30 bisher weder in öffentlichen Datenbanken noch in Publikationen beschrieben. Diese *de novo* Veränderungen sind über das gesamte ABCA4-Gen verteilt und keine der neuen Varianten wurde bei mehr als einem Patienten detektiert. In zwei Fällen wurde eine Sequenzvariation entdeckt, die bereits beschrieben war, aber zum Zeitpunkt der Diagnostik noch nicht auf den ABCR400 Genchip aufgebracht worden war (Jaakson et al., 2003). Bei einer der entdeckten

Mutationen war das zugehörige Chip-Ergebnis aus technischen Gründen nicht aussagekräftig. Bei vier Patienten konnte durch die direkte Sequenzierung ein falsch negatives Chip-Ergebnis nachgewiesen werden. Hierbei handelte es sich bei zwei Patienten um dieselbe Mutation (c.3261A>C bei G05-1854 und L-0099MK). Bei allen 62 untersuchten Patienten wurde die durch den Chip detektierte erste pathogene Sequenzveränderung bestätigt (siehe Tabelle 1).

Tabelle 10 bietet einen Überblick über die potentiell pathogenen Sequenzveränderungen, die im Zuge dieser Studie zusätzlich zu den vom ABCR400 Genchip detektierten Variationen entdeckt wurden. Zusätzlich werden die möglichen Ursachen genannt, warum bereits bekannte Mutationen nicht mit dem ASPER Array erkannt wurden.

Tabelle 10: Übersicht über die potentiell pathogenen Sequenzveränderungen, welche zusätzlich zu den vom ABCR400 Genchip detektierten Varianten gefunden wurden. Neben der entsprechenden Referenz ist die Ursache dafür angegeben, weswegen die Variation mit dem ASPER Array nicht erkannt wurde. Die Sequenzveränderungen sind dem Patienten zugeordnet der diese trägt.

Exon	Nukleotidveränderung	Referenz	Ursache für die fehlende Erfassung durch den Chip	Patienten-ID
3	c.161-1G>A	diese Studie	neue Sequenzvariante	M06-0212
4	c.319C>T	diese Studie	neue Sequenzvariante	G03-2408
4	c.318T>G	diese Studie	neue Sequenzvariante	M06-0037
6	c.622delG	diese Studie	neue Sequenzvariante	G05-2281
7	c.847A>G	diese Studie	neue Sequenzvariante	ZSD0422
8	c.1099+3 A>C	diese Studie	neue Sequenzvariante	G03-2346
9	c.1100-5G>A	diese Studie	neue Sequenzvariante	G03-3537
10	c.1302delA	diese Studie	neue Sequenzvariante	M05-0011-2
10	c.1356+1G>T	diese Studie	neue Sequenzvariante	M05-0025
11	c.1532 G>A	diese Studie	neue Sequenzvariante	M06-0126
13	c.1906C>T	diese Studie	neue Sequenzvariante	G04-1886
13	c.1898A>G	diese Studie	neue Sequenzvariante	G04-1645
14	c.2069del G	diese Studie	neue Sequenzvariante	G03-2788
16	c.2413 G>A	diese Studie	neue Sequenzvariante	G04-0860
17	c.2626C>T	Stenirri et al. (2004)	nicht auf dem Chip aufgebracht	G04-3175
18	c.2690delC	diese Studie	neue Sequenzvariante	ZSD0422
19	c.2799-2803delCTGG+2799insT	diese Studie	neue Sequenzvariante	G03-3217
22	c.3304G>T	diese Studie	neue Sequenzvariante	G04-2403
22	c.3261A>C	Rivera et al. (2000)	falsch negatives Chip-Ergebnis	G05-1854, L-0099MK
23	c.3377 T>C	diese Studie	neue Sequenzvariante	G03-2000
23	c.3407G>A	diese Studie	neue Sequenzvariante	ZSD0410

Exon	Nukleotidveränderung	Referenz	Ursache für die fehlende Erfassung durch den Chip	Patienten-ID
23	c.3428C>A	diese Studie	neue Sequenzvariante	M05-0012
25	c.3677G>T	diese Studie	neue Sequenzvariante	G04-2042
25	c.3813+9G>C	diese Studie	neue Sequenzvariante	G05-1110
25	c.3752delA	diese Studie	neue Sequenzvariante	H-0144HK
26	c.3819_3820insT	Jaakson et al. (2003)	Chip-Ergebnis aus technischen Gründen nicht auswertbar	G05-1110
28	c.4234C>T	Maugeri et al. (1999)	falsch negatives Chip-Ergebnis	G03-1814
30	c.4532C>A	diese Studie	neue Sequenzvariante	G03-3687
35	c.4895A>T	diese Studie	neue Sequenzvariante	G04-0186
35	c.4880_4903dup24	diese Studie	neue Sequenzvariante	G05-2615
37	c.5311G>A	diese Studie	neue Sequenzvariante	M06-0005
38	c.5338C>G	Shroyer et al. (2000)	nicht auf dem Chip aufgebracht	G03-2346
40	c.5714+5 G>A	Cremers et al. (1998)	falsch negatives Chip-Ergebnis	G03-3537
42	c.5863G>A	diese Studie	neue Sequenzvariante	M06-0126
44	c.6147G>A	diese Studie	neue Sequenzvariante	M06-0006-1
45	c.6176G>C	diese Studie	neue Sequenzvariante	M06-0159

Insgesamt wurden bei 32 der 62 untersuchten Patienten zusätzliche potentiell pathogene Sequenzvariationen gefunden (51,6%), während bei 30 Patienten keine zweite Mutation detektiert werden konnte (48,4%).

Bei 30 der insgesamt 54 untersuchten M. Stargardt- und ZSD-, bzw. nicht eindeutig zuordenbaren Patienten konnte durch die Sequenzierung das zweite noch fehlende Krankheitsallel gefunden werden, was einem Prozentsatz von 55,6 % entspricht. Bei fünf dieser 30 Personen wurde eine dritte Mutation detektiert. Bei 24 (44,4 %) der 30 Patienten konnte keine zweite Mutation detektiert werden.

Der Anteil der Personen mit zusätzlich detektierter Veränderung variierte in den einzelnen Patientengruppen. Während er bei den ZSD- und STGD-Patienten 61,5 % bzw. 60% betrug belief er sich in der Gruppe der nicht eindeutig zuordenbaren Patienten auf lediglich 16,7%.

In der Gruppe der AMD-Patienten konnte lediglich bei zwei der sechs Patienten mit Stargardt-ähnlichen Augenhintergrund-Veränderungen eine zweite Sequenzveränderung gefunden werden. Dies entspricht einem Anteil von 33,3%. Bei den beiden AMD-Kontrollpatienten wurde keine weitere Mutation detektiert.

Tabelle 11 gibt einen Überblick über die 32 nach Krankheitsbildern aufgeteilten Patienten mit zwei oder drei potentiellen Mutationen. Ihnen zugeordnet sind die durch den ABCR400 Genchip detektierten Mutationen sowie die zusätzlich gefundenen potentiell pathogenen Sequenzvariationen und deren Effekt auf Proteinebene. Tabelle 12 listet die Patienten auf bei denen im Rahmen dieser Arbeit keine zusätzliche Sequenzvariation detektiert wurde.

Tabelle 11: Dem jeweiligen Krankheitsbild zugeordnete Patienten mit den durch den ABCR400 Genchip detektierten Mutationen sowie den zusätzlich gefundenen potentiell pathogenen Sequenzvariationen und deren Effekt auf Proteinebene. Die erste Zeile gibt jeweils die vom ABCR400 Genchip detektierte Mutation an.

Patienten-ID	Exon	Nukleotidveränderung	Effekt auf Proteinebene
STGD-Patienten			
G03-1814	17	c.2588G>C	p.Gly863Ala
	28	c.4234C>T	p.Gln1412X
G03-2346	17	c.2588G>C	p.Gly863Ala
	8	c.1099+3 A>C	Spleiß-Stellen-Veränderung
	38	c.5338C>G	p.Pro1780Ala
G03-3217	17	c.2588G>C	p.Gly863Ala
	19	c.2799-2803delCTGG+2799insT	p.Leu934del+Val935Leu
G03-3537	44	c.6079C>T	p.Leu2027Phe
	9	c.1100-5G>A	Spleiß-Stellen-Veränderung
	40	c.5714+5 G>A	Spleiß-Stellen-Veränderung
G03-3687	35	c.4916T>G	p.Leu1639X
	30	c.4532C>A	p.Pro1511His
G04-0186	2/21	c.1622T>C, c.3113C>T	p.Leu541Pro, p.Ala1038Val
	35	c.4895A>T	p.Asn1632Ser
G04-0860	45	c.6229C>T	p.Arg2077Trp
	16	c.2413 G>A	p.Gly805Ser
G04-1886	48	c.6529G>A	p.Asp2177Asn
	13	c.1906C>T	p.Gln636X
G04-2042	28	c.4139C>T	p.Pro1380Leu
	25	c.3677G>T	p.Gly1226Val
G04-2403	33	c.4773+1G>T	Spleiß-Stellen-Veränderung
	22	c.3304G>T	p.Asp1102Tyr
G04-3175	40	c.5714+5G>A	Spleiß-Stellen-Veränderung
	17	c.2626C>T	p.Gln876X
G05-1110	42	c.5882G>A	p.Gly1961Glu
	25	c.3813+9G>C	Spleiß-Stellen-Veränderung
	26	c.3819_3820insT	p.Leu1273SerfsX8
G05-1854	42	c.5882G>A	p.Gly1961Glu
	22	c.3261A>C	p.Glu1087Asp
G05-2281	21	c.3113C>T	p.Ala1038Val
	6	c.622delG	p.Ala208ProfsX33

Patienten-ID	Exon	Nukleotidveränderung	Effekt auf Proteinebene
M05-0011-2	42	c.5882G>A	p.Gly1961Glu
	10	c.1302delA	p.Gln437ArgfsX12
M05-0025	42	c.5882G>A	p.Gly1961Glu
	10	c.1356+1G>T	Spleiß-Stellen-Veränderung
M06-0005	42	c.5882G>A	p.Gly1961Glu
	37	c.5311G>A	p.Gly1771Arg
M06-0006-1	21	c.3113C>T	p.Ala1038Val
	44	c.6147G>A	Spleiß-Stellen-Veränderung
M06-0126	42	c.5882G>A	p.Gly1961Glu
	11	c.1532 G>A	p.Arg511His
	42	c.5863G>A	p.Val1955Met
M06-0159	18	c.2690C>T	p.Thr897Ile
	45	c.6176G>C	p.Gly2059Ala
M06-0212	42	c.5882G>A	p.Gly1961Glu
	3	c.161-1G>A	Spleiß-Stellen-Veränderung
ZSD-Patienten			
G03-2000	28	c.4234C>T	p.Gln1412X
	23	c.3377 T>C	p.Leu1126Pro
G03-2408	30	c.4537delC	p.Gln1513fsX12
	4	c.319C>T	p.Arg107X
G03-2788	12/21	c.1622T>C, c.3113C>T	p.Leu541Pro, Ala1038Val
	14	c.2069del G	p.Gly690ValfsX6
G04-1645	42	c.5882G>A	p.Gly1961Glu
	13	c.1898A>G	p.Tyr633Cys
G05-2615	38	c.5413A>G	p.Asn1805Asp
	35	c.4880_4903dup24	p.Leu1627_Ala1634dup
M06-0037	30	c.4469G>A	p.Cys1490Tyr
	4	c.318T>G	p.Tyr106X
ZSD0410	39	c.5565-10T>C	Spleiß-Stellen-Veränderung
	23	c.3407G>A	p.Gly1136Glu
ZSD0422	31	c.4610C>T	p.Thr1537 Met
	7	c.847A>G	p.Arg283Gly
	18	c.2690delC	p.Glu898SerfsX3
Patienten, welche weder STGD noch ZSD eindeutig zugeordnet werden können			
M05-0012	39	c.5565-10T>C	Spleiß-Stellen-Veränderung
	23	c.3428C>A	p.Thr1143Asn
AMD-Patienten			
H-0144HK	21	c.3113 C>T	p.Ala1038Val
	25	c.3752delA	p.Glu1251GlyfsX24
L-0099MK	21	c.3113 C>T	p.Ala1038Val
	22	c.3261A>C	p.Glu1087Asp

Tabelle 12: Auflistung der Patienten, bei denen keine zusätzliche, potentiell pathogene Sequenzveränderung detektiert werden konnte, mit der vom ABCR400 Genchip detektierten Mutation.

Patienten-ID	Durch den ABCR400 Genchip detektierte Sequenzvariationen		
	Exon	Nukleotidveränderung	Effekt auf Proteinebene
STGD-Patienten			
G03-3214	39	c.5565-10T>C	Spleiß-Stellen-Veränderung
G03-3232	39	c.5565-10T>C	Spleiß-Stellen-Veränderung
G03-3675	39	c.5565-10T>C	Spleiß-Stellen-Veränderung
G05-0022	40	c.5714+5G>A	Spleiß-Stellen-Veränderung
G05-1365	30	c.4535C>T	p.Pro1512Leu
G05-2251	15	c.2300T>A	p.Val767Asp
G05-2423	8	c.1018T>C	p.Tyr340His
M06-0012	39	c.5565-10T>C	Spleiß-Stellen-Veränderung
M06-0069	42	c.5882G>A	p.Gly1961Glu
M06-0088	29	c.4283C>T	p.Thr1428Met
M06-0103	47	c.6415C>T	p.Arg2139Trp
M06-0171	29	c.4297G>A	p.Val1433Ile
M06-0197	12/21	c.1622T>C, c.3113C>T	p.Leu541Pro, p.Ala1038Val
M06-0204	13	c.1928T>G	p.Val643Gly
ZSD-Patienten			
G04-1885	43	c.5923G>C	p.Gly1975Arg
G05-0444	42	c.5882G>A	p.Gly1961Glu
G05-1080	42	c.5882G>A	p.Gly1961Glu
ZSD0402	45	c.6148G>C	p.Val2050Leu
G05-0867	13	c.1928T>G	p.Val643Gly
Patienten, welche weder STGD noch ZSD eindeutig zugeordnet werden können			
G03-3007	12/21	c.1622T>C, c.3113C>T	p.Leu541Pro, p.Ala1038Val
G03-3269	6	c.768G>T	Spleiß-Stellen-Veränderung
G03-3301	12/21	c.1622T>C, c.3113C>T	p.Leu541Pro, p.Ala1038Val
G05-0478	12/21	c.1622T>C, c.3113C>T	p.Leu541Pro, p.Ala1038Val
M06-0180	39	c.5565-10T>C	Spleiß-Stellen-Veränderung
AMD-Patienten			
H-0053MW	35	c.4859_4864delATAACAinsTCCT	p.Asn1620IlefsX25
H-0142GM	13	c.1928 T>G	p.Val643Gly
L-0100-GA	12, 21	c.1622T>C, c.3113C>T	p.Leu541Pro, p.Ala1038Val
M-0013GA	33	c.4773+3A>G	Spleiß-Stellen-Veränderung
AMD-Kontrollpatienten			
H-193-GA	6	c.634C>T	p.Arg212Cys
W-042-GA	48	c.6529G>A	p.Asp2177Asn

3.2. Analyse möglicher Effekte der neuen Varianten auf Proteinebene

Im nächsten Schritt wurden mögliche funktionelle Konsequenzen dieser neuen Varianten untersucht. Gene werden transkribiert, d.h. die DNA-Sequenz eines Gens wird in eine Ribonukleinsäure (RNA)-Sequenz umgeschrieben. Die weitere Prozessierung des dadurch entstandenen RNA-Strangs erfolgt durch das Spleißen. Hierbei werden die intronischen Sequenzen aus dem RNA-Strang herausgeschnitten und die einzelnen Exone, d.h. die kodierenden RNA-Abschnitte zu einer *messenger* RNA (mRNA) zusammengesetzt. An den Ribosomen wird die mRNA translatiert, wobei die Basenabfolge der mRNA in eine Proteinsequenz übersetzt wird. Dies geschieht auf der Basis des sogenannten Triplet-Codes. Eine Veränderung in der Basenabfolge der kodierenden DNA kann so nach Transkription und Translation zu einer Veränderung der zugehörigen Proteinsequenz führen (Strachan, 2011).

Bei der Analyse der Konsequenz der 30 *de novo* Sequenzveränderungen auf Proteinebene konnten diese verschiedenen Gruppen zugeordnet werden, wie es in Tabelle 13 dargestellt ist. So kommt es durch Austausch einer Base in 14 Fällen höchstwahrscheinlich zum Austausch einer Aminosäure im kodierten Protein. Es handelt sich hierbei um sogenannte *Missense*-Mutationen. Die drei *Nonsense*-Mutationen zeichnen sich dadurch aus, dass die Entstehung eines Stopcodons entweder zum Abbau der mRNA oder zu einem Kettenabbruch der Aminosäuresequenz kommt.

Bei einer *Frame shift*-Mutation kann durch Deletion bzw. Insertion einer oder mehrerer Basen das Leseraster verschoben werden (*out-of-frame* Mutation), wodurch meist nach wenigen Basen wiederum ein Stopcodon entsteht (Strachan, 2011). Dies war bei fünf der untersuchten Patienten der Fall. Ein Patient (G05-2615) wies eine Duplikation von 24 Basen auf (*in-frame* Mutation), die zu einer Duplikation von acht Aminosäuren führte. Bei einem weiteren Untersuchten (G03-3217) konnte eine Deletion von vier Basen in Kombination mit einer Insertion von einer Base detektiert werden, was zur Deletion einer und dem gleichzeitigen Austausch einer weiteren Aminosäure führte. Bei beiden Patienten führte dies nicht

zur Verschiebung des Leserasters sondern zu einer *In Frame*-Mutation (Strachan, 2011).

Tabelle 13: Zuordnung der detektierten de novo Varianten zum Mutationstyp, entsprechende ihrer möglichen Effekte auf Proteinebene.

Mutationstyp	Exon	Nukleotidveränderung	Effekt auf Proteinebene	Patienten-ID
Missense	7	c.847A>G	p.Arg283Gly	ZSD0422
	11	c.1532 G>A	p.Arg511His	M06-0126
	13	c.1898A>G	p.Tyr633Cys	G04-1645
	16	c.2413 G>A	p.Gly805Ser	G04-0860
	22	c.3304G>T	p.Asp1102Tyr	G04-2403
	23	c.3377 T>C	p.Leu1126Pro	G03-2000
	23	c.3407G>A	p.Gly1136Glu	ZSD0410
	23	c.3428C>A	p.Thr1143Asn	M05-0012
	25	c.3677G>T	p.Gly1226Val	G04-2042
	30	c.4532C>A	p.Pro1511His	G03-3687
	35	c.4895A>T	p.Asn1632Ser	G04-0186
	37	c.5311G>A	p.Gly1771Arg	M06-0005
	42	c.5863G>A	p.Val1955Met	M06-0126
	45	c.6176G>C	p.Gly2059Ala	M06-0159
	Nonsense	4	c.318T>G	p.Tyr106X
4		c.319C>T	p.Arg107X	G03-2408
13		c.1906C>T	p.Gln636X	G04-1886
potentielle Spleiß-Stellen-Veränderung	3	c.161-1G>A	Spleiß-Stellen-Veränderung	M06-0212
	8	c.1099+3 A>C	Spleiß-Stellen-Veränderung	G03-2346
	9	c.1100-5G>A	Spleiß-Stellen-Veränderung	G03-3537
	10	c.1356+1G>T	Spleiß-Stellen-Veränderung	M05-0025
	25	c.3813+9G>C	Spleiß-Stellen-Veränderung	G05-1110
	44	c.6147G>A	Spleiß-Stellen-Veränderung	M06-0006-1
Frameshift	6	c.622delG	p.Ala208ProfsX33	G05-2281
	10	c.1302delA	p.Gln437ArgfsX12	M05-0011-2
	14	c.2069del G	p.Gly690ValfsX6	G03-2788
	18	c.2690delC	p.Glu898SerfsX3	ZSD0422
	25	c.3752delA	p.Glu1251GlyfsX24	H-0144HK
In Frame	19	c.2799-2803delCTGG+2799insT	p.Leu934del+Val935Leu	G03-3217
	35	c.4880_4903dup24	p.Leu1627_Ala1634dup	G05-2615

3.2.1. Potentielle Spleiß-Stellen-Veränderungen

Wie bereits unter 3.2 erwähnt kommt es während der Prozessierung der RNA zum sogenannten Spleißen. Konsensus-Spleiß-Sequenzen werden von den an diesem Vorgang beteiligten Enzymen durch das Erkennen spezifischer Basenabfolgen im Übergangsbereich zwischen Exon und Intron erkannt. Bei Veränderungen in der Basenabfolge an der Spleiß-Stelle oder in deren Nähe, auf exonischer oder intronischer Seite, kann es zu Veränderungen im Spleiß-Verhalten und somit zur fehlerhaften mRNA-Synthese kommen (Strachan, 2011).

Bei fünf der untersuchten Patienten ist diese Konsequenz anzunehmen, da sich eine Veränderung der Basensequenz im exonnahen Intron befindet (siehe Tabelle 14). In einem Fall (M06-0006-1) kommt es durch einen Austausch im letzten Nukleotid des Exons 44 (c.6147G>A) nicht zu einer Änderung der Proteinsequenz (p.Lys2049Lys). Möglicherweise führt dieser Austausch aber ebenfalls zu einem veränderten Spleiß-Verhalten. Deshalb wurde diese Variation den Spleiß-Stellen-Veränderungen zugeordnet.

In Tabelle 14 sind den einzelnen Spleiß-Stellen-Veränderungen die *Splice Scores* zugeordnet. Bei jeder potentiellen Spleiß-Stellen-Veränderung wurde der Wert der originalen Spleiß-Stelle des Wildtyps (WT) mit dem Wert der durch einen Basenaustausch veränderten Spleiß-Stelle verglichen.

Um die Möglichkeit der Entstehung einer neuen Spleiß-Stelle zu analysieren wurden bei drei der oben genannten Patienten (G05-1110, G03-3537, M06-0212) die *Splice Scores* für die möglichen neuen Spleiß-Stellen berechnet. In einem Fall (G03-2346) erkannte das *Splice Site Prediction*-Programm des BDGP in der Nähe der originalen eine alternative Spleiß-Stelle, deren *Splice Score* ebenfalls angegeben ist (siehe Tabelle 14).

Die *Splice Scores* ermöglichen eine Einschätzung der Wahrscheinlichkeit einer tatsächlichen Spleiß-Stellen-Veränderung (Reese et al., 1997, Penotti, 1991, Berg and von Hippel, 1987). Die genauen Grenzen der *Splice Scores* innerhalb derer von einer Spleiß-Stelle ausgegangen werden kann, sowie die Bedeutung der Höhe des *Splice Scores* werden in Abschnitt 2.3.7 erläutert.

Tabelle 14: Splice Scores der potentiellen Spleiß-Stellen-Veränderungen; / : Spleiß-Stelle wurde vom Splice Score Prediction Programm nicht erkannt; neue Spleiß-Stelle: durch den Nukleotidaustausch neu entstandene potentielle Spleiß-Stelle; alternative Spleiß-Stelle: alternative Spleiß-Stelle in der Nähe der originalen Spleiß-Stelle.

Patienten-ID	Nukleotidveränderung	Spleiß-Stelle	Splice Scores	
			institutseigenes Programm	BDGP-Programm
Donor-Spleiß-Stellen				
G03-2346	c.1099+3A>C WT	original	5,422	0,50
		original	2,084	0,99
		alternativ	4,866	0,83
G05-1110	c.3813+9G>C WT	original	4,128	0,75
		original	4,128	0,75
	c.3813+9G>C WT	neu	7,474	/
		neu	7,462	/
M05-0025	c.1356+1G>T WT	original	11,767	/
		original	4,434	0,91
M06-0006-1	c.6147G>A WT	original	5,9	/
		original	3,816	0,62
Akzeptor-Spleiß-Stellen				
G03-3537	c.1100-5G>A WT	original	5,713	0,49
		original	5,650	0,51
	c.1100-5G>A WT	neu	5,767	/
		neu	13,099	/
M06-0212	c.161-1G>A WT	original	13,566	/
		original	6,234	0,85
	c.161-1G>A WT	neu	8,701	/
		neu	16,033	/

3.2.2. Einteilung der Mutationen und potentiell pathogenen Sequenzvariationen in Schweregrade

Ausgehend vom unter 1.3.4 ausführlich beschriebenen Genotyp-Phänotyp-Modell werden Mutationen des ABCA4-Gens in drei Schweregrade eingeteilt. Die Einteilung in milde, moderate und schwere Mutationen basiert hierbei auf der theoretisch angenommenen Restfunktion des ABCA4-Proteins (van Driel et al., 1998, Maugeri et al., 1999). So wird vermutet, dass es sich bei *Nonsense*- sowie *Frameshift*-Mutationen um schwere Mutationen handelt, da es durch die Ausbildung eines Stopcodons entweder zum Abbau der mRNA oder zu einem Kettenabbruch der

Aminosäuresequenz und somit zum kompletten Funktionsverlust des ABCA4-Proteins kommen sollte (Strachan, 2011, Maugeri et al., 1999). Bei den *Missense*- und *In Frame shift*-Mutationen sowie den Spleiß-Stellen-Veränderung ist die Zuordnung zu einer der Gruppen weitaus schwieriger. So führen *Missense*- und *In frame shift*-Mutationen zur Veränderung der Primärstruktur des Proteins. Je nach Lokalisation der Mutation und den betroffenen Aminosäuren kann dies unterschiedlich schwere Auswirkungen auf die Proteinfunktion haben (Strachan, 2011, Lawrence E, 2004). Genauso können die in 3.2.1. und 4.2. ausführlich diskutierten potentiellen Spleiß-Stellen-Veränderungen nur durch weitere Untersuchungen der funktionellen Konsequenzen eindeutig einem Schweregrad zugeordnet werden.

Basierend auf den in dieser Studie erbrachten Daten zu den detektierten *Missense*- und *In frame shift*- Mutationen sowie Spleiß-Stellen-Veränderungen konnte keine Zuordnung dieser Mutationen zu einem Schweregrad erfolgen.

Da die Einteilung einzelner bekannter Mutationen in vorangegangenen Studien größtenteils auf dem Genotyp-Phänotyp-Modell basiert (Maugeri et al., 1999, van Driel et al., 1998) kann diese Einordnung zur Evaluation des Modells nicht herangezogen werden. So konnten lediglich die *Nonsense*- bzw. *Frameshift*-Mutationen als schwere Mutationen klassifiziert werden.

Insgesamt wurde bei sieben (20 %) der 35 an M. Stargardt erkrankten Patienten jeweils eine schwere Mutation detektiert. In der Gruppe der ZSD-Patienten lagen bei fünf (38,5 %) von 13 Patienten schwere Mutationen vor. Bei einem der ZSD-Patienten konnten beide Mutationen als schwer eingestuft werden.

In der Gruppe der Patienten, welche weder ZSD noch M. Stargardt eindeutig zugeordnet werden konnten, sowie die den restlichen Stargardt- und ZSD-Patienten konnte keine detektierte Mutation einem Schweregrad zugeordnet werden.

In der Gruppe der acht AMD-Patienten konnte bei zwei der Patienten jeweils eine schwere Mutation detektiert werden. Bei beiden Patienten lag ein Stargardt-ähnlicher

Krankheitsverlauf vor. Die Mutationen der an normal verlaufender AMD erkrankten Kontroll-Patienten konnten keiner Kategorie zugeordnet werden.

In Tabelle 15 sind die Patienten aufgelistet, bei denen eine *Nonsense*- bzw. *Frameshift*- und somit schwere Mutationen detektiert wurde.

Tabelle 15: Patienten, deren Mutationen einem Schweregrad zugeordnet werden konnte

Patienten-ID	Nukleotidveränderung	Mutationstyp	Schweregrad
STGD-Patienten			
G03-1814	c.2588G>C	<i>Missense</i>	unklar
	c.4234C>T	<i>Nonsense</i>	schwer
G03-3687	c.4916T>G	<i>Nonsense</i>	schwer
	c.4532C>A	<i>Missense</i>	unklar
G04-1886	c.6529G>A	<i>Missense</i>	unklar
	c.1906C>T	<i>Nonsense</i>	schwer
G04-3175	c.5714+5G>A	Spleiß-Stellen-Veränderung	unklar
	c.2626C>T	<i>Nonsense</i>	schwer
G05-1110	c.5882G>A	<i>Missense</i>	unklar
	c.3813+9G>C	Spleiß-Stellen-Veränderung	unklar
	c.3819_3820insT	<i>Frame shift</i>	schwer
G05-2281	c.3113C>T	<i>Missense</i>	unklar
	c.622delG	<i>Frame shift</i>	schwer
M05-0011-2	c.5882G>A	<i>Missense</i>	unklar
	c.1302delA	<i>Frame shift</i>	schwer
ZSD-Patienten			
G03-2000	c.4234C>T	<i>Nonsense</i>	schwer
	c.3377 T>C	<i>Missense</i>	unklar
G03-2408	c.4537delC	<i>Frame shift</i>	schwer
	c.319C>T	<i>Nonsense</i>	schwer
G03-2788	c.1622T>C, c.3113C>T	<i>Missense/Missense</i>	unklar
	c.2069del G	<i>Frame shift</i>	schwer
M06-0037	c.4469G>A	<i>Missense</i>	unklar
	c.318T>G	<i>Nonsense</i>	schwer
ZSD0422	c.4610C>T	<i>Missense</i>	unklar
	c.847A>G	<i>Missense</i>	unklar
	c.2690delC	<i>Frame shift</i>	schwer
AMD-Patienten			
H-0144HK	c.3113 C>T	<i>Missense</i>	unklar
	c.3752delA	<i>Frame shift</i>	schwer
H-0053MW	c.4859_4864delATAACAinsTCCT	<i>frame shift</i>	schwer

4. Diskussion

4.1. Verteilung und Mutationstypen der detektierten Sequenzvarianten im ABCA4-Gen

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden durch direktes Sequenzieren nach der Sanger-Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977) 30 bisher nicht beschriebene Sequenzvariationen im ABCA4-Gen detektiert. Die Verteilung dieser Variationen, sowie deren Mutationstypen stimmen mit den bisher veröffentlichten Ergebnissen bei ABCA4-Mutationsanalysen überein. So wurde keine der neuen Varianten öfter als einmal gefunden, was der in früheren Studien beschriebenen genetischen Heterogenität der ABCA4-Allele entspricht (Allikmets, 2000b). Wie auch von Lewis et al. (1999) dargestellt, sind die in dieser Studie gefundenen Veränderungen eher zufällig über das gesamte ABCA4-Gen verteilt. Der größte Anteil der detektierten Varianten (48,4%) konnte der Gruppe der *Missense*-Mutationen zugeteilt werden (siehe 3.2).

4.2. Evaluation der potentiellen Spleiß-Stellen-Veränderungen

Sechs der 30 neuen Sequenzvariationen befinden sich in unmittelbarer Nähe zu Donor- bzw. Akzeptor-Spleiß-Konsensussequenzen. In dieser Studie wird davon ausgegangen, dass diese Veränderungen in der Basenabfolge zu einer Veränderung des Spleiß-Verhaltens führen. Zur Beurteilung der potentiellen Spleiß-Stellen-Veränderungen wurden sowohl mit einem institutseigenen *Splice Site Prediction*-Programm, als auch mit dem Programm des BDGP die *Splice Scores* der einzelnen Spleiß-Stellen berechnet (siehe 3.2.1, Tabelle 14)

Bei zwei der Patienten (M05-0025, M06-0006-1) kam es im ersten intronischen, bzw. im letzten exonischen Nukleotid zu einem Basenaustausch. Dadurch erhöhten sich die mit dem institutseigenen Programm errechneten *Splice Scores* dieser Donor-Spleiß-Stellen erheblich, bzw. wurden sie vom BDGP-Programm gar nicht mehr als solche erkannt. Diese Ergebnisse sprechen für eine erhöhte Wahrscheinlichkeit

dafür, dass an der originalen Spleiß-Stelle der reguläre Spleiß-Prozess gestört sein sollte.

In gleicher Weise verhält es sich bei einem weiteren Patienten (M06-0212). Zusätzlich ist hier durch den Basenaustausch an letzter intronischer Stelle die Entstehung einer neuen, um eine Base versetzten Akzeptor-Spleiß-Stelle denkbar, wodurch das nachfolgende Exon um ein Nukleotid verlängert würde. Dies würde auf Proteinebene zu einer Verschiebung des Leserasters (*out-of-frame* Mutation) führen. Obwohl von dem BDGP-Programm nicht als solche erkannt, wurde mit dem institutseigenem Programm für diese neue Spleiß-Stelle ein *Splice Score* berechnet, der deutlich unter dem der originalen, aber sequenzveränderten Spleiß-Stelle liegt. Das bedeutet, dass beim Vorliegen der Variante c.161-1G>A der Spleiß-Vorgang mit höherer Wahrscheinlichkeit an der neuen Stelle stattfindet.

Im Falle des Patienten G03-2346 kommt es durch eine Veränderung der Nukleotidsequenz an dritter intronischer Position zu einer Erhöhung des *Splice Scores* der originalen Donor-Spleiß-Stelle (institutseigenes Programm). Das BDGP-Programm erkennt die veränderte Spleiß-Stelle zwar noch als solche, berechnet allerdings hierfür nicht mehr wie für die ursprüngliche Spleiß-Stelle den höchstmöglichen, sondern einen deutlich niedrigeren *Splice Score*. Gleichzeitig wird durch das BDGP-Programm eine alternative Donor-Spleiß-Stelle vorgeschlagen, deren *Splice Score* zwar unter dem der ursprünglichen, aber deutlich über dem der modifizierten Spleiß-Stelle liegt. Auch das institutseigene Programm ermittelt für diese alternative Spleiß-Stelle einen Wert, der deutlich unter dem der modifizierten originalen Spleiß-Stelle liegt.

Die Sequenzvariationen der Patienten M06-0212 und G03-2346 lassen vermuten, dass die neu entstandene bzw. alternative Spleiß-Stelle der abgewandelten originalen Spleiß-Stelle gegenüber bevorzugt wird.

Die Ergebnisse der *Splice Site Prediction*-Programme für die Patienten G05-1110 und G03-3537 sind weit weniger zwingend, dennoch sind in beiden Fällen Veränderungen des Spleiß-Verhaltens denkbar.

Da bei dem Patienten G05-1110 der Nukleotidaustausch erst an neunter intronischer Position erfolgt, wird dadurch der *Splice Score* der originalen Donor-Spleiß-Stelle nicht verändert. Die Entstehung einer neuen Spleiß-Stelle an dieser Position ist allerdings keineswegs auszuschließen. Zwar liegt der hier, mit dem institutseigenen Programm, ermittelte *Splice Score* deutlich über dem der ursprünglichen Spleiß-Stelle, es wird aber vermutet, dass die neu entstandene Spleiß-Stelle die ursprüngliche nicht ersetzt, sondern eine Alternative zu ihr darstellen könnte (Aktivierung einer kryptischen Spleiß-Stelle).

Im Falle des Patienten G03-3537 bedingt die Variation in der Basenabfolge an fünftletzter intronischer Position eine leichte Veränderung der *Splice Scores* der ursprünglichen Akzeptor-Spleiß-Stelle. Gleichzeitig könnte aber auch hier eine kryptische Spleiß-Sequenz aktiviert werden, die bei Berechnung mit dem institutseigenen Programm einen ähnlichen *Splice Score*, wie die originale Spleiß-Stelle aufweist. Im Gegensatz zu dem Patienten G05-1110 ist es hier somit noch wahrscheinlicher, dass die neue Spleiß-Stelle eine Alternative zur ursprünglichen Spleiß-Stelle darstellt. In beiden Fällen (G05-1110, G03-3537) könnte, durch die konkurrierenden Spleiß-Stellen, neben intakter auch fehlerhafte mRNA entstehen, was nach Translation zu einer reduzierten Menge an voll funktionsfähigen ABCA4-Transportern führen könnte.

Da die gesamte Diskussion der Spleiß-Stellen auf theoretischen Berechnungen basiert, ist es um weitere Aussagen treffen zu können nötig, die potentiellen Spleiß-Stellen-Veränderungen durch weitere experimentelle Untersuchungen, wie z.B. dem *Exon Trapping*, zu evaluieren.

4.3. Detektionsrate neuer Mutationen mittels Sequenzierung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die 50 Exone des ABCA4-Gens von 54 STGD- und ZSD-Patienten, bzw. Patienten, die keinem dieser beiden Krankheitsbilder eindeutig zugeordnet werden konnten, komplett sequenziert und analysiert.

Es handelte sich dabei um Patienten, bei denen trotz eines wahrscheinlichen rezessiven Erbgangs bei vorangegangenen Untersuchungen lediglich eine Mutation gefunden wurde. Zusätzliche Mutationen konnten allerdings nur in 55,6% der Fälle detektiert werden, was bedeutet, dass auch nach vollständiger Sequenzanalyse der kodierenden Exone noch 24 Personen (44,4%) lediglich ein Krankheitsallel aufweisen.

In erster Linie sind für diese auffällige Diskrepanz methodische Gründe anzuführen. Große genomische Veränderungen, wie z.B. große Deletionen, Insertionen oder Inversionen können mit der PCR-Methode, die dem direkten Sequenzieren vorangeht, nicht erfasst werden (Rivera et al., 2000). Außerdem wurden in dieser Arbeit durch die direkte Sequenzierung die regulatorischen Regionen, wie der Promoter, sowie der größte Teil der intronischen Abschnitte des Gens nicht abgedeckt, da dies mittels direkter Sanger-Sequenzierung (Sanger et al., 1977) mit einem enormen Aufwand verbunden wäre.

Dass sich in intronischen Genabschnitten der ABCA4-Gens jedoch weitere pathogene Sequenzvariationen verstecken können wurde durch Braun et al. (2013) mittels *Next-generation sequencing* gezeigt. In der Arbeit wird dargelegt, dass auch weit intronisch gelegene Sequenzveränderungen zu einem veränderten Spleiß-Verhalten und somit zur fehlerhaften mRNA-Synthese führen können (Braun et al., 2013, Faustino and Cooper, 2003). Weiter enthalten Introne unterschiedliche funktionelle Abschnitte deren Einfluss auf die Genregulation (Mattick and Makunin, 2006, Le Hir et al., 2003, Choi et al., 1991), durch Mutationen gestört werden könnte. So beeinflussen intronische Sequenzen die Prozessierung der RNA z.B. im Rahmen des Spleißens (Faustino and Cooper, 2003, Fairbrother and Chasin, 2000, Cooper and Mattox, 1997, Pagani et al., 2002). Beispielsweise wurde im ABCA4-Gen eine mit arZSD assoziierte Mutation im Intron 48 beschrieben, welche zum *exon skipping* von Exon 49 und damit zum Verlust des Carboxy-Terminus des ABCA4-Proteins führen soll (Stenirri et al., 2006).

Zur weiteren Abdeckung dieser Lücken könnte es, neben der direkten Sequenzierung der Promotorregion, von Nutzen sein weitere molekularbiologische Untersuchungsmethoden, wie z.B. *Southern Blot* oder *Multiplex ligation-dependent*

probe amplification (MLPA) durchzuführen. Um den tatsächlichen Anteil dieser methodischen Limitationen an der niedrigen Detektionsrate beurteilen zu können, wäre eine komplette Sequenzanalyse des gesamten ABCA4-Genortes nötig (Rivera et al., 2000). Mit den zum Zeitpunkt dieser Arbeit verfügbaren Methoden wäre dies jedoch mit einem sehr großen zeitlichen und finanziellen Aufwand verbunden gewesen, wenn man sich vor Augen hält, dass das gesamte Gen eine Größe von 150 kb hat. Die im Rahmen dieser Arbeit sequenzierten Exone haben zusammen genommen eine Größe von 6819 bp (Allikmets et al., 1998), was einem Anteil von 4,5 % am gesamten Gen entspricht. Zwischenzeitlich wurden jedoch mit dem *Next-generation sequencing* neue Methoden entwickelt, die die Sequenzanalyse bedeutend größerer DNA-Abschnitte möglich machen (Liu et al., 2012) und somit gut geeignet wären die in dieser Arbeit nicht sequenzierten Genabschnitte weiter zu untersuchen. Es muss jedoch auch hier bedacht werden, dass mit der bloßen Detektion einer Variante deren Pathogenität oft nicht geklärt werden kann.

Eine weitere Erklärung dafür, dass bei 24 von 54 Patienten (44%) keine zweite Mutation gefunden wurde ergibt sich aus den unterschiedlichen Detektionsraten der einzelnen Patientengruppen. So beträgt der Anteil der Patienten mit zusätzlichen Mutationen bei den ZSD- und STGD-Patienten 61,5 % bzw. 60%, während er sich in der Gruppe der nicht eindeutig zuordenbaren Patienten auf lediglich 16,7% beläuft. So könnte es sich bei den fünf der sechs zu letzterer Gruppe gehörenden Patienten, bei denen nur eine Mutation im ABCA4-Gen detektiert wurde, um sogenannte Phänokopien handeln. Dies würde bedeuten, dass andere Formen der Makuladystrophien vorlägen, welche einem M. Stargardt bzw. einer ZSD phänotypisch stark ähneln, jedoch nicht über autosomal rezessive Mutationen im ABCA4-Gen vererbt werden (Rivera et al., 2000). Die Detektion einer Mutation des ABCA4-Gens ließe sich in diesem Falle durch die relativ hohe Heterozygotenwahrscheinlichkeit von 1:10 bis 1:50 (Ducroq et al., 2006) für ein pathogenes ABCA4-Allel erklären und würde nicht im Zusammenhang mit der Entwicklung einer Makuladystrophie stehen. Insbesondere für die Patienten, deren Krankheitsbild bereits klinisch weder dem M. Stargardt noch der ZSD zugeordnet werden konnte, erscheint die Möglichkeit, dass keine der beiden oben genannten Formen der Makuladystrophie, sondern eine Phänokopie vorliegt denkbar.

Eventuell ließe sich diese Erklärung auch auf einzelne Patienten der STGD- und ZSD-Gruppen anwenden. Naheliegender ist diese Annahme bei den Patienten M06-0204 (STGD), G05-0867 (ZSD) und M06-0088 (STGD). Durch die Analyse mit dem ABCR400 Genchip wurde bei den Patienten M06-0204 und G05-0867 die Variation c.1928T>G, p.Val643Gly und bei dem Patienten M06-0088 die Variation c.4283C>T, p.Thr1428Met detektiert (siehe Tabelle 1). Diese Sequenzvariationen wurden bisher nur im Zusammenhang mit AMD publiziert (Allikmets et al., 1997b) und ein Krankheitswert bzgl. STGD und arZSD ist nicht erwiesen. Geht man davon aus, dass diese Variationen nicht ursächlich für die Entwicklung eines M. Stargardt bzw. einer arZSD sind, so wurde bei beiden Patienten keine einzige krankheitsverursachende Mutation im ABCA4-Gen detektiert was durch das Vorliegen einer Phänokopie erklärt werden könnte.

Es muss aber auch in Betracht gezogen werden, dass der Ausbildung der Makuladystrophie, bei den Patienten mit nur einem pathogenen ABCA4-Allel, Mutationen in anderen Genen zugrunde liegen könnten. So ist in sehr seltenen Fällen eine pathogene Veränderung im ELOVL4-Gen ursächlich für einen M. Stargardt (Bernstein et al., 2001) (siehe 1.3.1). Bei der ZSD kommen sogar zahlreiche andere Gene in Betracht, da es sich hier um ein genetisch heterogenes Krankheitsbild handelt (Kohl, 2009)(siehe 1.3.2). Da bei keinem der Patienten eine genetischen Untersuchungen anderer Gene vorliegt, ist es möglich, dass hier der Ausbildung der Krankheit nicht die einzelne Mutation des ABCA4-Gens zugrunde liegt, sondern Mutationen in anderen krankheitsassoziierten Genen. Auch Interaktionseffekte zwischen Mutationen im ABCA4-Gen und Allelen anderer Gene, welche zur Entwicklung einer Makuladystrophie führen könnten, sind denkbar.

Nicht zuletzt muss auch in Betracht gezogen werden, dass eventuell eine einzelne Mutation im ABCA4-Gen einen möglicherweise schwachen Phänotyp des M. Stargardt oder der ZSD auslösen könnte. V.a. bei Mutationen, welche nach der unter 3.2.2 beschriebenen Einteilung als schwer zu werten sind, wäre dies denkbar. Bei den Patienten, bei denen im Rahmen dieser Arbeit lediglich eine pathogene Sequenzvariation nachgewiesen wurde (siehe Tabelle 12), war jedoch eine Zuordnung zu einem Schweregrad nicht möglich. Ausgenommen hiervon sind die AMD-Patienten, deren Detektionsrate unter 4.6 diskutiert wird.

4.4. Detektion von drei potentiell pathogenen Sequenzveränderungen

Durch das direkte Sequenzieren wurden bei fünf der untersuchten Patienten zusätzlich zu der über den ABCR400 Genchip detektierten Mutation zwei weitere potentiell pathologische Sequenzveränderungen entdeckt (siehe Tabelle 11). Da sowohl beim M. Stargardt als auch bei arZSD zwei pathogene Sequenzvarianten für die Ausbildung des jeweiligen Krankheitsbildes ausreichend sind, sollen an dieser Stelle Gründe für die Detektion von drei potentiell krankheitsauslösenden Variationen bei einem Patienten diskutiert werden.

4.4.1. Potentiell komplexe Krankheitsallele

Eine mögliche Erklärung für den oben genannten Sachverhalt stellt das Vorliegen von komplexen Allelen dar. Bei einem komplexen Allel liegen zwei oder mehrere Sequenzvariationen auf einem Chromosom gekoppelt vor. Die Veränderungen betreffen also nur eine der beiden Genkopien, während die andere davon unbeeinflusst bleibt. Beim ABCA4-Gen kommt dies z.B. bei dem komplexen Allel c.1622T>C (p.Leu541Pro) / c.3113C>T (p.Ala1038Val) vor (Rivera et al., 2000). In der Studie von Rivera et al. (2000), in der neben augengesunden Kontrollpersonen, deutsche STGD- und AMD-Patienten untersucht wurden, ist dieses komplexe Allel mit einer Frequenz von 12,7% das am zweithäufigsten detektierte Allel.

Im Falle der Patienten, bei denen drei potentiell krankheitsauslösende Veränderungen gefunden wurden, würde das bedeuten, dass jeweils zwei der Veränderungen auf einem Chromosom gekoppelt vorlägen, während die dritte Variation auf dem anderen Chromosom lokalisiert wäre. Dies hätte zwei fehlerhafte Genkopien und damit eine entsprechende funktionelle Auswirkung auf die Funktion des ABCA4-Proteins zur Folge. Das Vorliegen von komplexen Allelen könnte z.B. weiter evaluiert werden, indem man die gesunden Eltern betroffener Patienten auf die drei detektierten Mutationen hin untersucht. Wären in einem gesunden Individuum zwei Mutationen zu finden, spräche dies dafür, dass beide Mutationen auf einem Chromosom gekoppelt sind und somit ein komplexes Allel vorliegt.

4.4.2. Potentiell nicht krankheitsverursachende Polymorphismen

Beim Vorliegen von drei potentiell krankheitsverursachenden Veränderungen muss weiter bedacht werden, dass es sich bei der Analyse der Auswirkungen der Sequenzveränderungen auf Proteinebene, sowie bei deren Beurteilung bezüglich ihrer Pathogenität lediglich um theoretische Überlegungen handelt. Es kann sich also durchaus bei einer der drei in Tabelle 11 pro Patienten aufgeführten Variationen um einen nicht krankheitsverursachenden Polymorphismus handeln. Besonders im Falle der Patienten G03-3537 und G05-1110 muss an diese Möglichkeit gedacht werden. Bei beiden Patienten wurden drei potentiell pathogene Sequenzvarianten gefunden, wobei es sich bei jeweils einer davon um eine bisher unbekannte potentielle Spleiß-Stellen-Veränderung handelte (siehe Tabelle 11).

Unter Punkt 4.2 wurden die Ergebnisse der *Splice Score*-Berechnung für alle in dieser Studie gefundenen potentielle Spleiß-Stellen-Veränderung diskutiert. Hieraus lässt sich schließen, dass es sich bei den Sequenzvarianten c.1100-5G>A und c.3813+9G>C zwar um theoretisch denkbare Spleiß-Mutationen handelt, die Wahrscheinlichkeit für eine tatsächliche Spleiß-Stellen-Veränderung aber deutlich unter der der anderen detektierten potentiellen Spleiß-Stellen-Veränderung liegt. Die Tatsache, dass bei beiden Patienten eine weitere potentiell pathogene Variation entdeckt wurde legt eher die Annahme nahe, dass es sich bei den oben genannten Sequenzvarianten nicht um pathogene Varianten handelt. Zur Evaluation der einzelnen Sequenzvariationen sind aber auch hier weitere funktionelle Untersuchungen, wie z.B. das *Exon Trapping*, nötig.

4.5. Evaluation des Genotyp-Phänotyp-Modells der ABCA4-assoziierten Erkrankungen

Das unter 1.3.4 beschriebene Genotyp-Phänotyp-Modell versucht ein Zusammenhang zwischen dem mutmaßlichen Schweregrad von Mutationen und dem Schweregrad der daraus resultierenden Phänotypen herzustellen (Maugeri et al., 1999, van Driel et al., 1998, Cremers et al., 1998, Shroyer et al., 1999, Rozet et al., 1998). Um das Modell weiter evaluieren zu können müssen die einzelnen

Mutationen den unterschiedlichen Schweregraden „schwer“, „moderat“ und „mild“ sicher zugeordnet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit war es lediglich möglich *Nonsense*- und *Frame shift*-Mutationen als „schwer“ zu klassifizieren. Eine zuverlässige Einteilung der restlichen Mutationen in die Kategorien „moderat“ und „mild“ ist allein aufgrund theoretischer Überlegungen, ohne weitere experimentelle Untersuchungen nicht möglich (siehe 3.2.2) .

Für das Genotyp-Phänotyp-Modell spricht die Tatsache, dass der Anteil der schweren Mutationen in der Gruppe der ZSD-Patienten, sprich den Patienten mit dem schwereren Phänotyp, mit 38,5 % leicht größer ist als in der Gruppe der Stargardt-Patienten (20 %).

Weiter liegen bei keinem der Stargardt-Patienten zwei schwere Mutationen vor (siehe Tabelle 15), was ebenfalls mit dem Genotyp-Phänotyp-Modell vereinbar ist. Dem steht jedoch entgegen, dass ein ZSD-Patient (G03-2408) zwei schwere Mutationen aufweist (siehe Tabelle 15), was dem Modell zufolge zu einer arRP, der schwersten Form der ABCA4-assoziierten Netzhautdegenerationen führen müsste (Maugeri et al., 1999, van Driel et al., 1998). Da der Patient G03-2408 zum Diagnosezeitpunkt jedoch erst acht Jahre alt war und die Krankheitsbilder der ZSD und RP ineinander übergehen (Augustin, 2007) wäre es denkbar, dass der Phänotyp zu diesem Zeitpunkt noch nicht vollständig ausgeprägt war und sich erst im Verlauf das Vollbild einer RP entwickelt. Hierrüber würde eine weitere klinische Beobachtung des Patienten Aufschluss geben.

Die Ergebnisse aus der Gruppe der AMD-Patienten sind vermutlich aufgrund der kleinen Stichprobengröße widersprüchlich. So ist, entsprechend des Modells, die einzige bei dem Patienten H-0053MW detektierte Mutation als schwer eingeordnet (siehe Tabelle 15), was laut dem Modell zu einer AMD führen kann. Auch das Vorliegen zweier Mutationen, wie bei dem Patienten L-0099MK (siehe Tabelle 15), könnte laut Maugeri et al. (1999) eine AMD bedingen, solange es sich dabei um milde bzw. moderate Mutationen mit ausreichender ABCA4-Restfunktion handelt. Bei einem weiteren Patienten (H-0144HK) liegt jedoch neben einer schweren *Frame*

shift-Mutation noch eine weitere Mutation vor (siehe Tabelle 15). Schon bei einer milden Mutation würde man laut dem Modell als Phänotyp einen M. Stargardt erwarten. Diese weitere Mutation (c.3113 C>T, p.Ala1038Val) wird aber bei Maugeri et al. (1999) (allerdings basierend auf dem Genotyp-Phänotyp-Modell) sogar als moderat eingestuft. Dies hätte laut dem Modell sogar die zweitschwerste Form der ABCA4-assoziierten Netzhautdegenerationen, eine ZSD, zur Folge (Maugeri et al., 1999, van Driel et al., 1998).

Sowohl bei dem oben genannten ZSD-Patienten (G03-2408), als auch bei dem AMD-Patienten (H-0144HK) kann man nun diskutieren, ob es sich bei den als schwer eingestuften Mutationen tatsächlich um schwere oder doch um moderate oder milde Mutationen handelt. So ist zum Beispiel denkbar, dass bei einer *Nonsense*- oder *Frameshift*-Mutation im 3'-Bereich des ABCA4-Gens, welche einen Kettenabbruch am Carboxy-terminalen Ende des Proteins zur Folge hätte, eine ABCA4-Restfunktion übrigbliebe (Lewis et al., 1999). Diese Mutation könnte somit nicht mehr als Nullmutation bzw. schwere Mutation gewertet werden. Weiter wäre auch in diesen Fällen, wie bereits unter 4.4.1 diskutiert, das Vorliegen komplexer Allele möglich.

Das Genotyp-Phänotyp-Modell bleibt somit weiter ein stark vereinfachtes theoretisches Modell, dessen Relevanz erst durch weitere experimentelle Untersuchungen der funktionellen Konsequenzen der einzelnen Mutationen geklärt werden muss (van Driel et al., 1998). Erst dann wäre, in Korrelation mit dem klinischen Erscheinungsbild der Erkrankung, ein Einsatz des Modells in der Diagnostik als prädiktives Mittel denkbar.

4.6. Zusammenhang zwischen dem ABCA4-Gen und AMD

In der Literatur wird eine Assoziation zwischen Veränderungen des ABCA4-Gens und der Entwicklung einer AMD kontrovers diskutiert (Allikmets et al., 1997b, Rivera et al., 2000, Stone et al., 1998, De La Paz et al., 1999) (siehe 1.3.3). Um diesen Zusammenhang näher zu beleuchten wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit auch das ABCA4-Gen von acht AMD-Patienten untersucht.

In der Gruppe der AMD-Patienten mit Stargardt-ähnlichem Verlauf konnte bei zwei von sechs Betroffenen eine zweite Mutation detektiert werden, was einem Prozentsatz von 33,3 % entspricht (siehe 3.1). Die Detektionsrate liegt somit deutlich unter den Detektionsraten der Patienten, die eindeutig dem M. Stargardt bzw. der ZSD zugeordnet werden konnten, welche bei 60 % bzw. 61,5 % liegen (siehe 3.1). Auch wenn man die Patienten, deren Krankheitsbild weder dem M. Stargardt noch der ZSD eindeutig zugeordnet werden konnten, mit einbezieht liegt die Detektionsrate mit 55,6 % (siehe 3.1) noch deutlich höher. Dieses Ergebnis unterstützt die Theorie von Allikmets et al. (1997b), dass eine monoallelische ABCA4-Mutation ausreichend sein könnte, um eine AMD auszulösen.

Die Tatsache, dass bei zwei der Patienten eine zweite Mutation gefunden wurde ließe sich mit dem unter 1.3.4 und 4.5 beschriebenen und diskutierten Genotyp-Phänotyp-Modell erklären. Demnach könnten auch zwei milde, bzw. eine milde und eine moderate ABCA4-Mutation eine AMD auslösen (Maugeri et al., 1999). Der Sachverhalt, dass bei einem der AMD-Patienten neben einer vermeintlich schweren Mutation eine weitere pathogene Variante detektiert wurde, was dem Genotyp-Phänotyp-Modell prinzipiell widersprechen würde, wurde bereits unter 4.5 diskutiert.

Eine mögliche Erklärung für die widersprüchlichen Studienergebnisse zur Assoziation von ABCA4 und AMD (Allikmets et al., 1997b, Rivera et al., 2000, Stone et al., 1998, De La Paz et al., 1999, Dryja, 1998, Klaver, 1998, Souied et al., 2000, Allikmets, 2000a) (siehe 1.3.3) könnte das Vorliegen verschiedener Subgruppen der AMD sein, von denen nur bestimmte mit ABCA4 assoziiert sind. So konnte in der Arbeit von Fritsche et al. (2012) ein Zusammenhang zwischen monoallelischen Varianten im ABCA4-Gen und einem, dem M. Stargardt in einigen Merkmalen der Fundusautofluoreszenz (FAF) ähnlichen, AMD-Subphänotyp (*fine granular with peripheral punctate spots*, GPS[+]) hergestellt werden. Die Einteilung der in dieser Studie untersuchten AMD-Patienten in Patienten mit STGD-ähnlichem Verlauf und normalem Verlauf (siehe Tabelle 2) erfolgte ohne die Methode der FAF. So wäre das Vorliegen von GPS[+]-Subtypen auch im Falle der beiden Patienten denkbar, die eine ABCA4-Mutation aufweisen, auch wenn deren klinischer Verlauf nicht an einen M. Stargardt erinnert (H-193-GA und W-042-GA). Dies wäre durch die Durchführung einer FAF zu klären.

Geht man wie Stone et al. (1998) und De La Paz et al. (1999) nicht von einem kausalen Zusammenhang zwischen ABCA4-Mutationen und AMD aus, könnte eine Erklärung für die detektierten ABCA4-Veränderungen in der hohen Heterozygotenwahrscheinlichkeit für ein krankheitsassoziiertes ABCA4-Allel von 1:10 bis 1:50 (Ducroq et al., 2006) liegen.

Insgesamt ist die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Zahl an AMD Patienten jedoch zu klein und Studien mit wesentlich größeren Patientenzahlen müssen durchgeführt werden um den Zusammenhang zwischen ABCA4-Varianten und AMD zu klären.

4.7. Evaluation des ABCR400 Genchips

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Effizienz des ABCR400 Genchips für die ABCA4-Diagnostik zu evaluieren. Der Einsatz dieses Genchips ist deshalb von Bedeutung, da es sich bei dem ABCA4-Gen um ein großes Gen, von ca. 150 kb mit 50 Exonen von einer Größe zwischen 33 bp bis 266 bp handelt (Allikmets et al., 1998) (siehe 1.1). Zusätzlich findet sich bei den pathogenen Sequenzveränderungen eine große Heterogenität. So kommen die populationsübergreifend häufigsten krankheitsassoziierten ABCA4-Allele (wie z.B. c.5882G>A, p.Gly1961Glu; c.2588G>C, p.Gly863Ala; c.3113C>T, p.Ala1038Val) lediglich bei ca. zehn Prozent der STGD-Patienten vor (Allikmets, 2000b, Rivera et al., 2000). Diagnostik durch andere Untersuchungsmethoden, wie z. B. dem direkten Sequenzieren ist dagegen aufwendig und teuer. Zum Zeitpunkt dieser Studie testete der Chip auf 486 bekannte, auf dem Chip enthaltene Mutationen und Polymorphismen (Jaakson et al., 2003) (siehe Tabelle 16).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die 50 Exone von insgesamt 62 Patienten, die im Vorfeld mit dem ABCR400 Genchip untersucht wurden, direkt sequenziert. Bei allen Patienten war durch den *Array* jeweils ein pathogenes Allel detektiert worden, welches in allen 62 Fällen mittels der direkten Sequenzierung bestätigt werden konnte. Somit kann für das Testverfahren des Asper Genchips ein positiver prädiktiver Wert von 100% berechnet werden.

Insgesamt wurden durch das direkte Sequenzieren 37 zusätzliche Mutationen detektiert, wobei in fünf Fällen 3 potentiell pathogene Sequenzvarianten pro Patient entdeckt wurden. Dies bedeutet, dass bei 32 von 62 Patienten eine zusätzliche Mutation gefunden wurde. Dreißig der durch das direkte Sequenzieren detektierten Varianten sind bisher noch nicht beschriebene Sequenzveränderungen, zwei waren zum Zeitpunkt dieser Studie zwar bereits beschrieben, aber noch nicht in die Asper Chip-Diagnostik aufgenommen. Werden neue Varianten entdeckt, kann der Chip problemlos um diese erweitert werden (Jaakson et al., 2003). Wären zum Zeitpunkt der Routinediagnostik, die durch das direkte Sequenzieren gefundenen Mutationen bereits auf dem Genchip aufgebracht gewesen, wäre bei lediglich 28 der M.Stargardt- und ZSD-, bzw. beiden Krankheitsbildern nicht eindeutig zuordenbaren Patienten die Frage nach der zweiten Mutation offen geblieben.

Bei einem Patienten (G05-1110) war das Chip-Ergebnis für die später beim direkten Sequenzieren gefundene Mutation aus technischen Gründen nicht aussagekräftig. Daher ist es anzuraten im Falle eines nicht eindeutigen Chip-Resultates für einzelne Positionen diese durch direktes Sequenzieren zu überprüfen.

In vier Fällen konnte ein falsch negatives Ergebnis für den Asper Chip nachgewiesen werden (6,5%), was zeigt, dass auch dies in wenigen Fällen als Ursache für eine fehlende zweite Mutation im ABCA4-Gen in Frage kommt. Allerdings ist es nicht möglich den negativen prädiktiven Wert zu errechnen, da es hierfür nötig wäre, die Anzahl der richtig bzw. falsch Negativen zu kennen. Da es durch das direkte Sequenzieren aber methodisch nicht möglich ist alle Nukleotidveränderungen abzudecken, die potentiell krankheitsverursachend sein könnten (siehe 4.3), bleibt die Anzahl der richtig bzw. falsch positiven unbekannt.

Die Detektionsrate des ABCR400 Genchip steigt mit der Entdeckung neuer Mutationen stetig an und wird zu einem immer wertvolleren Instrument der Routinediagnostik. Gerade die große Heterogenität der ABCA4-Mutationen macht es daher aber nötig immer weiter nach unbekanntem Veränderungen zu suchen und diese in die Chip-Diagnostik mit einzuschließen.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das ABCA4-Gen von insgesamt 62 M. Stargardt-, ZSD- und AMD-Patienten mittels direkter Sequenzierung untersucht, bei denen im Rahmen der Routinediagnostik lediglich ein krankheitsverursachendes Allel gefunden wurde (siehe 2.1).

Durch die hierbei zusätzlich detektierten ABCA4-Varianten gelang in 32 Fällen (siehe 3.1) eine Diagnosesicherung, was für den betroffenen Patienten v.a. bezüglich Prognose und ggf. Familienplanung von enormer Bedeutung ist. Weiter konnte durch die Detektion von 30 bisher nicht beschriebenen Mutationen (siehe 3.1) auch das Spektrum der bekannten pathogenen ABCA4-Veränderungen erweitert werden, was die Basis für Diagnostik und Forschung am ABCA4-Gen und den damit assoziierten Erkrankungen verbreitert. So steigt die Detektionsrate des in der Routinediagnostik verwendeten ABCR400 Genchips mit der Entdeckung neuer Mutationen stetig an und wird zu einem immer wertvolleren Instrument der Routinediagnostik (siehe 4.7).

Bei 24 (44,4 %) STGD- bzw. ZSD-Patienten wurde keine zusätzliche potentiell pathogene ABCA4-Variante detektiert und weitere Untersuchungen sind nötig um die Gründe hierfür aufzuklären (siehe 3.1 und 4.3).

Aufgrund methodischer Einschränkungen und kleiner Fallzahlen konnte diese Arbeit auch die Fragen nach der Relevanz des Genotyp-Phänotyp-Modells der mit ABCA4-assoziierten Erkrankungen und dem Zusammenhang zwischen dem ABCA4-Gen und AMD nicht vollständig klären. Sie liefert jedoch Hinweise zur weiteren Stützung des Modells (siehe 4.5 und 4.6).

Insgesamt ist es daher nötig die Forschung im Bereich des ABCA4-Gens und der damit assoziierten Erkrankungen weiter voranzutreiben, um die Diagnostik weiter zu verbessern und Ansätze zur Entwicklung neuer therapeutischer Optionen liefern zu können.

Anhang

Tabelle 16: Liste der 486 zum Zeitpunkt der Arbeit auf dem ABCR400 Genchip enthaltenen Mutationen und Polymorphismen, wie sie von der Firma ASPER Biotech (Tartu, Estland) zur Verfügung gestellt wurde.

EXON	NUCLEOTIDE	AMINO ACID
	CHANGE	CHANGE
1	1 A>G	M1V
	32 T>C	L11P
	45 G>A	W15X
	52 C>T	R18W
	61 C>T	Q21X
2	70 C>T	R24C
	71 G>A	R24H
	106delT	FS
	122 G>A	W41X
	160 T>G	C54G
	IVS+1 G>A	SPLICE
3	161 G>A	C54Y
	161 G>T	C54F
	164 A>C	H55P
	174 C>G	N58K
	178 G>A	A60T
	179 C>T	A60V
	194 G>A	G65E
	203 C>T	P68L
	203 C>G	P68R
	214 G>A	G72R
	223 T>G	C75G
	230 T>A	V77E
	247delCAAA	FS
	250insCAAA	FS
	286 A>G	N96D
	286 A>C	N96H
	288 C>A/G	N96K
	296insA	FS
	298 T>C	S100P
	IVS +1 G>A	SPLICE
4	323 A>T	D108V
	324insT	FS
	428 C>T	P143L
5	454 C>T	R152X
	455 G>A	R152Q
	466 A>G	I156V

EXON	NUCLEOTIDE	AMINO ACID
	CHANGE	CHANGE
	481 G>A	E161K
	514 G>A	G172S
	570 G>C	Q190H
6	IVS-2 A>G	SPLICE
	IVS-2 A>T	SPLICE
	IVS-1 G>T	SPLICE
	574 G>A	A192T
	618 C>G/A	S206R
	634 C>T	R212C
	635 G>A	R212H
	656 G>C	R219T
	658 C>T	R220C
	661?delG	FS
	666del13	FS
	667 A>C	K223Q
	667del12	FS
	667del14	FS
	671delC	FS
	688 T>A	C230S
	730delCT	FS
	731 T>C	L244P
	735 T>G	Y245X
	736 G>A	A246T
	740 A>G	N247S
	740 A>T	N247I
	746 A>G	D249G
	763 C>T	R255C
	768 G>T	SPL or V256V
7	832delT	FS
8	IVS7-45<952 del139bp/ins TCTGACC	SPLICE
	899 C>A	T300N
	926 C>G	P309R
	981 C>T	P327P
	982 G>T	E328X
	983 A>T	E328V
	997 C>T	R333W
	1007 C>G	S336C
	1015 T>G	W339G
	1018 T>G	Y340D
	1018 T>C	Y340H
	1025del14	FS
	1036 A>T	K346X
	1037 A>C	K346T

EXON	NUCLEOTIDE	AMINO ACID
	CHANGE	CHANGE
	1086 T>A	Y362X
9	1140 T>A	N380K
	1220 C>T	A407V
	1222 C>T	R408X
10	1245 C>A	N415K
	1268 A>G	H423R
	1268 A>C	H423P
	1269 C>T	H423H
	1271 T>C	V424A
	1317 G>A	W439X
	1325 T>C	F442S
	1335 C>G	S445R
	1344delG	FS
	delG IVS+5	SPLICE
11	1387delTT	FS
	1411 G>A	E471K
	1494 C>A	D498E
	1506del9	FS
	1513del5	IT505del/FS
	IVS+1 G>A	SPLICE
12	G IVS-1 G>A	SPLICE
	1569 T>G	D523E
	1574 T>G	F525C
	1609 C>T	R537C
	1610 G>A	R537H
	1622 T>C	L541P
	1645 G>C	A549P
	1648 G>A	G550R
	1659 C>G	F553L
	1715 G>A	R572Q
	1715 G>C	R572P
	IVS+2 T>G	SPLICE
13	1789 C>T	P597S
	1798 G>T	D600Y
	1804 C>T	R602W
	1805 G>A	R602Q
	1811 T>G	I604S
	1817 G>C	G606A
	1817 G>A	G606D
	1819 G>T	G607W
	1819 G>A	G607R
	1822 T>A	F608I
	1822 T>C	F608L
	1823 T>A	F608Y

EXON	NUCLEOTIDE	AMINO ACID
	CHANGE	CHANGE
	1847delA	FS
	1853 G>A	G618E
	1894delA	FS
	1903 C>A	Q635K
	1903 C>T	Q635X
	1908 G>T	Q636H
	1917 C>A	Y639X
	1917 C>T	Y639Y
	1922 G>C	C641S
	1927 G>A	V643M
	1928 T>G	V643G
	1933 G>A	D645N
	IVS +1 G>A	SPLICE
	IVS +2 T>C	SPLICE
14	IVS-2 A>G	SPLICE
	IVS-1 G>A	SPLICE
	1957 C>T	R653C
	1988 G>A	W663X
	2005delAT	FS
	2041 C>T	R681X
	2057 T>C	L686S
	2069 G>T	G690V
	2090 G>A	W697X
	2099 G>A	W700X
	2127 G>A	S709S
	2147 C>T	T716M
	IVS+1 G>C	SPLICE
15	2291 G>A	C764Y
	2292delT	FS
	2294 G>A	S765N
	2295 T>G	S765R
	2300 T>A	V767D
	2337 C>A	C779X
16	2385del16	795del6/FS
	2390 T>C	L797P
	2409delAT	FS
	2453 G>A	G818E
	2461 T>A	W821R
	2471 T>C	I824T
	2486 C>T	T829M
	2519 T>G	M840R
	2536 G>C	D846H
	2546 T>C	V849A
	2552 G>A	G851D

EXON	NUCLEOTIDE	AMINO ACID
	CHANGE	CHANGE
	2560 G>A	A854T
	2564 G>A	W855X
	2565 G>A	W855X
	2570delT	FS
	IVS+1 G>A	SPLICE
17	2588 G>C	G863A
	2616 delCT	FS
	2617 T>C	F873L
18	2690 C>T	T897I
	2701 A>G	T901A
	2703 A>G	T901T
19	2791 G>A	V931M
	2804 T>C	V935A
	2819 C>G	P940R
	2826delC	FS
	2827 C>T	R943W
	2828 G>A	R943Q
	2860 T>G	Y954D
	2870 A>G	Q957R
	2876 C>T	T959I
	2883/4delC	FS
	2888delG	FS
	2894 A>G	N965S
	2908 A>C	T970P
	2912 C>A	T971N
	2915 C>A	T972N
20	2920 T>C	S974P
	2932 G>T	G978C
	2933 G>A	G978D
	2947 A>G	T983A
	2948 C>T	T983I
	2966 T>C	V989A
	2971 G>C	G991R
	2971 G>T	G991X
	2977del 8	993delDIE
	3041 T>G	L1014R
	3043 T>A	F1015I
	IVS+5 G>A	SPLICE
21	3055 A>G	T1019A
	3056 C>T	T1019M
	3064 G>A	E1022K
	3085 C>T	Q1029X
	3091A>G	K1031E
	3106 G>A	E1036K

EXON	NUCLEOTIDE	AMINO ACID
	CHANGE	CHANGE
	3113 C>T	A1038V
	3149 G>A	G1050D
	3163 C>T	R1055W
	3187 T<C	S1063P
	IVS+1 G>T	SPLICE
22	IVS-2 A>G	SPLICE
	3205insAA	FS
	3211insGT	FS
	3212 C>T	S1071L
	3215 T>C	V1072A
	3259 G>A	E1087K
	3261 A>C	E1087D
	3272 G>A	G1091E
	3278 A>G	D1093G
	3292 C>T	R1098C
	3295 T>C	S1099P
	3303 G>A	W1101X
	3322 C>T	R1108C
	3323 G>T	R1108L
	3323 G>A	R1108H
23	3335 C>A	T1112N
	3364 G>A	E1122K
	3366 G>C	E1122D
	3385 C>T	R1129C
	3386 G>T	R1129L
	3439delC	L1147X
24	3528insTGCA	FS
	3531 C>A	C1177X
	3602 T>G	L1201R
	3607 G>A	G1203R
	IVS+1 G>A	SPLICE
25	3608 G>A	G1203E
	3610 G>A	D1204N
	3703 A>G	N1235D
	3749 T>C	L1250P
	3754 G>T	E1252X
	3758 C>T	T1253M
	3808 G>T	E1270X
26	3819insT	FS
	IVS+1 G>A	SPLICE
27	3874 C>T	Q1292X
	3898 C>T	R1300X
	3899 G>A	R1300Q
	3970delG	FS

EXON	NUCLEOTIDE	AMINO ACID
	CHANGE	CHANGE
	3994 C>T	Q1332X
	4034insCA	FS
	4073 T>C	L1358P
28	4139 C>T	P1380L
	4163 T>C	L1388P
	4169 T>C	L1390P
	4195 G>A	E1399K
	4200 C>A	Y1400X
	4203 C>A/T	P1401P
	4216 C>T	H1406Y
	4222 T>C	W1408R
	4223 G>T	W1408L
	4224 G>A	W1408X
	4232insTATG	FS
	4234 C>T	Q1412X
	IVS28+4 C>T	SPLICE
	IVS+5 G>T	SPLICE
	IVS+5 G>A	SPLICE
29	IVS-2 A>G	SPLICE
	4283 C>T	T1428M
	4286 T>C	V1429A
	4289 T>C	L1430P
	4297 G>A	V1433I
	4316 G>A	G1439D
	4318 T>G	F1440V
	4319 T>C	F1440S
	4328 G>A	R1443H
	4342 G>A/C	G1448R
	4346 G>A	W1449X
30	IVS-1 G>T	SPLICE
	4363 T>C	C1455R
	4436 G>A	W1479X
	4457 C>T	P1486L
	4462 T>C	C1488R
	4463 G>A	C1488Y
	4463 G>T	C1488F
	4469 G>A	C1490Y
	4506 C>T	C1502C
	4506 C>A	C1502X
	4522 G>T	G1508C
	4535 C>G	P1512R
	4535 C>T	P1512L
	4537insC	FS
	4537 delC	Q1513fsX12

EXON	NUCLEOTIDE	AMINO ACID
	CHANGE	CHANGE
	4538 A>G	Q1513R
	IVS+1 G>T	SPLICE
31	IVS-2 A>G	SPLICE
	4549 C>A	R1517S
	4574 T>C	L1525P
	4577 C>T	T1526M
	4594 G>A	D1532N
	4610 C>T	T1537M
32	IVS32+1 G>A	SPLICE
	IVS+2 T>C	SPLICE
33	4685 T>C	I1562T
	4710delC	FS
	4715 C>T	T1572M
	4720delG	FS
	4732 G>A	G1578R
	4748 T>C	L1583P
	4771 G>A/C	G1591R
	IVS+1 G>A	SPLICE
	IVS+1 G>T	SPLICE
	IVS33+2 T>C	SPLICE
	IVS+48 C>T	SPLICE
34	IVS-2 A>C	SPLICE
	4793 C>A	A1598D
	4838delA	FS
35	4849 G>A	V1617M/SPL
	4854 G>A	W1618X
	4859delATAACA/insTCCT	FS
	4867 G>A	G1623S
	4875 T>A	H1625Q
	4892 T>C	L1631P
	4909 G>A	A1637T
	4918 C>T	R1640W
	4919 G>A	R1640Q
	4926 C>G	S1642R
	4947delC	FS
	4954 T>G	Y1652D
	4956 T>G	Y1652X
	4999 C>A	Q1667K
	IVS+2 T>C	SPLICE
	IVS+2 T>A	SPLICE
36	del IVS-2>5020	SPLICE
	5041del15	VVAIC1681del
	5056 G>A	V1686M
	5065 T>C	S1689P

EXON	NUCLEOTIDE	AMINO ACID
	CHANGE	CHANGE
	5077 G>A	V1693I
	5087 G>A	S1696N
	5107 C>G	Q1703E
	5109_5110delG	FS
	5114 G>T	R1705L
	5114 G>A	R1705Q
	5160del2	FS
	5161del2	FS
	5186 T>C	L1729P
	IVS+1 G>A	SPLICE
	IVS+2 T>C	SPLICE
	IVS+2 T>G	SPLICE
	delIVS+1>+4	SPLICE
	del IVS+1>+6	SPLICE
37	5206 T>C	S1736P
	5222del11	del/FS
	5242 G>A	G1748R
	5248 C>T	Q1750X
	5278del9	1760delLPA
	5281del9	1761delPAL
	5285 C>A	A1762D
	5288 T>C	L1763P
	5288(9)?delT	FS
38	5316 G>A	W1772X
	5327 C>T	P1776L
	5337 C>G	Y1779X
	5337 C>A	Y1779X
	5381 C>A	A1794D
	5395 A>G	N1799D
	5413 A>G	N1805D
	5451 G>T	E1817D
	5459 G>C	R1820P
	IVS+1 G>A	SPLICE
39	IVS-10 T>C	SPLICE
	5512 C>T	H1838Y
	5512 C>G	H1838D
	5527 C>T	R1843W
	5537 T>C	I1846T
	IVS+5 G>A	SPLICE
	IVS+6 T>C	SPLICE
40	IVS-1 G>A	SPLICE
	5603 A>T	N1868I
	5644 A>G	M1882V
	5651 T>A	V1884E

EXON	NUCLEOTIDE	AMINO ACID
	CHANGE	CHANGE
	5653 G>A	E1885K
	5657 G>A	G1886E
	5668delTTC	1890delF
	5682 G>C	L1894L
	5687 T>A	V1896D
	5693 G>A	R1898H
	IVS+5 G>A	SPLICE
41	del A IVS-2	SPLICE
	5761 G>A	V1921M
	5814 A>G	L1938L
	5819 T>C	L1940P
	5821 C>T	H1941Y
42	5843 CA>TG	P1948L
	5843 C>T	P1948L
	5844 A>G	P1948P
	5881 G>A	G1961R
	5882 G>A	G1961E
	5888delG	FS
	IVS+1 G>T	SPLICE
	IVS+1 G>A	SPLICE
43	5905delG	FS
	5908 C>T	L1970F
	5912 T>G	L1971R
	5914 G>A	G1972R
	5917delG	FS
	5923 G>C	G1975R
	5929 G>A	G1977S
	5936 C>T	T1979I
	5961del4	FS
	IVS+1 G>T	SPLICE
44	6069 C>T	I2023I
	6079 C>T	L2027F
	6088 C>T	R2030X
	6089 G>A	R2030Q
	6104 T>C	L2035P
	6112 C>T	R2038W
	6118 C>T	R2040X
45	6148 G>C	V2050L
	6166 A>T	K2056X
	6179 T>G	L2060R
	6190 G>C	A2064P
	6212 A>T	Y2071F
	6229 C>T	R2077W
	6229 C>G	R2077G

EXON	NUCLEOTIDE	AMINO ACID
	CHANGE	CHANGE
	6238delTC	FS
	6249 C>T	I2083I
	6276 G>A	V2092V
46	6285 T>C	D2095D
	6286 G>A	E2096K
	6300delG	FS
	6316 C>T	R2106C
	6320 G>A	R2107H
	6320 G>C	R2107P
	6329 G>A	W2110X
	6339 C>G	I2113M
	6352delA	FS
	6383 A>G	H2128R
	IVS+2 C>G	SPLICE
47	6391 G>A	E2131K
	6415 C>T	R2139W
	6437G>A	G2146D
	6445 C>T	R2149X
	6446 G>T	R2149L
	6448 T>C	C2150R
	6449 G>A	C2150Y
	6479 A>G	K2160R
48	6498 C>G	I2166M
	6498 C>T	I2166I
	6519del11	FS
	6529 G>A	D2177N
	6543del36	2181del12
	6560 A>C	Q2187P
	6563 T>C	F2188S
	6568delC	FS
	6601delAG	FS
	6609 C>A	Y2203X
	6658 C>T	Q2220X
	6662 T>C	L2221P
	6686 T>C	L2229P
	6693 C>T	I2231I
	6707del8	FS
	6709insG	FS
	6710insA	FS
	6721 C>G	L2241V
	IVS+1 G>A	SPLICE
	IVS+21 C>T	SPLICE
49	IVS48-10del9	FS
	6748delA	FS

EXON	NUCLEOTIDE	AMINO ACID
	CHANGE	CHANGE
	6757 A>G	T2253A
	6764 G>T	S2255I
	6788 G>T	R2263L
	6813 C>T	A2271A
50	IVS49 -1 G>A	SPLICE

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Strukturmerkmale des ABCA4-Transporters. (a) lineares Diagramm des ABCA4-Proteins; (b) topologisches Modell des ABCA4-Proteins in der Zellmembran. Jede ECD beinhaltet dabei multiple Oligosaccharid-Ketten. Abbildung entnommen aus Molday et al. (2009)..... 3
- Abbildung 2: Reaktionen die, bei Verlust von ABCA4-Aktivität, zur Bildung von A2E führen. All-trans-Retinal reagiert mit PE und bildet dadurch N-Ret-PE, welches sich mit all-trans-Retinal verbinden kann, wodurch A2PE in den Außensegmenten entsteht. Nach der Phagozytose kann A2PE durch lysosomale Enzyme in den RPE-Zellen zu A2E und Phosphatidsäure (PA) hydrolysiert werden. Die Reduktion von N-RET-PE zu N-retinyl-PE durch NaBH_4 ist ebenfalls gezeigt. (Molday et al., 2009)..... 8
- Abbildung 3: Genotyp- Phänotyp-Modell. Darstellung der Korrelation zwischen der ABCA4-Transporter-Restaktivität und der Schwere des Krankheitsbildes. Die arRP ist der schwerste rezessiv vererbte Phänotyp, STGD der mildeste. Eine Prädisposition für AMD liegt eventuell vor bei einem moderat oder schwer pathogenen ABCA4-Allel, bzw. zwei milden Mutationen oder einer Kombination aus milder und moderater Mutation. Die Abbildung wurde übernommen und angepasst nach Maugeri et al. (2000). 14
- Abbildung 4: Prinzip der APEX-Methode: i: Oligonukleotide sind auf dem Glasträger angeordnet; ii: komplementäre DNA-Fragmente binden an Oligonukleotide; iii: sequenzspezifische Verlängerung der Primer am 3'-Ende mit fluoreszenzmarkierten ddNTPs; iv: DNA-Matrize und ddNTPs sind abgewaschen und das Fluoreszenzsignal wird detektiert (Jaakson et al., 2003)..... 27

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: STGD- und ZSD-Patienten, sowie Patienten, die weder dem einen noch dem anderen Krankheitsbild eindeutig zugeordnet werden konnten, mit initial bekannter monoallelischer Mutation bei Diagnosestellung.	18
Tabelle 2: AMD-Patienten mit bekannter ABCA4-Mutation und AMD-Phänotyp.	20
Tabelle 3: Oligonukleotid-Primer IDs und Sequenzen für PCR und Cycle Sequencing.	21
Tabelle 4: Verwendete Enzyme und Kit-Systeme.	23
Tabelle 5: Benutzte Chemikalien.	23
Tabelle 6: Verwendete Puffer und Lösungen mit Zusammensetzungen.	24
Tabelle 7: Verwendetes Verbrauchsmaterial.	24
Tabelle 8: Verwendete Geräte.	25
Tabelle 9: PCR-Bedingungen der einzelnen Exone und zur Sequenzierung verwendete Primer.	30
Tabelle 10: Übersicht über die potentiell pathogenen Sequenzveränderungen, welche zusätzlich zu den vom ABCR400 Genchip detektierten Varianten gefunden wurden. Neben der entsprechenden Referenz ist die Ursache dafür angegeben, weswegen die Variation mit dem ASPER Array nicht erkannt wurde. Die Sequenzveränderungen sind dem Patienten zugeordnet der diese trägt.	39
Tabelle 11: Dem jeweiligen Krankheitsbild zugeordnete Patienten mit den durch den ABCR400 Genchip detektierten Mutationen sowie den zusätzlich gefundenen potentiell pathogenen Sequenzvariationen und deren Effekt auf Proteinebene. Die erste Zeile gibt jeweils die vom ABCR400 Genchip detektierte Mutation an.	41
Tabelle 12: Auflistung der Patienten, bei denen keine zusätzliche, potentiell pathogene Sequenzveränderung detektiert werden konnte, mit der vom ABCR400 Genchip detektierten Mutation.	43
Tabelle 13: Zuordnung der detektierten de novo Varianten zum Mutationstyp, entsprechende ihrer möglichen Effekte auf Proteinebene.	45

Tabelle 14: Splice Scores der potentiellen Spleiß-Stellen-Veränderungen; / : Spleiß-Stelle wurde vom Splice Score Prediction Programm nicht erkannt; neue Spleiß-Stelle: durch den Nukleotidaustausch neu entstandene potentielle Spleiß-Stelle; alternative Spleiß-Stelle: alternative Spleiß-Stelle in der Nähe der originalen Spleiß-Stelle.	47
Tabelle 15: Patienten, deren Mutationen einem Schweregrad zugeordnet werden konnte.....	49
Tabelle 16: Liste der 486 zum Zeitpunkt der Arbeit auf dem ABCR400 Genchip enthaltenen Mutationen und Polymorphismen, wie sie von der Firma ASPER Biotech (Tartu, Estland) zur Verfügung gestellt wurde.....	64

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A2E	<i>N</i> -retinylidene- <i>N</i> -retinylethanolamin
A2PE	di-retinoid pyridinium-PE
AAP	antarktischen alkalischen Phosphatase
ABCA4	<i>ATP-binding cassette, sub-family A, member 4</i>
ABCR	<i>ATP-binding cassette, retina-specific</i>
AMD	Altersabhängige Makuladegeneration
APEX	<i>arrayed primer extension</i>
arZSD	autosomal rezessive Zapfen-Stäbchen-Dystrophie
arRP	autosomal rezessive Retinitis pigmentosa
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> , Adenosintriphosphat
BD	<i>BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit</i>
BDGP	<i>Berkeley Drosophila Genome Project</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BLAT	<i>BLAST-like alignment tool</i>
bp	Basenpaar(e)
°C	Grad Celsius
C	Carboxy-Terminus (Abbildung 1)
C	Cytosin
c.	Veränderung bezogen auf eine cDNA-Sequenz
cDNA	<i>complementary DNA</i>
del	<i>deletion</i> , Deletion
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat(e)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat(e)
DOG	Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft
dup	<i>duplication</i> , Duplikation
ECD	extrazelluläre Domäne(n)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELOVL4	<i>Elongation of very long chain fatty acids protein 4</i>
EOG	Elektrookulogramm
ERG	Elektroretinogramm

Exo	Exonuklease
FAF	Fundusautofluoreszenz
FFM	Fundus Flavimaculatus
fs	<i>frameshift</i>
G	Guanin
g	Gramm
GPS[+]	<i>fine granular with peripheral punctate spots</i>
H ₂ O	Wasser
HCl	Wasserstoffchlorid
HGMD	<i>Human Gene Mutation Database</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
ID	Identifikator
ins	<i>insertion</i> , Insertion
kb	Kilobase(n)
KCl	Kaliumchlorid
M	molar
M.	Morbus
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MLPA	<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
mm	Millimeter
mM	millimolar
MPSG	<i>Macular Photocoagulation Study Group</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
N	Amino-Terminus (Abbildung1)
N	Stickstoff
N-Ret-PE	N-retinylidene-PE
NaBH ₄	Natriumborhydrid
NBD	Nukleotid-bindenden Domäne (n)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanogramm
OH	Hydroxygruppe
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>

p.	Veränderung bezogen auf eine Protein-Sequenz
PA	Phosphatidsäure
PE	Phosphatidylethanolamin
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Retinitis pigmentosa
RPE	retinales Pigmentepithel
rpm	<i>revolutions per minute</i>
sec	Sekunde(n)
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
STGD	Morbus Stargardt
T	Thymin
T _A	<i>Annealing</i> -Temperatur
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TD	<i>Touch Down</i>
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Unit(s)</i>
UCSC	<i>University of California, Santa Cruz</i>
USA	<i>United States of America</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
w/v	<i>weights per volume</i>
WT	Wildtyp
X	Stopcodon
ZSD	Zapfen-Stäbchen-Dystrophie
µl	Mikroliter
µM	mikromolar

Aminosäuren:

Ala	Alanin
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure

Cys	Cystein
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
His	Histidin
Ile	Isoleucin
Leu	Leucin
Lys	Lysin
Met	Methionin
Phe	Phenylalanin
Pro	Prolin
Ser	Serin
Thr	Threonin
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
Val	Valin

Literaturverzeichnis

- ADAMIS, A. P., SHIMA, D. T., TOLENTINO, M. J., GRAGOUDAS, E. S., FERRARA, N., FOLKMAN, J., D'AMORE, P. A. & MILLER, J. W. 1996. Inhibition of vascular endothelial growth factor prevents retinal ischemia-associated iris neovascularization in a nonhuman primate. *Arch Ophthalmol*, 114, 66-71.
- AGUIRRE-LAMBAN, J., RIVEIRO-ALVAREZ, R., MAIA-LOPES, S., CANTALAPIEDRA, D., VALLESPIN, E., AVILA-FERNANDEZ, A., VILLAVERDE-MONTERO, C., TRUJILLO-TIEBAS, M. J., RAMOS, C., AYUSO, C. 2009. Molecular analysis of the ABCA4 gene for reliable detection of allelic variations in Spanish patients: identification of 21 novel variants. *Br J Ophthalmol*, 93(5), 614-21.
- AIELLO, L. P., NORTHRUP, J. M., KEYT, B. A., TAKAGI, H. & IWAMOTO, M. A. 1995. Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor in retinal cells. *Arch Ophthalmol*, 113, 1538-44.
- AISENBREY, S., ZIEMSEN, F., VOLKER, M., GELISKEN, F., SZURMAN, P., JAISSE, G., GRISANTI, S. & BARTZ-SCHMIDT, K. U. 2007. Intravitreal bevacizumab (Avastin) for occult choroidal neovascularization in age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 245, 941-8.
- ALLIKMETS, R., SINGH, N., SUN, H., SHROYER, N. F., HUTCHINSON, A., CHIDAMBARAM, A., GERRARD, B., BAIRD, L., STAUFFER, D., PEIFFER, A., RATTNER, A., SMALLWOOD, P., LI, Y., ANDERSON, K. L., LEWIS, R. A., NATHANS, J., LEPPERT, M., DEAN, M., LUPSKI, J. R. 1997a. A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat Genet*, 17, 122.
- ALLIKMETS, R. 2000a. Further evidence for an association of ABCR alleles with age-related macular degeneration. The International ABCR Screening Consortium. *Am J Hum Genet*, 67, 487-91.
- ALLIKMETS, R. 2000b. Simple and complex ABCR: genetic predisposition to retinal disease. *Am J Hum Genet*, 67, 793-9.
- ALLIKMETS, R., SHROYER, N. F., SINGH, N., SEDDON, J. M., LEWIS, R. A., BERNSTEIN, P. S., PEIFFER, A., ZABRISKIE, N. A., LI, Y., HUTCHINSON, A., DEAN, M., LUPSKI, J. R. & LEPPERT, M. 1997b. Mutation of the Stargardt disease gene (ABCR) in age-related macular degeneration. *Science*, 277, 1805-7.
- ALLIKMETS, R., WASSERMAN, W. W., HUTCHINSON, A., SMALLWOOD, P., NATHANS, J., ROGAN, P. K., SCHNEIDER, T. D. & DEAN, M. 1998. Organization of the ABCR gene: analysis of promoter and splice junction sequences. *Gene*, 215, 111-22.
- AREDSRG 2001a. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E and beta carotene for age-related cataract and vision loss: AREDS report no. 9. *Arch Ophthalmol*, 119, 1439-52.
- AREDSRG 2001b. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8. *Arch Ophthalmol*, 119, 1417-36.
- AUGUSTIN, A. J. 2007. *Augenheilkunde : mit 144 Tabellen*, Berlin {[u.a.]}, Springer, 3. Auflage.

- BEN-SHABAT, S., PARISH, C. A., VOLLMER, H. R., ITAGAKI, Y., FISHKIN, N., NAKANISHI, K. & SPARROW, J. R. 2002. Biosynthetic studies of A2E, a major fluorophore of retinal pigment epithelial lipofuscin. *J Biol Chem*, 277, 7183-90.
- BERG, O. G. & VON HIPPEL, P. H. 1987. Selection of DNA binding sites by regulatory proteins. Statistical-mechanical theory and application to operators and promoters. *J Mol Biol*, 193, 723-50.
- BERNSTEIN, P. S., TAMMUR, J., SINGH, N., HUTCHINSON, A., DIXON, M., PAPPAS, C. M., ZABRISKIE, N. A., ZHANG, K., PETRUKHIN, K., LEPPERT, M. & ALLIKMETS, R. 2001. Diverse macular dystrophy phenotype caused by a novel complex mutation in the ELOVL4 gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42, 3331-6.
- BIRD, A. C. 2010. Therapeutic targets in age-related macular disease. *J Clin Invest*, 120, 3033-41.
- BRAUN, T. A., MULLINS, R. F., WAGNER, A. H., ANDORF, J. L., JOHNSTON, R. M., BAKALL, B. B., DELUCA, A. P., FISHMAN, G. A., LAM, B. L., WELEBER, R. G., CIDECIYAN, A. V., JACOBSON, S. G., SHEFFIELD, V. C., TUCKER, B. A., STONE, E. M. 2013. Non-exonic and synonymous variants in ABCA4 are an important cause of Stargardt disease. *Hum Mol Genet*, 22(25), 5136-45.
- BRIGGS, C. E., RUCINSKI, D., ROSENFELD, P. J., HIROSE, T., BERSON, E. L. & DRYJA, T. P. 2001. Mutations in ABCR (ABCA4) in Patients with Stargardt Macular Degeneration or Cone-Rod Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42(10), 2229-36.
- CARAMOY, A., LIAKOPOULOS, S., MENRATH, E. & KIRCHHOF, B. 2010. Autologous translocation of choroid and retinal pigment epithelium in geographic atrophy: long-term functional and anatomical outcome. *Br J Ophthalmol*, 94, 1040-4.
- CHAUDHARY, V., MAO, A., HOOPER, P. L. & SHEIDOW, T. G. 2007. Triamcinolone acetonide as adjunctive treatment to verteporfin in neovascular age-related macular degeneration: a prospective randomized trial. *Ophthalmology*, 114, 2183-9.
- CHEN, C. Y., WONG, T. Y. & HERIOT, W. J. 2007. Intravitreal bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration: a short-term study. *Am J Ophthalmol*, 143, 510-2.
- CHO, E., SEDDON, J. M., ROSNER, B., WILLETT, W. C. & HANKINSON, S. E. 2004. Prospective study of intake of fruits, vegetables, vitamins, and carotenoids and risk of age-related maculopathy. *Arch Ophthalmol*, 122, 883-92.
- CHOI, T., HUANG, M., GORMAN, C. & JAENISCH, R. 1991. A generic intron increases gene expression in transgenic mice. *Mol Cell Biol*, 11, 3070-4.
- CHRISTEN, W. G., SCHAUMBERG, D. A., GLYNN, R. J. & BURING, J. E. 2011. Dietary omega-3 fatty acid and fish intake and incident age-related macular degeneration in women. *Arch Ophthalmol*, 129, 921-9.
- COOPER, T. A. & MATTOX, W. 1997. The regulation of splice-site selection, and its role in human disease. *Am J Hum Genet*, 61, 259-66.
- CREMERS, F. P., VAN DE POL, D. J., VAN DRIEL, M., DEN HOLLANDER, A. I., VAN HAREN, F. J., KNOERS, N. V., TIJMES, N., BERGEN, A. A., ROHRSCHEIDER, K., BLANKENAGEL, A., PINCKERS, A. J., DEUTMAN, A. F. & HOYNG, C. B. 1998. Autosomal recessive retinitis pigmentosa and cone-rod dystrophy caused by splice site mutations in the Stargardt's disease gene ABCR. *Hum Mol Genet*, 7, 355-62.

- DAMICO, F. M., GASPARIN, F., SCOLARI, M. R., PEDRAL, L. S. & TAKAHASHI, B. S. 2012. New approaches and potential treatments for dry age-related macular degeneration. *Arq Bras Oftalmol*, 75, 71-6.
- DE LA PAZ, M. A., GUY, V. K., ABOU-DONIA, S., HEINIS, R., BRACKEN, B., VANCE, J. M., GILBERT, J. R., GASS, J. D., HAINES, J. L. & PERICAK-VANCE, M. A. 1999. Analysis of the Stargardt disease gene (ABCR) in age-related macular degeneration. *Ophthalmology*, 106, 1531-6.
- DE, S. & SAKMAR, T. P. 2002. Interaction of A2E with model membranes. Implications to the pathogenesis of age-related macular degeneration. *J Gen Physiol*, 120, 147-57.
- DEN DUNNEN, J. T. & ANTONARAKIS, S. E. 2000. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat*, 15, 7-12.
- DOG, B. U. R. G. 2009. Stellungnahme von DOG, BVA und Retinologischer Gesellschaft
Neue Aspekte in der Therapie der neovaskulären altersabhängigen Makuladegeneration. *Ophthalmologe*, 106, 457-464.
- DOG, R. G. U. B. 2012. Stellungnahme von DOG, Retinologischer Gesellschaft und BVA Die Anti-VEGF-Therapie bei der neovaskulären altersabhängigen Makuladegeneration: Therapeutische Strategien.
- DRYJA, T. P., BRIGGS C.E., BERSON E.L. 1998. ABCR Gene and Age-Related Macular Degeneration. *Science*, 279, 1107a.
- DUCROQ, D., SHALEV, S., HABIB, A., MUNNICH, A., KAPLAN, J. & ROZET, J. M. 2006. Three different ABCA4 mutations in the same large family with several consanguineous loops affected with autosomal recessive cone-rod dystrophy. *Eur J Hum Genet*, 14, 1269-73.
- FAIRBROTHER, W. G. & CHASIN, L. A. 2000. Human genomic sequences that inhibit splicing. *Mol Cell Biol*, 20, 6816-25.
- FAUSTINO, N. A. & COOPER, T. A. 2003. Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev*, 17, 419-37.
- FIGURSKA, M., WIERZBOWSKA, J. & ROBASZKIEWICZ, J. 2010. Combined therapy in exudative age-related macular degeneration. *Klin Oczna*, 112, 223-9.
- FINNEMANN, S. C., LEUNG, L. W. & RODRIGUEZ-BOULAN, E. 2002. The lipofuscin component A2E selectively inhibits phagolysosomal degradation of photoreceptor phospholipid by the retinal pigment epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 3842-7.
- FRITSCH L. G., FLECKENSTEIN, M., FIEBIG, B. S., SCHMITZ-VALCKENBERG, S., BINDEWALD-WITTICH, A., KEILHAUER, C. N., RENNER, A. B., MACKENSEN, F., MÖSSNER, A., PAULEIKHOFF, D., ADRION, C., MANSMANN, U., HENDRIK P. N. SCHOLL, H. P. N., HOLZ, F. G. & WEBER, B. H. F. 2012. A Subgroup of Age-Related Macular Degeneration is Associated With Mono-Allelic Sequence Variants in the ABCA4 Gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 53 (4), 2112-8.
- FUMAGALLI, A., FERRARI, M., SORIANI, N., GESSI, A., FOGLIENI, B., MARTINA, E., MANITTO, M. P., BRANCATO, R., DEAN, M., ALLIKMETS, R., CREMONESI, L. 2001. Mutational scanning of the ABCR gene with double-gradient denaturing-gradient gel electrophoresis (DG-DGGE) in Italian Stargardt disease patients. *Hum Genet*, 109(3), 326-38.
- GELISKEN, O. & DE LAEY, J. J. 1985. A clinical review of Stargardt's disease and/or fundus flavimaculatus with follow-up. *Int Ophthalmol*, 8, 225-35.

- GERBER, S., ROZET, J. M., VAN DE POL, T. J., HOYNG, C. B., MUNNICH, A., BLANKENAGEL, A., KAPLAN, J., CREMERS, F.P. 1998. Complete exon-intron structure of the retina-specific ATP binding transporter gene (ABCR) allows the identification of novel mutations underlying Stargardt disease. *Genomics*, 48(1),139-42.
- GONZALES, C. R. 2005. Enhanced efficacy associated with early treatment of neovascular age-related macular degeneration with pegaptanib sodium: an exploratory analysis. *Retina*, 25, 815-27.
- GREENSTEIN, B. 2000. *Greenstein, Color Atlas of Neuroscience*, Stuttgart, Thieme.
- HAMEL, C. P. 2007. Cone rod dystrophies. *Orphanet J Rare Dis*, 2, 7.
- HOLZ, F. G., SCHUTT, F., KOPITZ, J., ELDRED, G. E., KRUSE, F. E., VOLCKER, H. E. & CANTZ, M. 1999. Inhibition of lysosomal degradative functions in RPE cells by a retinoid component of lipofuscin. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40, 737-43.
- JAAKSON, K., ZERNANT, J., KULM, M., HUTCHINSON, A., TONISSON, N., GLAVAC, D., RAVNIK-GLAVAC, M., HAWLINA, M., MELTZER, M. R., CARUSO, R. C., TESTA, F., MAUGERI, A., HOYNG, C. B., GOURAS, P., SIMONELLI, F., LEWIS, R. A., LUPSKI, J. R., CREMERS, F. P. & ALLIKMETS, R. 2003. Genotyping microarray (gene chip) for the ABCR (ABCA4) gene. *Hum Mutat*, 22, 395-403.
- JANSOHN, M. 2007. *Gentechnische Methoden*, München, Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag.
- JOUSSEN, A. M., JOERES, S., FAWZY, N., HEUSSEN, F. M., LLACER, H., VAN MEURS, J. C. & KIRCHHOF, B. 2007. Autologous translocation of the choroid and retinal pigment epithelium in patients with geographic atrophy. *Ophthalmology*, 114, 551-60.
- KENT, W. J. 2002. BLAT--the BLAST-like alignment tool. *Genome Res*, 12, 656-64.
- KLAVER, C. C. & ALLIKMETS, R. 2003. Genetics of macular dystrophies and implications for age-related macular degeneration. *Dev Ophthalmol*, 37, 155-69.
- KLAVER, C. C. W., ASSINK J.J.M., BERGEN A.A.B., VAN DUIJN C.M. 1998. ABCR Gene and Age-Related Macular Degeneration. *Science*, 279, 1107a.
- KLEVERING, B. J., DEUTMAN, A. F., MAUGERI, A., CREMERS, F. P. & HOYNG, C. B. 2005. The spectrum of retinal phenotypes caused by mutations in the ABCA4 gene. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 243, 90-100.
- KOBORI, H., SULLIVAN, C. W. & SHIZUYA, H. 1984. Heat-labile alkaline phosphatase from Antarctic bacteria: Rapid 5' end-labeling of nucleic acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, 6691-6695.
- KOHL, S. 2009. [Genetic causes of hereditary cone and cone-rod dystrophies]. *Ophthalmologe*, 106, 109-15.
- LANG, G.K. 2000. *Ophthalmology A Short Textbook*, Stuttgart, Thieme.
- LAWRENCE E, R. M. (ed.) 2004. *Protein Structure and Function*, London: New Science Press Ltd.
- LE HIR, H., NOTT, A. & MOORE, M. J. 2003. How introns influence and enhance eukaryotic gene expression. *Trends Biochem Sci*, 28, 215-20.
- LEWIS, R. A., SHROYER, N. F., SINGH, N., ALLIKMETS, R., HUTCHINSON, A., LI, Y., LUPSKI, J. R., LEPPERT, M. & DEAN, M. 1999. Genotype/Phenotype analysis of a photoreceptor-specific ATP-binding cassette transporter gene, ABCR, in Stargardt disease. *Am J Hum Genet*, 64, 422-34.

- LIGGETT, P. E., COLINA, J., CHAUDHRY, N. A., TOM, D. & HAFFNER, G. 2006. Triple therapy of intravitreal triamcinolone, photodynamic therapy, and pegaptanib sodium for choroidal neovascularization. *Am J Ophthalmol*, 142, 1072-4.
- LIU, L. LI, Y., LI, S., HU, N., HE, Y., PONG, R., LIN, D., LU, L., LAW, M. 2012. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *J Biomed Biotechnol*, 251364
- MARTINEZ-MIR, A., PALOMA, E., ALLIKMETS, R., AYUSO, C., DEL RIO, T., DEAN, M., VILAGELIU, L., GONZALEZ-DUARTE, R. & BALCELLS, S. 1998. Retinitis pigmentosa caused by a homozygous mutation in the Stargardt disease gene ABCR. *Nat Genet*, 18, 11-2.
- MATA, N. L., WENG, J. & TRAVIS, G. H. 2000. Biosynthesis of a major lipofuscin fluorophore in mice and humans with ABCR-mediated retinal and macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 7154-9.
- MATTICK, J. S. & MAKUNIN, I. V. 2006. Non-coding RNA. *Hum Mol Genet*, 15 Spec No 1, R17-29.
- MAUGERI, A., KLEVERING, B. J., ROHRSCHEIDER, K., BLANKENAGEL, A., BRUNNER, H. G., DEUTMAN, A. F., HOYNG, C. B. & CREMERS, F. P. 2000. Mutations in the ABCA4 (ABCR) gene are the major cause of autosomal recessive cone-rod dystrophy. *Am J Hum Genet*, 67, 960-6.
- MAUGERI, A., VAN DRIEL, M. A., VAN DE POL, D. J., KLEVERING, B. J., VAN HAREN, F. J., TIJMES, N., BERGEN, A. A., ROHRSCHEIDER, K., BLANKENAGEL, A., PINCKERS, A. J., DAHL, N., BRUNNER, H. G., DEUTMAN, A. F., HOYNG, C. B. & CREMERS, F. P. 1999. The 2588G-->C mutation in the ABCR gene is a mild frequent founder mutation in the Western European population and allows the classification of ABCR mutations in patients with Stargardt disease. *Am J Hum Genet*, 64, 1024-35.
- MILLER, J. W., ADAMIS, A. P., SHIMA, D. T., D'AMORE, P. A., MOULTON, R. S., O'REILLY, M. S., FOLKMAN, J., DVORAK, H. F., BROWN, L. F., BERSE, B. & ET AL. 1994. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primate model. *Am J Pathol*, 145, 574-84.
- MOLDAY, L. L., RABIN, A. R. & MOLDAY, R. S. 2000. ABCR expression in foveal cone photoreceptors and its role in Stargardt macular dystrophy. *Nat Genet*, 25, 257-8.
- MOLDAY, R. S., ZHONG, M. & QUAZI, F. 2009. The role of the photoreceptor ABC transporter ABCA4 in lipid transport and Stargardt macular degeneration. *Biochim Biophys Acta*, 1791, 573-83.
- MPSG 1991. Argon laser photocoagulation for neovascular maculopathy. Five-year results from randomized clinical trials. Macular Photocoagulation Study Group. *Arch Ophthalmol*, 109, 1109-14.
- NOBLE, K. G. & CARR, R. E. 1979. Stargardt's disease and fundus flavimaculatus. *Arch Ophthalmol*, 97, 1281-5.
- PAGANI, F., BURATTI, E., STUANI, C., BENDIX, R., DORK, T. & BARALLE, F. E. 2002. A new type of mutation causes a splicing defect in ATM. *Nat Genet*, 30, 426-9.
- PALOMA, E., MARTÍNEZ-MIR, A., VILAGELIU, L., GONZÁLEZ-DUARTE, R., BALCELLS, S. 2001. Spectrum of ABCA4 (ABCR) gene mutations in Spanish patients with autosomal recessive macular dystrophies. *Hum Mutat*, 17(6), 504-10.

- PASTINEN, T., KURG, A., METSPALU, A., PELTONEN, L. & SYVANEN, A. C. 1997. Minisequencing: a specific tool for DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide arrays. *Genome Res*, 7, 606-14.
- PENOTTI, F. E. 1991. Human pre-mRNA splicing signals. *J Theor Biol*, 150, 385-420.
- RADU, R. A., MATA, N. L., BAGLA, A. & TRAVIS, G. H. 2004. Light exposure stimulates formation of A2E oxiranes in a mouse model of Stargardt's macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 5928-33.
- REESE, M. G., EECKMAN, F. H., KULP, D. & HAUSSLER, D. 1997. Improved splice site detection in Genie. *J Comput Biol*, 4, 311-23.
- RIVERA, A., WHITE, K., STOHR, H., STEINER, K., HEMMRICH, N., GRIMM, T., JURKLIES, B., LORENZ, B., SCHOLL, H. P., APFELSTEDT-SYLLA, E. & WEBER, B. H. 2000. A comprehensive survey of sequence variation in the ABCA4 (ABCR) gene in Stargardt disease and age-related macular degeneration. *Am J Hum Genet*, 67, 800-13.
- ROSENBERG, T., KLIE, F., GARRED, P., SCHWARTZ, M. 2007. N965S is a common ABCA4 variant in Stargardt-related retinopathies in the Danish population. *Mol Vis*, 13, 1962-9.
- ROSENFELD, P. J., BROWN, D. M., HEIER, J. S., BOYER, D. S., KAISER, P. K., CHUNG, C. Y. & KIM, R. Y. 2006. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med*, 355, 1419-31.
- ROZEN, S. & SKALETSKY, H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*, 132, 365-86.
- ROZET, J. M., GERBER, S., SOUIED, E., PERRAULT, I., CHATELIN, S., GHAZI, I., LEOWSKI, C., DUFIER, J. L., MUNNICH, A. & KAPLAN, J. 1998. Spectrum of ABCR gene mutations in autosomal recessive macular dystrophies. *Eur J Hum Genet*, 6, 291-5.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-7.
- SEDDON, J. M., AJANI, U. A. & MITCHELL, B. D. 1997. Familial aggregation of age-related maculopathy. *Am J Ophthalmol*, 123, 199-206.
- SEDDON, J. M., COTE, J., DAVIS, N. & ROSNER, B. 2003. Progression of age-related macular degeneration: association with body mass index, waist circumference, and waist-hip ratio. *Arch Ophthalmol*, 121, 785-92.
- SEDDON, J. M., COTE, J., PAGE, W. F., AGGEN, S. H. & NEALE, M. C. 2005. The US twin study of age-related macular degeneration: relative roles of genetic and environmental influences. *Arch Ophthalmol*, 123, 321-7.
- SEDDON, J. M., REYNOLDS, R. & ROSNER, B. 2010. Associations of smoking, body mass index, dietary lutein, and the LIPC gene variant rs10468017 with advanced age-related macular degeneration. *Mol Vis*, 16, 2412-24.
- SEDDON, J. M., WILLETT, W. C., SPEIZER, F. E. & HANKINSON, S. E. 1996. A prospective study of cigarette smoking and age-related macular degeneration in women. *JAMA*, 276, 1141-6.
- SHROYER, N. F., LEWIS, R. A., ALLIKMETS, R., SINGH, N., DEAN, M., LEPPERT, M. & LUPSKI, J. R. 1999. The rod photoreceptor ATP-binding cassette transporter gene, ABCR, and retinal disease: from monogenic to multifactorial. *Vision Res*, 39, 2537-44.
- SHROYER, N. F., LEWIS, R. A. & LUPSKI, J. R. 2000. Complex inheritance of ABCR mutations in Stargardt disease: linkage disequilibrium, complex alleles, and pseudodominance. *Hum Genet*, 106, 244-8.

- SIMONELLI, F., TESTA, F., DE CRECCHIO, G., RINALDI, E., HUTCHINSON, A., ATKINSON, A., DEAN, M., D'URSO, M., ALLIKMETS, R. 2000. New ABCR mutations and clinical phenotype in Italian patients with Stargardt disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41(3), 892-7.
- SOUIED, E. H., DUCROQ, D., ROZET, J. M., GERBER, S., PERRAULT, I., MUNNICH, A., COSCAS, G., SOUBRANE, G. & KAPLAN, J. 2000. ABCR gene analysis in familial exudative age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41, 244-7.
- SPARROW, J. R. & CAI, B. 2001. Blue light-induced apoptosis of A2E-containing RPE: involvement of caspase-3 and protection by Bcl-2. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42, 1356-62.
- SPARROW, J. R., PARISH, C. A., HASHIMOTO, M. & NAKANISHI, K. 1999. A2E, a lipofuscin fluorophore, in human retinal pigmented epithelial cells in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40, 2988-95.
- SPARROW, J. R., ZHOU, J., BEN-SHABAT, S., VOLLMER, H., ITAGAKI, Y. & NAKANISHI, K. 2002. Involvement of oxidative mechanisms in blue-light-induced damage to A2E-laden RPE. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43, 1222-7.
- SPARROW, J. R., ZHOU, J. & CAI, B. 2003. DNA is a target of the photodynamic effects elicited in A2E-laden RPE by blue-light illumination. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44, 2245-51.
- STENIRRI, S., BATTISTELLA, S., FERMO, I., MANITTO, M. P., MARTINA, E., BRANCATO, R., FERRARI, M. & CREMONESI, L. 2006. De novo deletion removes a conserved motif in the C-terminus of ABCA4 and results in cone-rod dystrophy. *Clin Chem Lab Med*, 44, 533-7.
- STENIRRI, S., FERMO, I., BATTISTELLA, S., GALBIATI, S., SORIANI, N., PARONI, R., MANITTO, M. P., MARTINA, E., BRANCATO, R., ALLIKMETS, R., FERRARI, M. & CREMONESI, L. 2004. Denaturing HPLC profiling of the ABCA4 gene for reliable detection of allelic variations. *Clin Chem*, 50, 1336-43.
- STENSON, P. D., BALL, E. V., MORT, M., PHILLIPS, A. D., SHIEL, J. A., THOMAS, N. S., ABEYSINGHE, S., KRAWCZAK, M. & COOPER, D. N. 2003. Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Hum Mutat*, 21, 577-81.
- STONE, E. M., WEBSTER, A. R., VANDENBURGH, K., STREB, L. M., HOCKEY, R. R., LOTERY, A. J. & SHEFFIELD, V. C. 1998. Allelic variation in ABCR associated with Stargardt disease but not age-related macular degeneration. *Nat Genet*, 20, 328-9.
- STRACHAN, R. 2011. *Human Molecular Genetics*, New York, Garland Science, Taylor & Francis Group.
- SUAREZ, T., BISWAS, S. B. & BISWAS, E. E. 2002. Biochemical defects in retina-specific human ATP binding cassette transporter nucleotide binding domain 1 mutants associated with macular degeneration. *J Biol Chem*, 277, 21759-67.
- SUN, H., MOLDAY, R. S. & NATHANS, J. 1999. Retinal stimulates ATP hydrolysis by purified and reconstituted ABCR, the photoreceptor-specific ATP-binding cassette transporter responsible for Stargardt disease. *J Biol Chem*, 274, 8269-81.
- SUTER, M., REME, C., GRIMM, C., WENZEL, A., JAATTELA, M., ESSER, P., KOCIOK, N., LEIST, M. & RICHTER, C. 2000. Age-related macular degeneration. The lipofusion component N-retinyl-N-retinylidene ethanolamine detaches proapoptotic proteins from mitochondria and induces apoptosis in mammalian retinal pigment epithelial cells. *J Biol Chem*, 275, 39625-30.

- TAN, J. S., WANG, J. J., FLOOD, V. & MITCHELL, P. 2009. Dietary fatty acids and the 10-year incidence of age-related macular degeneration: the Blue Mountains Eye Study. *Arch Ophthalmol*, 127, 656-65.
- TOMANY, S. C., WANG, J. J., VAN LEEUWEN, R., KLEIN, R., MITCHELL, P., VINGERLING, J. R., KLEIN, B. E., SMITH, W. & DE JONG, P. T. 2004. Risk factors for incident age-related macular degeneration: pooled findings from 3 continents. *Ophthalmology*, 111, 1280-7.
- TREPEL, M. 2004. *Neuroanatomie : Struktur und Funktion ; mit 27 Tabellen*, München {[u.a.], Urban & Fischer, 3. Auflage.
- VAN DRIEL, M. A., MAUGERI, A., KLEVERING, B. J., HOYNG, C. B. & CREMERS, F. P. 1998. ABCR unites what ophthalmologists divide(s). *Ophthalmic Genet*, 19, 117-22.
- WEBSTER, A. R., HÉON, E., LOTERY, A. J., VANDENBURGH, K., CASAVANT, T. L., OH, K. T., BECK, G., FISHMAN, G. A., LAM, B. L., LEVIN, A., HECKENLIVELY, J. R., JACOBSON, S. G., WELEBER, R. G., SHEFFIELD, V. C., STONE, E. M. 2001. An analysis of allelic variation in the ABCA4 gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42(6),1179-89.
- WELSCH, U. 2003. *Lehrbuch Histologie*, München, Urban & Fischer, 1. Auflage
- WENG, J., MATA, N. L., AZARIAN, S. M., TZEKOV, R. T., BIRCH, D. G. & TRAVIS, G. H. 1999. Insights into the function of Rim protein in photoreceptors and etiology of Stargardt's disease from the phenotype in abcr knockout mice. *Cell*, 98, 13-23.
- WORMALD, R., EVANS, J., SMEETH, L. & HENSHAW, K. 2005. Photodynamic therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Cochrane Database Syst Rev*, CD002030.
- YANOFF, M. 2004. *Ophthalmology*, St. Louis, MO, Mosby.
- ZHANG, K., KNIAZEVA, M., HUTCHINSON, A., HAN, M., DEAN, M. & ALLIKMETS, R. 1999. The ABCR gene in recessive and dominant Stargardt diseases: a genetic pathway in macular degeneration. *Genomics*, 60, 234-7.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die durch ihre Unterstützung zur Vollendung dieser Arbeit beigetragen haben.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Bernhard Weber danke ich für die Überlassung des Themas und das mir entgegengebrachte Vertrauen. Nur durch seine kompetente Anleitung, die vielen Gespräche und wertvollen Anregungen, über einen langen Zeitraum hinweg, konnte diese Arbeit gelingen.

Frau Dr. Britta Fiebig danke ich für die große Unterstützung v.a. während des praktischen Teils meiner Arbeit. Durch die hervorragende Betreuung beider war es mir möglich, wichtige Einblicke in die Forschung und das wissenschaftliche Arbeiten zu erhalten.

Großer Dank gilt dem gesamten Laborteam, allen voran Eva Scheiffert, die mir von der Einarbeitung in die Labortechniken bis zum Abschluss der praktischen Arbeit, zu jeder Zeit, mit Rat und Tat zur Seite stand.

Für die herzliche Aufnahme in ihr Team möchte ich auch allen übrigen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik danken. Neben der großen Hilfsbereitschaft wenn es um die Lösung fachlicher Fragen und Probleme ging, sorgten viele von ihnen auch privat für viel Freude und Vergnügen.

V.a. meiner ehemaligen Kollegin und guten Freundin Dr. Karin Meijer-Weigelt danke ich für die fachlichen Ratschläge sowie ihr beharrliches Nachfragen und die motivierenden Gespräche.

Von Herzen möchte ich meiner Familie und Freunden danken, ganz besonders meinen Eltern, die mir das Medizinstudium ermöglichen haben und meinem Mann Max, der immer an mich glaubt und mir stets ganz wundervoll zur Seite steht. Nur durch ihre ständige Motivation und Unterstützung, in allen Phasen der Arbeit, war es mir möglich diese letztendlich zu einem zu einem guten Abschluss zu bringen. Danke.