

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

GENETISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR WEITEREN  
ENTSCHLÜSSELUNG DER URSACHE DER NORTH  
CAROLINA MAKULAR DYSTROPHIE

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Larissa Holterman

2016



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

GENETISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR WEITEREN  
ENTSCHLÜSSELUNG DER URSACHE DER NORTH  
CAROLINA MAKULAR DYSTROPHIE

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Larissa Holterman

2016

Dekan	Prof. Dr. Dr. Thorsten Reichert
1. Berichterstatter	Prof. Dr. Bernhard Weber
2. Berichterstatter	Prof. Dr. Horst Helbig
Termin Rigorosum	9. August 2016

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Erstbeschreibung und Namensgebung der North Carolina Makuladystrophie . . . . .	1
1.2	Klassifizierung der NCMD . . . . .	2
1.2.1	Ausschluss einer Progression der Erkrankung . . . . .	2
1.2.2	Klinische Symptomatik der NCMD . . . . .	3
1.2.3	Klinische Klassifikation der NCMD durch Funduskopie und optische Kohärenz-Tomographie OCT . . . . .	3
1.3	Differentialdiagnostische Abgrenzung zu anderen Makulopathien	5
1.3.1	Diagnostisches Vorgehen bei Verdacht auf eine hereditäre Makulopathie . . . . .	5
1.3.2	Morbus Stargardt . . . . .	6
1.3.3	Morbus Best . . . . .	6
1.3.4	Juvenile Retinoschisis . . . . .	7
1.3.5	Musterdystrophien . . . . .	7
1.4	Genetische Untersuchungen zur Klärung der Ätiologie der NCMD	8
1.4.1	Kopplungsanalysen zur Identifikation und Eingrenzung der mit NCMD assoziierten genomischen Region . . . . .	8
1.5	Beschreibung der in der MCDR1 Region bekannten Gene . . . . .	10
1.5.1	POU3F2 . . . . .	10
1.5.2	FBXL4 . . . . .	10
1.5.3	FAXC . . . . .	12
1.5.4	COQ3 . . . . .	12
1.5.5	PNISR . . . . .	12

1.5.6	USP45 . . . . .	13
1.5.7	TSTD3 . . . . .	13
1.5.8	CCNC . . . . .	13
1.5.9	PRDM13 . . . . .	13
1.5.10	MCHR2 . . . . .	14
1.5.11	Sequenzanalysen der Gene der mit NCMD assoziierten genomischen Region bei Erkrankten . . . . .	14
1.6	Zielsetzung . . . . .	16
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>17</b>
2.1	Material . . . . .	17
2.1.1	Patientenblut . . . . .	17
2.1.2	Chemikalien und Reagenzien . . . . .	18
2.1.3	Reaktionskits . . . . .	20
2.1.4	Pufferlösungen . . . . .	21
2.1.5	Enzyme . . . . .	22
2.1.6	Oligonukleotide . . . . .	22
2.1.7	Verbrauchsmaterialien . . . . .	26
2.1.8	Geräte . . . . .	28
2.1.9	Software . . . . .	30
2.1.10	Restirktionsfragmente Southern Blot . . . . .	30
2.2	Methoden . . . . .	31
2.2.1	DNA-Aufreinigung aus Lymphozyten . . . . .	31
2.2.2	Mikrosatellitenanalyse . . . . .	31
2.2.3	Sequenzierung von genomischer DNA . . . . .	34
2.2.4	Southern Blot Analyse . . . . .	35
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>39</b>
3.1	Kopplungsanalyse von acht neuen Familien mit North Carolina Makuladystrophie . . . . .	39
3.2	Mutationsanalyse in den Genen FAXC und PRDM13 . . . . .	46
3.2.1	Sequenzanalyse der Gene FAXC und PRDM13 . . . . .	46
3.3	Chromosomale Rearrangmentanalyse des Gens PRDM13 . . . . .	46

<b>4 Diskussion</b>	<b>52</b>
4.1 Haplotypisierung und Kopplungsanalyse acht Familien mit North Carolina Macular Dystrophie . . . . .	52
4.2 Mutationsanalyse der Gene C6ORF168 und PRDM13 . . . . .	55
4.2.1 Sequenzanalyse der Gene C6ORF168 und PRDM13 . . . . .	55
4.3 Chromosomale Rearrangmentanalyse des Gens PRDM13 . . . . .	56
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>58</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>59</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>68</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>69</b>
<b>Anhang</b>	<b>69</b>

# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Erstbeschreibung und Namensgebung der North Carolina Makuladystrophie

Erstmals wurde die North Carolina Makuladystrophie (NCMD) 1971 bei einer amerikanischen Familie beschrieben, deren 1. Generation drei aus Irland stammende Brüder waren [Lefler et al., 1971]. Der Krankheitsbeginn wurde in der späten ersten Lebensdekade angesiedelt. Damals wurde die Erkrankung noch unter dem Namen "Hereditäre Makuladegeneration und Aminoazidurie" geführt, da eine Nierenbeteiligung, die Aminoazidurie, zusätzlich zur Makuladystrophie angenommen wurde. Dieser Name verschwand jedoch wieder, als die erweiterte Untersuchung von insgesamt 130 Familienmitgliedern jener amerikanischen Auswandererfamilie, von denen 50 von NCMD betroffen waren, weitere Informationen über die Erkrankung lieferte [Frank et al., 1974]. Ein Zusammenhang zwischen der Aminoazidurie und der Makuladegeneration konnte auf diese Weise ausgeschlossen werden. Zu dieser Zeit wurde von einer Progredienz der Makuladystrophie ausgegangen. Die periphere Retina wurde bei allen Merkmalsträgern als unauffällig beschrieben. Dies führte zur Prägung des Namens: "Dominante progressive foveale Dystrophie". Im Jahr 1978 taucht der Name "North Carolina Makuladystrophie" erstmals auf [Gass, 1978], als Zweifel an der Progredienz der Erkrankung hervorgebracht wurden. Dieser Name wird seitdem einheitlich verwendet, obwohl die Er-

krankung unter anderem in Großbritannien [Reichel et al., 1998], Frankreich [Small et al., 1997], Texas [Small et al., 1998], Belize [Rabb et al., 1998], Korea [Kim et al., 2006] und Deutschland [Sauer et al., 1997] identifiziert werden konnte. Anfangs wurde die klinisch abweichende „Zentral aveoläre Pigmentepitheldystrophie“ CAPED als eigenständige Erkrankung gewertet. Später konnte gezeigt werden, dass klinische Merkmale von CAPED in einem Zweig der oben beschriebenen Ursprungsfamilie aus North Carolina auftrat [Small et al., 1992a]. Es wird daher angenommen, dass es sich bei NCMD und CAPED um eine nosologische Entität und damit um allelische Krankheitsbilder handelt [Schworm et al., 1998]. Bei allelischen Krankheiten liegen klinisch unterschiedliche Erkrankungen vor, welche durch Mutationen im selben Gen verursacht werden.

## 1.2 Klassifizierung der NCMD

Bei der NCMD handelt es sich um eine seltene Makulopathie mit einer großen inter- und intrafamiliären Variation. Die klinische Spannbreite führt zu einer schwierigen Klassifikation und Diagnostik der Erkrankung.

### 1.2.1 Ausschluss einer Progression der Erkrankung

Anfangs wurden ein Beginn der NCMD in der späten ersten Lebensdekade und eine Progredienz der Erkrankung angenommen [Lefler et al., 1971]. Erste Zweifel an der Progredienz brachte der Namensgeber der Erkrankung schon 1974 an [Frank et al., 1974]. Diese Zweifel wurden später ebenso von Leveille [Leveille et al., 1982] und Gass [Gass, 1978] hervorgebracht. Im Jahre 1974 konnte der Krankheitsbeginn auf das erste Lebensjahr korrigiert werden [Frank et al., 1974]. Durch Langzeituntersuchungen von 15 Betroffenen über 10 Jahre hinweg durch Small et al. [1991a] konnte lediglich bei einer Person auf einem Auge ein Fortschreiten der Krankheit beschrieben werden. Hierbei konnte jedoch keine gravierende Veränderung mit einer Änderung in eine Klassifikation eines höheren Grades in Einklang gebracht werden. Mit diesem Ergebnis konnte die These einer nicht-progredienten Erkrankung un-

termauert werden. Im Jahre 1991 konnte bei einem drei Monate alten Jungen klinisch NCMD diagnostiziert werden [Small et al., 1991a], seitdem wird ein kongenitaler Beginn der Erkrankung angenommen [Khurana et al., 2009].

### 1.2.2 Klinische Symptomatik der NCMD

Abhängig von der Ausprägung der Erkrankung zeigt sich auch die klinische Beeinträchtigung der betroffenen Patienten sehr variabel. Während Veränderungen der Grade 1 und 2 (Abb. 1.1) nur eine geringgradige Visusreduktion mit sich ziehen, wird in Grad 3 ein signifikanter Verlust der Sehstärke bis zu einem Visus von unter 0,1 beschrieben [Schworm et al., 1998], [Khurana et al., 2009]. Das zentrale Gesichtsfeld der Patienten kann durch Skotome eingeschränkt sein, wohingegen das periphere Gesichtsfeld, sowie Farbsinn und Dunkeladaptation nicht beeinträchtigt sind. Ebenso zeigen das Elektroretinogramm und das Elektroofokulogramm üblicherweise regelrechte Befunde [Austin, 2001].

### 1.2.3 Klinische Klassifikation der NCMD durch Funduskopie und optische Kohärenz-Tomographie OCT

Die Unterteilung der NCMD in drei Stadien anhand der klinischen Manifestation wurde im Jahr 1974 vorgenommen [Frank et al., 1974]. Die Klassifikation wurde im weiteren Verlauf unter dem Namen "Grad" geführt, um keine Progredienz zu suggerieren [Small et al., 1991]. Klinisch lassen sich die drei Grade wie folgt beschreiben:

- Bei Grad 1 werden drusenähnliche gelb-weiße Läsionen in der Makula im retinalen Pigmentepithel RPE beobachtet [Khurana et al., 2009].
- Grad 2 zeigt konfluierende Drusen, die mit oder ohne Pigmentveränderungen vorliegen können. Außerdem werden eine Atrophie des RPE und diciforme Läsionen beschrieben [Khurana et al., 2009].
- Grad 3 ist durch Veränderungen charakterisiert, die teilweise von Agarwal als Staphylome [Agarwal and Schönberger, 2014] und von Khurana

als Makula Caldera beschrieben werden [Khurana et al., 2009].

Die Unterscheidung der drei Grade erfolgt durch Funduskopie und Optische Kohärenz-Tomographie OCT (Abb. 1.1).

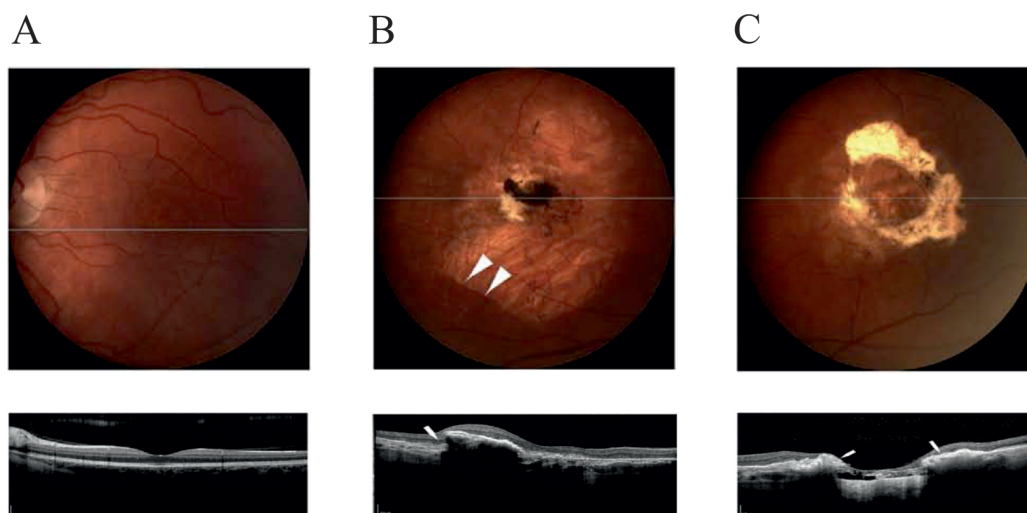


Abbildung 1.1: Funduskopie und OCT Untersuchung 3 betroffener Individuen einer Familie [Khurana et al., 2009]. **A** Linkes Auge einer 25-jährigen Frau mit einigen harten Drusen, Visus 20/20; **B** rechtes Auge einer 57-jährigen Frau mit einer gut abgrenzbaren Atrophie und einem Riss des RPE (gekennzeichnet durch weißen Pfeil), im OCT kann das Fehlen des RPE an der Stelle des Risses beobachtet werden (weißer Pfeil), Visus 20/125; **C** Linkes Auge einer 61-jährigen Patientin mit zentraler, ovaler und exkavierter Atrophie (Makula Caldera) umgeben von Fibrose oder Gliose (weiße Pfeile), Visus 20/200. (Mit freundlicher Genehmigung durch Prof. Dr. F. M. Goldberg, Director Emeritus des Wilmer Eye Institute, Johns Hopkins University, Baltimore, United States und Prof. Dr. R. N. Khurana, Northern California Retina Vitreous Associates, Monterey, United States)

Aktuell werden bei Grad 3 die Begriffe Staphylome und Caldera verwendet, es ist jedoch davon auszugehen, dass zukünftige dreidimensionale Untersuchungen zur sicheren Beschreibung der retinalen Schichten und damit zur exakten Kategorisierung führen werden [Agarwal et al., 2014].

## 1.3 Differentialdiagnostische Abgrenzung zu anderen Makulopathien

### 1.3.1 Diagnostisches Vorgehen bei Verdacht auf eine hereditäre Makulopathie

Die sichere Diagnosestellung der North Carolina Makuladystrophie ist auf Grund der starken Variabilität des Phänotyps erschwert. Im Folgenden soll die Abgrenzung zu einigen weiteren, hereditären Makulopathien beschrieben werden. Der Verdacht auf eine hereditäre Makuladystrophie besteht bei einer bilateralen Visusminderung, sowie zentralen Gesichtsfeldausfällen bei mehreren Angehörigen [Kellner et al., 2004]. Eine ausführliche Anamnese inklusive Familienanamnese, sowie eine klinische Untersuchung mittels Funduskopie sollten zur Eingrenzung der möglichen Erkrankungen erfolgen. Weitere apparative, morphologische Diagnostik wie die Fluoreszenzangiographie, die Autofluoreszenz des retinalen Pigmentepithels und die OCT dienen der genaueren Beschreibung der strukturellen Veränderungen. Eine perimetrische Untersuchung, ein Ganzfeldelektroretinogramm (ERG), eine Elektrookulographie (EOG) und eine Testung des Farbsehens sollten zur Funktionsdiagnostik durchgeführt werden [Kellner et al., 2004].

Eine ausführliche Stammbaumanalyse zur Erhebung des Vererbungsmodus sollte neben klinischer und anamnestischer Untersuchung aller Angehörigen erfolgen. Eine X-chromosomal rezessiv vererbte Erkrankung führt möglicherweise zu mehreren Betroffenen innerhalb einer einzigen Generation. Bei sozial abgetrennt lebenden Gruppen und Verwandtschaftsehen kann es auch zu mehreren direkt aufeinanderfolgenden betroffenen Generationen kommen. Erkrankten hingegen ausschließlich Männer, liegt ein X-chromosomaler, rezessiver Vererbungsmodus nahe, in welchem die Frauen als nicht-symptomatische Konduktorinnen der Mutation fungieren. Sind alle Kinder einer erkrankten Mutter betroffen, handelt es sich vermutlich um einen mitochondrialen Erbgang. Beim autosomal dominanten Erbgang, der bei der NCMD angenommen wird [Khurana et al., 2009], erkranken mehrere Individuen verschiedener Generationen. Ein Generationensprung liegt dabei nicht vor, kann jedoch durch

eine reduzierte Penetranz, also die fehlende Manifestation des Phänotyps trotz vorhandenem Genotyp, vorgetäuscht werden [Kellner et al., 2004].

Differentialdiagnostisch relevant sind vor allem die häufigen hereditären Dystrophien. Bei den im Folgenden beschriebenen Erkrankungen handelt es sich teils um Erkrankungen der gesamten Retina, jedoch kommen auch auf die Makula begrenzte Formen vor, die damit eine Ähnlichkeit zur NCMD aufweisen.

### 1.3.2 Morbus Stargardt

Beim Morbus Stargardt handelt es sich mit einer geschätzten Inzidenz von 1:10 000 [Blacharski, 1988] um eine relativ häufige hereditäre Makuladystrophie [Austin, 2007]. Die häufigste genetische Ursache sind Mutationen im ABCA4-Gen, die autosomal-rezessiv vererbt werden. Etwa die Hälfte der M. Stargardt Patienten weisen einen Fundus flavimaculatus auf. Durch diese funduskopische Erscheinung, die im Laufe der Erkrankung bezüglich Lage, Form und Ausprägung stark variieren kann, ist der M. Stargardt von der NCMD funduskopisch abgrenzbar. Bei Patienten ohne diese krankheitsspezifische Veränderung ist eine differentialdiagnostische Abklärung über den Beginn der Erkrankung, sowie deren Entwicklung und das Farbsehen möglich. Die NCMD manifestiert sich kongenital und tritt mit einer Visusminderung im frühen Kindesalter in Erscheinung. Eine Progredienz liegt nicht vor. Der M. Stargardt hingegen beginnt in den ersten zwei Lebensdekaden und zeigt zu Beginn eine rasche Progredienz der Visusminderung, die im weiteren Verlauf sistiert. Außerdem kommt es beim M. Stargardt zu einer Störung des Farbsehens [Austin, 2007]. Eine gute Anamnese kann bereits eine wegweisende Abklärung liefern.

### 1.3.3 Morbus Best

Eine weiterer hereditäre Makuladystrophie ist der Morbus Best, auch vitelliforme Makuladystrophie genannt. Die Inzidenz dieser Erkrankung ist unbekannt [MacDonald and Lee, 2013]. Diese autosomal-dominante Erkrankung wird durch eine Mutation im BEST1-Gen verursacht [Krämer et al., 2000].

Der Beginn dieser Erkrankung wird zwischen der ersten Lebenswoche und der sechsten Lebensdekade angegeben. Neben vitelliformen funduskopischen Läsionen, präsentiert sich diese Makuladystrophie mit einer mäßigen Störung des Farbsehens. Charakteristisch ist vor allem der reduzierte oder fehlende Hellanstieg im EOG [Austin, 2007]. Die klinisch funduskopische Untersuchung in Zusammenschau mit dem Ergebnis des EOG ist für die Unterscheidung zwischen NCMD und M. Best somit ausschlaggebend.

### 1.3.4 Juvenile Retinoschisis

Auch die Differenzierung zur relativ häufigen Retinopathie der X-chromosomalen Retinoschisis sollte bei Patienten mit dem Verdacht auf eine familiäre Makuladystrophie beachtet werden. Diese Erkrankung, auch unter der Bezeichnung „X-gebundene juvenile Retinoschisis“ bekannt, folgt dem X-chromosomalen Erbgang und lässt sich daher durch eine Stammbaumanalyse von der NCMD abgrenzen. Eine klinische Differentialdiagnostik kann bei unzureichender Familienanamnese nötig werden. Diese kongenitale Erkrankung zeigt bei ungefähr der Hälfte der Betroffenen im Gegensatz zur NCMD periphere Fundusveränderungen. Bei reinem Befall der Makula unterscheiden sich die Patienten durch Veränderungen im ERG. Beim Ganzfeld-ERG fallen eine ausgeprägte B-Wellenreduktion und reduzierte zapfenabhängige Reizantworten auf, während das multifokale ERG oft eine zentrale Amplitudenreduktion zeigt. Auch Störungen im Farbsehen können bei Betroffenen vorliegen [Austin, 2007]. Auch in diesem Fall ist die funktionelle Untersuchung mittels ERG des Patienten zur weiteren Abgrenzung der Erkrankung entscheidend.

### 1.3.5 Musterdystrophien

Bei den Musterdystrophien handelt es sich um eine heterogene Gruppe von Makuladystrophien [Heimann and Kellner, 2006]. Mutationen im Peripherin-Gen (PRPH2) wurden im Zusammenhang mit dieser Erkrankung beschrieben. Klinisch unterscheidet sich diese Erkrankung von der NCMD dadurch, dass die Makula seitenungleich betroffen sein kann. Ein hoher Visus kann

somit lange erhalten bleiben. Ausserdem manifestiert sich diese Erkrankung meist erst in der vierten Lebensdekade. Die Autofluoreszenz oder die Fluorescein-Angiographie stellt die Veränderungen des PRE, die sich in Form eines Musters ausbilden können, dar.

## **1.4 Genetische Untersuchungen zur Klärung der Ätiologie der NCMD**

### **1.4.1 Kopplungsanalysen zur Identifikation und Eingrenzung der mit NCMD assoziierten genomischen Region**

Anhand von Familienstudien konnte beobachtet werden, dass die North Carolina Makuladystrophie autosomal dominant vererbt wird und eine hohe Penetranz aufweist [Small et al., 1991a]. Zur Klärung der Ätiologie der Erkrankung erfolgten genetische Untersuchungen. Zur chromosomalen Lokalisation der genetischen Mutation, die NCMD verursacht, wurden Kopplungsanalysen durchgeführt. Hierbei wird nach genetischen Markern gesucht, die innerhalb einer Familie mit der Erkrankung segregieren. Für eine solche Analyse werden molekulare Marker wie Mikrosatelliten benötigt, deren Lokalisation im Genom bekannt ist und die eindeutig identifizierbar sind. Mikrosatelliten sind Tandemwiederholungen von zwei bis sechs Basenpaaren. Durch Bestimmung der Marker bei erkrankten und nicht-erkrankten Individuen über mehrere Generationen hinweg kann ein krankheitsassoziierter Haplotyp erstellt und somit eine Segregation einer Erkrankung mit einer genomischen Region festgestellt werden. Rekombinationsereignisse während der Meiose führen zu einer Eingrenzung der Region, da in Folge der Rekombination Marker, die gemeinsam auf dem mit der Erkrankung assoziierten Allel liegen, aufgrund ihrer Entfernung zum eigentlichen Krankheitsgen in einzelnen Individuen unabhängig von der Erkrankung vererbt werden können. Dass durch diese Analyse identifizierte Intervall kann in Centimorgan angegeben werden, eine Größe, die die Wahrscheinlichkeit einer Rekombination innerhalb des

Intervals angibt [Schuler et al., 1996]. Liegt wie bei der NCMD eine Erkrankung mit einer Gründermutation vor, kann ein allen Erkrankten gemeinsamer Haplotyp ermittelt werden – also der kleinste chromosomale Abschnitt, der allen Betroffenen gemeinsam ist. Durch die Untersuchung weiterer Marker und weiterer Betroffener kann eine immer feinere Lokalisation der krankheitsverursachenden Region, also des allen Erkrankten gemeinsamen Kernhaplotyps, erfolgen. Im Jahr 1992 wurde zum ersten Mal eine Mikrosatellitenanalyse bei Betroffenen mit NCMD sowie deren Angehörigen durchgeführt. Hierbei konnte beobachtet werden, dass alle erkrankten Individuen über alle Familien einen identischen (anzestralen) Haplotypen tragen. Bei diesen Untersuchungen konnte das mit NCMD segregierende Intervall auf die Region 6q13-q21 auf Chromosom 6 festgelegt werden [Small et al., 1992b]. Später konnte diese Region auf einen Bereich von 7,2 cM, flankiert von den Markern D6S424 und D6S1671 (Abb. 1.2) eingegrenzt werden und liegt damit im Bereich 6q14-q16.2 [Small et al., 1993]. Im Programm der "Human Genome Organization" (HUGO) wurde dieses Intervall mit MCDR1, also Makuladystrophie der Retina mit der ersten chromosomalen Zuordnung einer Makulaerkrankung, bezeichnet. Nahezu alle weiteren beschriebenen Fälle von NCMD konnten mit der Region MCDR1 und dem bekannten Kernhaplotypen in Verbindung gebracht werden. Mit diesen Ergebnissen wird die Theorie eines gemeinsamen ancestralen Vorfahren bestärkt. Das zugehörige Intervall konnte durch die Untersuchung weiterer Familien mit weiteren Mikrosatellitenmarkern weiter eingegrenzt werden. So gelang es 1997, an Hand dreier deutscher Familien die Kernregion auf ein Intervall von 4,0 cM zwischen den Markern D6S249 und D6S475 einzugrenzen [Sauer et al., 1997]. Durch das Fehlen ausreichend großer Mehrgenerationsfamilien konnte die Region nur langsam weiter eingegrenzt werden. 2007 gelang es einer Gruppe aus den USA, die Region auf 3 cM (1,8 Mbp) einzugrenzen [Yang et al., 2008]. Die Marker D6S1716 und D6S1671 flankieren nun die Kernregion. Im Rahmen ihrer Diplomarbeit konnte A. Welcker (Verfeinerte Kartierung des Genorts der North Carolina Makuladystrophie, 2003, Diplomandin am Institut für Humangenetik Würzburg) die Region durch neue Marker innerhalb der drei bekannten deutschen Familien weiter eingrenzen (Abb. 1.2). Die neu etablierten Mi-

krosatellitenmarker Tetra2 und Tri1 flankieren eine Region von 1,8 Mbp. Die Lage der erwähnten Marker ist in der Abbildung 1.2. dargestellt. In der Literatur wurde eine weitere Familie mit NCMD beschrieben, bei denen eine Kopplung zur Region MCDR1 vorliegt, jedoch nicht der ancestrale Haplotyp [Small et al., 1998]. In dieser Familie sollte eine andere Mutation im noch unbekanntem NCMD-Gen mit der Erkrankung assoziiert sein. Alle Untersuchungen der kodierenden Gene dieser Region (MCDR1) sind bislang ohne Erfolg geblieben [Yang et al., 2008].

Zu erwähnen bleibt eine dänische Familie mit NCMD, bei der eine Kopplung zur Region 5p (MCDR3) vorliegt [Rosenberg et al., 2010]. Auch von einer britischen Familie wird in der Literatur berichtet, die eine NCMD ähnliche Krankheit hat, die ebenfalls zur Region MCDR3 gekoppelt vererbt wird [Michaelides et al., 2003].

## 1.5 Beschreibung der in der MCDR1 Region bekannten Gene

In der MCDR1 Region liegen neun bekannte Gene. Im Folgenden soll ein kurzer Überblick gegeben werden.

### 1.5.1 POU3F2

Dieses Gen kodiert für den ZNS-spezifischen Transkriptionsfaktor N-Oct-3. Das Protein wird sowohl während der Entwicklung als auch im adulten ZNS exprimiert. Das murine Gen wird als *brn-2* bezeichnet [Atanasoski et al., 1995]. Es gibt Hinweise, dass eine Herunterregulation von *brn-2* in Zusammenhang mit der Entstehung eines Retinoblastoms steht [Cobrinik et al., 2006].

### 1.5.2 FBXL4

FBXL kodiert die F-Box und eine leucinreiche Wiederholung im Protein 4, welches in die mitochondriale Membran transportiert wird. Bei Vorliegen

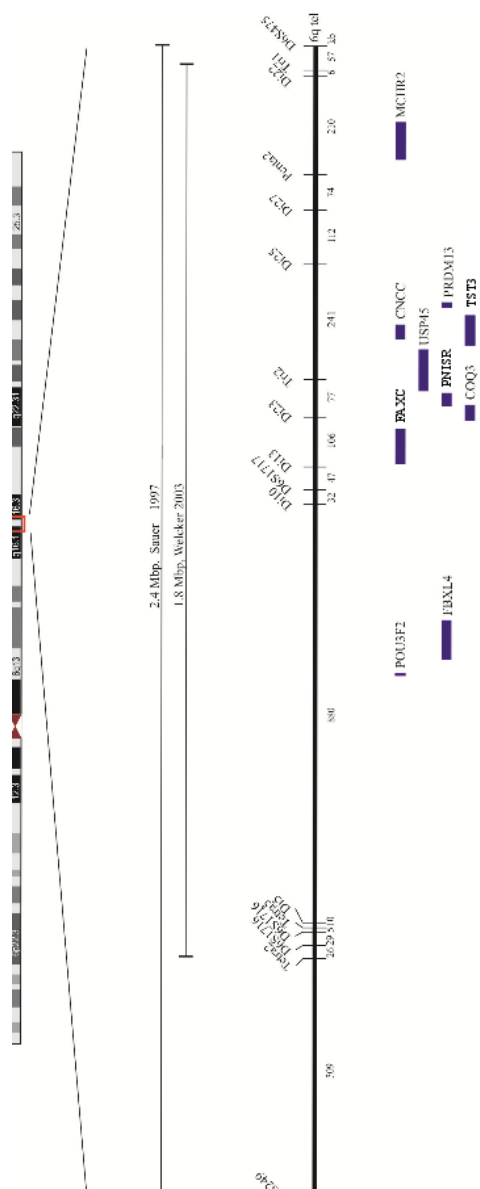


Abbildung 1.2: Genomische Region MCDR1 Stand 2003. Darstellung der, mit NCMD assoziierten genomischen Region auf Chromosom 6. Die vergrößerte Region ist auf dem Chromosom durch einen roten Kasten markiert. Die eingegrenzte Region MCDR1 ist durch einen schwarzen Balken angegeben. Die Mikrosatellitenmarker sind von 6q cen nach 6q tel sortiert (links nach rechts). Die Abstände zwischen den Markern sind jeweils in Kilobasen angegeben. Bekannte Gene sind durch einen dunkelblauen Kasten dargestellt. Die Benennung der Gene steht jeweils rechts davon.

einer Mutation in diesem Gen wurde klinisch eine mitochondriale Enzephalomyopathie beschrieben [Gai et al., 2013].

### 1.5.3 FAXC

Als hypothetisches Gen wurde FAXC unter dem Namen MGC2817 und später unter dem Namen C6ORF168 geführt. Bei diesem Gen wurde bei Mäusen eine Bindungsstelle für einen möglichen Transkriptionsfaktor identifiziert, der für die Differenzierung und das Überleben von Fotorezeptoren wichtig zu sein scheint. Bei diesem Transkriptionsfaktor handelt es sich um eine Cone-rod Homeobox (CRX) [Corbo et al., 2010]. Seither wird das Gen unter dem Namen FAXC geführt.

### 1.5.4 COQ3

Für die Biosynthese von Ubichinon, das eine entscheidende Rolle beim Elektronentransport spielt, wird unter anderem eine Methyltransferase benötigt, die vom Gen COQ3 kodiert wird [Jonassen and Clarke, 2000]. Ein Mangel an Ubichinon, auch Coenzym Q genannt, wurde unter anderem bei zwei Schwestern beobachtet, die unter einer Muskelschwäche und einer Dysfunktion des ZNS litten [Ogasahara et al., 1989]. Des Weiteren wurde ein Patient mit einer Muskelschwäche, einem zerebellären Syndrom und einem erhöhten Laktat im Liquor in der Literatur beschrieben [Boitiera et al., 1998].

### 1.5.5 PNISR

Die Expression von PNISR, das PNN-Interagierende Serin-Arginin-reiche Protein, ist positiv mit intramuskulärem Fett korreliert [Wang et al., 2009]. Bislang wurde in der Literatur keine Expression oder Assoziation mit einer Erkrankung im ZNS, beziehungsweise in der Netzhaut oder dem retinalen Pigmentepithel, beschrieben.

### 1.5.6 USP45

Dieses Gen kodiert eine Ubiquitin-spezifische Protease. Es wird eine signifikante, proteolytische Aktivität gegen ein Ubiquitin-beta-Galaktosidase-Fusionsprotein im Immunoblot beschrieben [Quesadal et al., 2004]. In der katalytischen Triade präsentiert das USP45 ein Serin anstelle des konservierten Asparagin. Diese Besonderheit wurde außerdem bei USP30 beschrieben. Eine signifikante Expression konnte in mehreren Geweben, unter anderem im Gehirn, gezeigt werden. Derzeit fehlen noch weitergehende Untersuchungen über die klinische Bedeutung dieses Gens.

### 1.5.7 TSTD3

Aktuell liegen in der Literatur keine Informationen zum Gen TSTD3 vor.

### 1.5.8 CCNC

Cyclin C wird eine wichtige Rolle im Zellzyklus beim Übergang von G0 zu G1 zugeschrieben. Dies konnte bereits für Fibroblasten sowie Stamm- und Progenitorzellen der Hämatopoese in Zellversuchen gezeigt werden [Miyata et al., 2010]. Außerdem wurde beschrieben, dass in postmitotischen Neuronen ein durch Cyclin C eingeleiteter Zellzyklus für die Aktivierung der DNA Reparatur nötig ist [Tomashevski et al., 2010]. Über die gesamte Entwicklungsperiode der Retina wurde eine konsistente Expression von CCNC beschrieben [Small et al., 2015].

### 1.5.9 PRDM13

PRDM13 kodiert ein Protein, das die Entwicklung glutaminerger Neurone supprimiert, während es die Entwicklung GABAnerger Neurone in Vorläuferzellen im hinteren Rückenmark, im Cerebellum, sowie der Retina fördert [Hanotel et al., 2014]. Es scheint damit eine regulatorische Rolle in der Entwicklung wichtiger zentralnervöser Strukturen zu spielen. . Bei Vorarbeiten am Institut für Humangenetik der Universität Regensburg konnte mit einer Expressionsanalyse (Abb. 1.3) festgestellt werden, dass PRDM13 in der

Retina, sowohl in der Entwicklung als auch im erwachsenen Auge und im zentralen Nervensystem von Mäusen exprimiert wird. In keinem weiteren Gewebe konnte eine Expression dieses Gens nachgewiesen werden. Eine negative Korrelation der Expression zur Entwicklung der Retina wurde ebenso von Small et. al. beschrieben [Small et al., 2015].

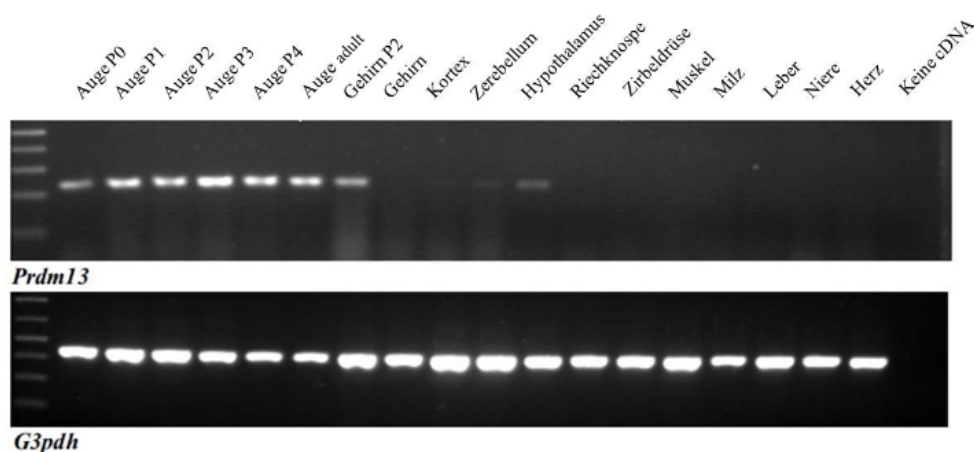


Abbildung 1.3: Expressionsanalyse PRDM13; PCR des PRDM13 Gens mit RNA aus verschiedenen Mausgeweben, G3pdh wurde als Positivkontrolle verwendet (Institut für Humangenetik, Universität Regensburg) .

### 1.5.10 MCHR2

Dieses Gen kodiert den Melanin-konzentrierende-Hormon-Rezeptor Subtyp 2 und wird vor allem im Gehirn exprimiert. Beim Melanin-konzentrierenden Hormon handelt es sich um ein Neuropeptid, das eine große Rolle im Metabolismus spielt [An et al., 2001].

### 1.5.11 Sequenzanalysen der Gene der mit NCMD assoziierten genomischen Region bei Erkrankten

Bislang durchgeführte Sequenzanalysen zur Detektion einer krankheitsverursachenden Mutation sind erfolglos geblieben. Diese Analysen schlossen die in der krankheitsassoziierten genomischen Region liegenden Gene mit ein. Es

wurden dabei alle Exone untersucht. Eine DNA Veränderung in den codierenden Regionen oder in den Splizingregionen, die NCMD verursachen könnte, wurde dabei nicht gefunden [Yang et al., 2008].

## 1.6 Zielsetzung

In dieser Arbeit soll die genetische Ursache, die der NCMD zu Grunde liegt, weiter untersucht werden. Dazu wird zum einen aufbauend auf den in der Arbeit von A. Welcker etablierten Mikrosatellitenmarkern Haplotypisierungen von neu rekrutierten, bislang noch nicht haplotypisierten, NCMD-Familien durchgeführt. Die anschließende Haplotypenanalyse soll dazu beitragen, die Region des MCDR1-Gens weiter einzugrenzen.

Sollten Familien eine Kopplung an den MCDR1-Genort aufweisen, jedoch nicht den ancestralen-Haplotypen tragen, ist weiter geplant eine Sequenzanalyse dieser Familien durchzuführen. Bei einer solchen Familie könnte eine unabhängig entstandene Mutation vorliegen. Für diese Analyse wurden die Exone und die hochkonservierten Regionen des Genes FAXC, sowie des Genes PRDM13, ausgewählt. FAXC kodiert ein Protein, das für die Differenzierung und das Überleben von Fotorezeptoren relevant zu sein scheint [Corbo et al., 2010], während das Gen PRDM13 eine Rolle in der Entwicklung wichtiger zentralnervöser Strukturen spielt, unter anderem der Retina.

Um auch andere Ursachen der Erkrankung, wie größere Inversionen und Deletionen, die mittels Sequenzanalyse nicht erfasst werden können, aufzuspüren, wird außerdem eine Southern Blot Analyse des Genes PRDM13 an der bereits publizierten Familie W durchgeführt.

# Kapitel 2

## Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Patientenblut

Nach informierter Einwilligung der Patienten wurden deren Blutproben entnommen und an das Institut für Humangenetik Regensburg gesendet. Im Einzelnen waren dies die folgenden Institutionen (Tab. 2.1).

Tabelle 2.1: Einsender der Patienten

Familie	Einsendender Arzt	Institut
Familie K	Prof. Dr. Peter Charbel Issa	Universitäts-Augenklinik Bonn
Familie D	Prof. Dr. Peter Charbel Issa	Universitäts-Augenklinik Bonn
Familie J	Dr. Lia Viorescu	Magdeburg
Familie ST	Prof. Dr. G. Rudolph	Augenklinik der Universität München (LMU)

Familie R	Prof. Dr. Daniel Paulikhoff	Augenheilkunde an der medizinischen Fakultät der Universität Essen
Familie S	Dr. Agnes Renner	Universitäts-Augenklinik Regensburg
Familie F	Prof. Dr. Ulrich Keller	Augenzentrum Siegburg
Einzelperson EL	Prof. Dr. Daniel Paulikhoff	Augenheilkunde an der medizinischen Fakultät der Universität Essen
Einzelperson WA	Prof. Dr. Klaus Rohrschneider	Augenheilkunde Universitätsklinikum Heidelberg

---

## 2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2.2: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Dimethylsulfoxid DMSO	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	J.T. Baker, Phillipsburg, USA
Ethidiumbromid	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure EDTA	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

G153 Entwicklerlösung	AGFA-Gevaert N.V., Mortsel, Belgien
G354 Fixer	AGFA-Gevaert N.V., Mortsel, Belgien
Hi-Di™ Formamide	Applied Biosystems Inc., Foster City, USA
Hydroxymethylaminomethan Tris	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid KCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Olden- dorf, Deutschland
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumacetat	
Natriumchlorid NaCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumcirtatdihydrogenat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumlaurylsulfat SDS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid NaOH	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Radioaktivität alpha-P32-dCTP, 9,25 MBq	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, Deutschland
Salzsäure HCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Xylencyanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland

---

### 2.1.3 Reaktionskits

Tabelle 2.3: Reaktionskits

Reaktionskit	Hersteller
AccuPrime™ GC-rich DNA Polymerase Kit	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Inc., Carlsbad, USA
Genaxxon Taq-Polymerase S 250U	Genaxxon BioScience GmbH, Ulm, Deutschland
GeneRuler™ DNA Ladder Mix Fermentas	Life Sciences, St. Leon-Rot, Deutschland
Gene Scan™-500 Rox™ Size Standart	Applied Biosystems, Inc., Carlsbad, USA
NucleoSpin® Extract II	Macherey+Nagel, Düren, Deutschland
Rediprime II DNA	GE Health Life Science, Buckinghamshire, UK
dNTP-Set Genaxxon	BioScience GmbH, Ulm, Germany
NEBuffer 1, 2, 3, 4 & Bovine Serum Albumin (BSA)	New England BioLabs Inc., Ipswich, USA
Taq buffer 10/15 mM MgCl <sub>2</sub> 10x	New England BioLabs Inc., Ipswich, USA
FlexiGene DNA Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

### 2.1.4 Pufferlösungen

Tabelle 2.4: Pufferlösungen

Pufferlösungen	Zusammensetzung
Church Puffer	0,5 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM EDTA, 7% SDS, pH 7,2
Denaturierungspuffer	0,4M NaOH 0,6M NaCl
DNA-Ladepuffer 10X	10 mM Tris/HCl pH 7.5, 5 mM $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 2 mM EDTA, 10 % Glycin, 0.001 % Bromphenolblau, 0.001 % Xylenecyanol
G25 Sephadex	4g Sephadex, 80ml TE Puffer
Laird's Puffer	0.1 M Tris-HCl pH 8.3, 0.2 M NaCl, 5 mM EDTA, pH 8.0
Neutralisationspuffer	1,5M NaCl 0,5M Tris/HCl, pH 7
PBS 10X	1.37 M NaCl, 100 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 27 mM KCl, 18 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4
SSC 20X	3 M NaCl, 0,3 M Na-citrat, pH 7,0
SSPE 20X	3,6 M NaCl, 20 mM EDTA, 0,2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4
TBE 10X	1 M Tris/HCl, 1 M $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 20 mM EDTA, pH 7.4
TE	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5

### 2.1.5 Enzyme

Tabelle 2.5: Enzyme

Enzym	Hersteller
“Haus Taq DNA Polymerase”	Institut für Humangenetik, Universität Regensburg, Deutschland
Alkalischen Phosphatase AAP	New England BioLabs Inc., Ipswich, USA
AseI	New England BioLabs Inc., Ipswich, USA
Exonuclease I Exo	New England BioLabs Inc., Ipswich, USA
NdeI	New England BioLabs Inc., Ipswich, USA
Proteinase K	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PstI	New England BioLabs Inc., Ipswich, USA
SacI	New England BioLabs Inc., Ipswich, USA
Taq DNA Polymerase	New England BioLabs Inc., Ipswich, USA
XhoI	New England BioLabs® Inc., Ipswich, USA

### 2.1.6 Oligonukleotide

Alle nachfolgend aufgelisteten Oligonukleotide wurden als Primer verwendet und von der Firma Metabion International AG (Martinsried, Deutschland) bezogen.

Tabelle 2.6: Oligonukleotide für die Mikrosatellitenanalyse

Name	Sequenz 5' - 3'
Di 10 M13F	TGTAAAACGACGGCCAGTAT GTGTAGGCTGATAAGTCC
Di 10 R	TTGGATTGCAGGAGATTTTCG
Di 25 M13F	TGTAAAACGACGGCCAGTTT AGCTGTGTCTAGAACTGG
Di 25 R	CAAGCAAGACAAATAACACC
Di 27 M13F	TGTAAAACGACGGCCAGTGA TTGAGAGTTTGATGACAG
Di 27 R	CTGGATGATGAGGTTGGTG
Di 5 M13F	TGTAAAACGACGGCCAGTC TAGCCCATATTCATCACTG
Di 5 R	CTTCTGAATTGACTGTATAAG
FAM-M13 F	FAM- TGTAAAACGACGGCCAGT
Penta 2 M13F	TGTAAAACGACGGCCAGTT GCCTGACACCTTGGGACTA
Penta 2 R	TGACAGAGCAAGACCTATC
Tetra 2 M13F	TGTAAAACGACGGCCAGTG TGACAGGGTGAGACTCCGT
Tetra 2 R	CATGGGTAAGGACTTTGGAG
Tetra 5 M13F	TGTAAAACGACGGCCAGTAT TACATATCTGCTGCCTTTG
Tetra 5 R	CTAGGGGAGAGGAAAAGATC
Tri 2 M13F	TGTAAAACGACGGCCAGTAG TGAGCTGAGACTGTGC
Tri 2 R	AGTAGTGGGATTGCTGGATC

Tabelle 2.7: Oligonukleotide für die Sequenzanalyse

Name	Sequenz 5' - 3'
BZ1 1F	AATGTATCCAGGCTCTTCAA
BZ1 1R	TGATGGGAATGAATAGGACC
BZ1 2F	CCTAAGTGCTTTAATCCCAA
BZ1 2R	TGGAAACGGCTCAATAAAAG
BZ1 3F	AGGCAACTTGAGAGGGATTC
BZ1 3R	TAGCCGAATTTTGGCCTGAG
BZ2 1F	TCTACTGTGGGCAGGGAGCA
BZ2 2F	GCCACAGGACAGAATAAAAC
BZ2 2R	CCCATGAATGGCAAAGCC
BZ3 1F	AAAGTGATGAGCAGTTGACC
BZ3 2F	CAAAGGAATACAGCCAAGTAG
Bz3 2F	CAAAGGAATACAGCCAAGTAG
PRDM13 1F2	TTGAAAAGGCGCAGTGCATG
PRDM13 1R	CTCGGGTGCTCCAGGTCCTT
PRDM13 1R2	AGGGCACTGAGAGGCGAATG
PRDM13 1R3	CCACATCCTCTCCTCTCAGC
PRDM13 2F3	CTTTCTCCCTCCCCGAAG
PRDM13 3aF	TCAAACCTGGAATGCTTTTACA
PRDM13 3aR	CCATGGAAGCTTTGTGTGTG
PRDM13 3R3	TACTTTTTTCCCCTGCCATTG
PRDM13 4.3F	GAGAGCAGCAGCAAGCAAG
PRDM13 4F	TCTAGGGACTCGCTTCAAGA
PRDM13 4F2	ATCAAGCGCGAGGCCCTCTTC
PRDM13 4F4	CGGCCTTTACAGTCTACAAC
PRDM13 4F5	GGCCACCTGTGCCTCTACTG
PRDM13 4R	CTGCTCCTTGCCCTTCTTGG
PRDM13 4R2	AGCGAGCAGGCACTTGGGAT
PRDM13 4R3	GGGTAATAAGCGGTGGTGGC
PRDM13 4R3	GGGTAATAAGCGGTGGTGGG

PRDM13 4R4	ATCTTGAGCCCATACTTGCG
PRDM13 4R5	GAGAATAAACCCCTCGACTCC
PRDM13 e1F	TGCACTTATTA AAAAGCTGAG
PRDM13 e1R	AGCCTTAAACACTTTGCCTG
PRDM13 e2R	TTGGAAGGGCAGCACTCAG
PRDM13 e3F	CTGCTCTTTGCTCTTACAGG
PRDM13 e3R	CAGTACCAGCAGATGTAGCG
PRDM13 e2F	TGGTCCTTCAGTTGGTACG
MGC2817 ex1F	CCAGTGCCCTTCCTCCTCCT
MGC2817 ex1R	CAGCTTGACCGAGGGGCTGG
MGC2817 ex2F	CAAAC TGGGTGCTGGGTGAT
MGC2817 ex2R	ACAGACCCTGGAATCAAGTA
MGC2817 ex3F	TAAGGTTGGAATGTTTGTTT
MGC2817 ex3R	AAACTGCTGAAACGGTGGAA
MGC2817 ex4aF	TGCTAAATGCCATTGTGATGA
MGC2817 ex4aR	GCCTGGTGTCTCCATAAAGC
MGC2817 ex4F	AGTTATTCAGTTCTCCAGA
MGC2817 ex4R	TAGAAATAGAAGGTGTGGTA
MGC2817 ex5F	GCAACACAGACCATAGAAT
MGC2817 ex5R	GCTCGGATGGATTGCTACCT
MGC2817 F3	CAAGCCCGAGGTAATTGTGT
MGC2817 R	CGTAATCCTGCAAAGGGAAA

Tabelle 2.8: Oligonukleotide für die Sondenherstellung

Name	Sequenz 5' - 3'
PRDM13 S1 F	AAACCCAGCAGCCACTTCTA
PRDM13 S1 R	CTCGGACACTTCTCCTCCAG
PRDM13 S2 F	CCGGTTAAAAGGCAACTTGA
PRDM13 S2 R	CAAAGGCCTTGAGTTTCAGG
PRDM13 S3 F	GCGGTGATTTTCGTTTTTGT
PRDM13 S3 R	GGCACTGGTGAATCAAAGGT

PRDM13 S4 F	TTTGACTCCCACACTCCACA
PRDM13 S4 R	TGAGAGCATCCTCCCTGAGT
PRDM13 S5 F	GTGAGAAGGCATGGGTGATT
PRDM13 S5 R2	ACCTCCTGGGTTCTCTTGGT
PRDM13 S6 F	CTGGAGGAATCTTCGTTGG
PRDM13 S6 R	AGGAAGTGCCCTTGTCTC
PRDM13 4F5	GGCCACCTGTGCCTCTACTG
PRDM13 4R6	CAATGGGGCAAGGAGTAGTC
PRDM13 S8 F2	TTCTGCTGTCAGTATTGGTCCT
PRDM13 S8 R	AGTCACATCCAGACCCTTGG
PRDM13 S9 F	CAATGGCAGGGGAAAAAGTA
PRDM13 S9 R	CTGGAAAGCCAGTGGAGAAG

### 2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.9: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
0,1 ml, 0,5ml, 1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml Combitips	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
1 ml Spritzen	Becton Dickinson GmbH, Heidel- berg, Deutschland
1,5 ml Reaktionsgefäße	SARSTEDT AG & Co., Nüm- brecht, Deutschland
10 µl, 100 µl, 1000 µl Pipetten- spitzen	Omnitip, Warschau, Polen
10 ml Plastikpipetten	SARSTEDT AG & Co., Nüm- brecht, Deutschland
15 ml Reaktionsgefäße	SARSTEDT AG & Co., Nüm- brecht, Deutschland
2 ml Reaktionsgefäße	SARSTEDT AG & Co., Nüm- brecht, Deutschland

20-, 27-gauge Kanülen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
5 ml, 10 ml, 20 ml Glaspipetten	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
50 ml Reaktionsgefäße	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Amersham Hybond-XL Membran	GE Health Life Science, Buckinghamshire, UK
Einmalhandschuhe	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Einweg-Pasteurpipetten	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Glas-Pasteurpipetten	BRAND GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
Glaswolle extra fein	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim, Deutschland
Medical X-ray Filme	CUREX AGFA-Gevaert N.V., Mortsel, Belgien
Nitril-Handschuhe	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Nylon Hybond Membran	GE Health Life Science, Buckinghamshire, UK
PCR-Reaktionsgefäße	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Sephadex G25 superfine	GE Health Life Science, Buckinghamshire, UK
Vernichtungsbeutel VB20	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Whatman Papier	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland

---

### 2.1.8 Geräte

Tabelle 2.10: Geräte

Gerät	Hersteller
10 µl, 100 µl, 1000 µl Eppendorf Research Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
AccuJet	BRAND GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
Agarosegelelektrophorese Kammer Blue Marine 200	Gel-SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Elektrophoresegerät Protean	Mini-Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Folienschweißgerät Folio	SEVERIN Elektrogeräte GmbH, Sundern, Deutschland
Geldokumentation BioStep Dark Hood	BioStep GmbH, Jahnsdorf, Deutschland
Heizblock	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Heraeus Megafuge 1.0R	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Kapillarsequenzierer 3130xl Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Inc., Carlsbad, USA
Kontaminationsmonitor LB 122	Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Deutschland
Magnetrührer	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Mikroliterzentrifuge Heraeus Pico	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Mikrowelle Kor-6D07 DAEWOO	Electronics Europe GmbH, Butzbach, Deutschland
Mikrozentrifuge	Labnet

NanoDrop ND-1000	Thermo Fisher Scientific, Inc., Wilmington, USA
pH-Meter	Schott Instruments GmbH, Mainz, Deutschland
Präzisionswaage SBC 52	Scaltec Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Schüttelinkubator CertomatR und CertomatHK	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Schüttelwasserbad 1083	GFL - Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Thermocycler T3000 und T GRADIENT	BIOMETRA GmbH, Göttingen, Deutschland
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Tisch- und Kühlzentrifuge Centrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vortex Genie II	Scientific Industries Inc., New York, USA
Waage Adventurer	OHAUS, Nänikon, Schweiz
Wasserbad	GFL - Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Wasserdestillierapparat	GFL - Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Wippschüttler	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

---

### 2.1.9 Software

Tabelle 2.11: Software

Programm	Hersteller
ArgusX1 V4.0.81	biostep GmbH, Jahnsdorf, Deutschland
Chromas	Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Australien
GeneMapper ® Software v3.7	Applied Biosystems, Inc., Carlsbad, USA
Nanodrop ND-1000 v.3.5.2	Thermo Fisher Scientific, Hudson, USA

### 2.1.10 Restirktionsfragmente Southern Blot

Tabelle 2.12: Restriktion

Sonde	Restriktion	
	Verdau 1 AseI & SacI	Verdau 2 NdeI & SacI
1	chr6 100049431	chr6 100049431
	chr6 100050775	chr6 100050662
2	chr6 100050775	chr6 100050775
	chr6 100052086	chr6 100055641
3	chr6 100052429	chr6 100050775
	chr6 100054539	chr6 100055641
4	chr6 100054539	chr6 100055641
	chr6 100056977	chr6 100056977
5	chr6 100056977	chr6 100056977
	chr6 100060144	chr6 100058815
6	chr6 100056977	chr6 100058815
	chr6 100060144	chr6 100060443

7	chr6 100060144	chr6 100060443
	chr6 100062888	chr6 100062888
8	chr6 100060144	chr6 100060443
	chr6 100062888	chr6 100062888
9	chr6 100062888	chr6 100062888
	chr6 100063902	chr6 100064965

---

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 DNA-Aufreinigung aus Lymphozyten

Die DNA-Präparation wurde nach Protokoll des Herstellers mit dem Flexi-Gene DNA Kit (Qiagen) aus Vollblut vorgenommen.

#### 2.2.1.1 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA wird spektrophotometrisch mit Hilfe des Nano-Drops ND-1000 (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Es werden 2  $\mu\text{l}$  DNA-Lösung gegen Wasser als Referenz in einem Absorptionsspektrum von 220 bis 750 nm vermessen. Die Konzentration wird in  $\text{ng}/\mu\text{l}$  angegeben.

### 2.2.2 Mikrosatellitenanalyse

Mikrosatelliten, auch bekannt als short tandem repeats (STR), sind kurze und polymorphe DNA loci, die aus repetitiven Sequenzen mit zwei bis sieben Nukleotiden bestehen. Die Anzahl an Wiederholungen in einem bestimmten Locus kann variieren und resultiert in Allelen unterschiedlicher Länge.

#### 2.2.2.1 Typisierung der Mikrosatelliten mittels Fragmentlängenanalyse

Die Typisierung der Mikrosatelliten wird mittels Fragmentlängenanalyse durchgeführt. Die einzelnen Mikrosatellitenloci werden hierzu mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten, die DNA-Sequenz der Marker flankierenden Primerpaaren amplifiziert und am Sequenziergerät durch Kapillarelektrophorese aufge-

trennt. Anhand der Fragmentlängen werden die unterschiedlichen Allele der einzelnen Loci nachgewiesen [Leeb et al., 2005].

### 2.2.2.2 Amplifikation der Fragmente mittels Polymerase-Ketten-Reaktion PCR

Die gewünschten DNA-Fragmente werden über PCR aus der DNA vervielfältigt. Die eingesetzten Primer sind Tabelle 2.6 zu entnehmen.

Um ein fluoreszenzmarkiertes Produkt zu erhalten, werden die Vorwärtsprimer für die Mikrosatellitenanalyse am 5' Ende mit einer M13(-21) Universalsequenz (5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3') versehen und der universelle Fluoreszenzfarbstoff FAM, ebenso mit M13(-21) versehen, zugegeben [Schuelke, 2000]. Dabei wurden die Vorwärtsprimer im Verhältnis 1:4 zu dem FAM-Primer und mit einem Gesamtvolumen von 1  $\mu$ l eingesetzt. Ein PCR-Ansatz wird für ein Endvolumen von 50  $\mu$ l auf Eis angesetzt.

10 x PCR Puffer		5 $\mu$ l
dNTP Mix	(je 2,5 mM)	2 $\mu$ l
Primer vorwärts	(5 mM)	1 $\mu$ l
Primer rückwärts	(5 mM)	1 $\mu$ l
Taq-Polymerase	(5 U/ $\mu$ l)	0,7 $\mu$ l
DNA		100 ng
A.D. H <sub>2</sub> O		50 $\mu$ l

Die PCRs werden mit folgendem Programm im Thermocycler T3000 (BIOMETRA GmbH) durchgeführt:

95°C	3 min	
<hr/>		
95 °C	30 sec	
TA	30 sec	x 30
72°C	1 min/kb	
<hr/>		
95 °C	30 sec	
54°C	30 sec	x 7
72°C	1 min/kb	
<hr/>		
72°C	5 min	
15°C	$\infty$	

Bei den PCRs zur Vervielfältigung der Mikrosatelliten wird nach dem Annealing noch ein weiterer Annealingschritt für den FAM Primer eingeführt. Dieser findet bei 54°C Annealingtemperatur statt und besteht aus sieben Zyklen. Um eine spezifischere Primerbindung zu erreichen, kann eine Touchdown-PCR durchgeführt werden.

### 2.2.2.3 Agarosegelelektrophorese

Zur Kontrolle der PCR werden die Produkte nach der Reaktion durch eine Agarosegelelektrophorese hinsichtlich des Molekulargewichts der DNA aufgetrennt. Dafür werden Agarosegele mit einer Endkonzentration von 0,6-1,5% Agarose (BioZym) in TBE-Puffer hergestellt. Zu der aufgewärmten Lösung wird ein Tropfen Ethidiumbromid-Lösung (AppliChem) pro 100 ml Gel zugegeben. Die PCR-Ansätze werden auf das auspolymerisierte Gel mit 5µl 5 x DNA-Ladepuffer in die Taschen gefüllt. Zusätzlich wird ein DNA-Längenstandard (Fermentas Life Sciences) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgt in der Gelkammer Blue Marine 200(SERVA Electrophoresis GmbH) bei 100-180 V. Die DNA wird unter ultraviolettem (UV)-Licht in der „Dark Hood“ (BioStep) mit dem interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid (AppliChem) bei einer Wellenlänge von 312 nm detektiert und anschließend mit der Software ArgusX1 V4.0.81 (BioStep) dokumentiert.

### 2.2.2.4 Analyse im Kapillarsequenzierer

Anschließend wird 1 µl der Proben in eine Mikrotiterplatte pipettiert mit 62,5% (v/v) Formamid und 12,5% (v/v) Gene Scan™ 500 Rox™ Größenstandard mit 25% (v/v) zugehörigem Ladepuffer versetzt und in den Kapillarsequenzierer gegeben.

Die Analyse im Kapillarsequenzierer 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) erfolgte unter folgenden Bedingungen: Die Kapillartemperatur wird auf 50°C festgelegt, die Denaturierung erfolgt bei 90°C für 120 Sek., die Separation findet bei einer Spannung von 4,8kV für 40 Min. statt. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe des Programmes GeneMapper ® Software v3.7 (Applied Biosystems).

### 2.2.2.5 Haplotypenkonstruktion und -analyse

Die Haplotypen wurden durch eine Segregationsanalyse der Familien erstellt. Hierbei werden die Mikrosatelliten bestimmt, die jeweils lediglich vom Vater beziehungsweise von der Mutter vererbt worden sein können. Ist eine sichere Zuordnung nicht möglich, ist der Marker für dieses Individuum nicht informativ. Anschließend werden die Haplotypen mit den Phänotypen abgeglichen und auf eine Korrelation untersucht. Um die Zufallswahrscheinlichkeit für den erstellten Haplotypen in der Gesamtpopulation zu bestimmen, wurde die Häufigkeit der einzelnen Marker in einer Stichprobe bestimmt und anschließend multipliziert.

### 2.2.3 Sequenzierung von genomischer DNA

Zur Durchführung einer Sequenzanalyse der genomischen DNA wird wie folgt sequenziert: Zuerst wird eine PCR ausgeführt wie in Abschnitt 2.2.2.2 beschrieben. In Tabelle 2.7 sind die verwendeten Primer aufgelistet. Um das PCR Produkt von überschüssigen Nukleotiden und nicht eingebauten Primern aufzureinigen, wurde das Produkt mit der arktischen, alkalischen Phosphatase AAP (New England BioLabs) und der Exonuclease I Exo (New England BioLabs) verdaut. Das jeweilige Temperaturoptimum dieser Enzyme liegt bei 37°C, bei 80°C werden sie deaktiviert. Auf Eis wurden folgende Komponenten zusammenpipettiert:

0,1 µl	Exo
0,25 µl	AAP
3,65 µl	H <sub>2</sub> O
0,5-1,0 µl	PCR Produkt

Die Menge an PCR Produkt richtet sich nach der Stärke der Banden auf dem Agarosegel. Unmittelbar nach dem Pipettieren werden die Proben gemischt und in den Thermocycler T3000 (BIOMETRA) gestellt.

Die Proben inkubieren nun bei

37°C	15 Minuten
80°C	15 Minuten.

Nach Ablauf des Programms werden die Proben auf Eis gestellt und folgende Komponenten des BigDye® Cycle Sequencing Kits (Applied Biosys-

tems) zugegeben:

2  $\mu$ l 5x Puffer  
1,7  $\mu$ l H<sub>2</sub>O  
0,3  $\mu$ l Big Dye  
1  $\mu$ l Sequenzierprimer

Die Reaktion wird daraufhin mit folgendem Programm gestartet:

94°C	3 min
<hr/>	
94°C	30 s
58°C	30 s x 30
60°C	3 min
<hr/>	
60°C	5 min

Anschließend wird die DNA mit 2 $\mu$ l Natriumacetat und 50 $\mu$ l 100%-igem Ethanol (J.T. Baker) bei 4000 rpm für 20 Minuten gefällt. Der Überstand wird verworfen und die DNA mit 70 $\mu$ l 70%-igem Ethanol gewaschen und erneut abzentrifugiert. Nach kurzen Trocknen an der Luft wird die DNA in 15  $\mu$ l Hi-Di™ Formamid (Applied Biosystems) resuspendiert und in eine 96-Well-Platte überführt. Die Analyse erfolgt in einem automatischen Kapillarsequenzierer 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Die Sequenzen werden mit dem Programm Chromas (Technelysium Pty Ltd) oder GeneMapper® Software v3.7 (Applied Biosystems) ausgewertet.

## 2.2.4 Southern Blot Analyse

Beim Southern Blot werden DNA Fragmente mittels Kapillarkräften auf eine Nylon Membran übertragen und anschließend mit einer radioaktiv markierten Sonde detektiert.

### 2.2.4.1 Restriktionsverdau genomischer DNA

Durch einen Restriktionsverdau werden die Fragement zur anschließenden Fragmentanalyse hergestellt.

Hierfür werden 10 $\mu$ g Patienten-DNA und DNA eines gesunden Probanden in 1/10 Volumen des von Biolabs empfohlenen 10x Restriktionspuffers (New

England BioLabs) verdaut. Zur Stabilisierung der Enzyme wird 1/100 des Volumens 100x BSA Lösung (New England BioLabs) zugegeben. Pro  $\mu\text{g}$  DNA werden je 1,5 Units des einzelnen Enzyms eingesetzt. Dieser Reaktionsansatz wird über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  im Wasserbad (GFL-Gesellschaft für Labortechnik mbH) verdaut.

#### 2.2.4.2 Radioaktive Markierung der Sonden

Die Sonden für die Hybridisierung werden über PCR Amplifizierung erstellt (s. S. 2.2.2.2) und über Gelextraktion mit Hilfe des Nucleospin Extractkit (Marcherey & Nagel) isoliert. Die aus dem Gel isolierten Sonden werden mit [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ] dCTP markiert (Hartmann). Dafür werden 50ng der Sonde mit TE Puffer auf  $50\mu\text{l}$  aufgefüllt und bei  $95^\circ\text{C}$  für 5 Minuten im Heizblock (VWR International GmbH) denaturiert. Anschließend wird die Sonde auf Rediprime II DNA (GE Health Life Science) gegeben,  $5\mu\text{l}$  der Radioaktivität zugegeben, alles gründlich gemischt und eine Stunde bei  $37^\circ\text{C}$  im Heizblock (VWR International GmbH) inkubiert. Danach wird  $50\mu\text{l}$  TE Puffer zur Sonde gegeben. Die Markierung der Sonden wird über Gel Filtration mittels G25 Sephadex (GE Healthcare) Säule gereinigt und dabei von nicht gebundenem [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ] dCTP befreit. Vor der Hybridisierung werden die Sonden ein weiteres Mal für 5 Minuten bei  $95^\circ\text{C}$  denaturiert.

#### 2.2.4.3 DNA Transfer

Für den Southern Blot werden  $80\mu\text{l}$  der verdauten DNA elektrophoretisch auf einem 0,6% (w/v) Agarose Gel mit Ethidiumbromid bei 100V für etwa fünf Stunden aufgetrennt (Gelkammer: Blue Marine 200, SERVA Electrophoresis). Zur Herstellung des Gels, sowie als Laufpuffer wird TBE Puffer verwendet. Zur eingesetzten DNA werden  $8\mu\text{l}$  Ladepuffer gegeben. Um die Größe der aufgetrennten Transkripte bestimmen zu können, wird parallel zu den Proben  $5\mu\text{l}$  DNA Größenstandart GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas Life Sciences) auf das Gel aufgetragen. Das im Laufpuffer enthaltene Ethidiumbromid interkaliert zwischen die DNA Fragmente und fluoresziert unter UV-Licht (Geldokumentation: BioStep Dark Hood, biostep GmbH).

Intakte DNA sollte einen einheitlichen Schmier zeigen. Um die Größe der Banden nach dem Blotten auf der Membran noch bestimmen zu können, wird ein Größenmarker an dem Gellauf angelegt. Mit der Software ArgusX1 V4.0.81 (biostep GmbH,) wird das Gel anschließend dokumentiert.

Die DNA wird über Nacht mittels der aufwärtsgerichteten Kapillarkraft des 0,4x NaOH auf eine Nylon Hybond Membran (GE Health Life Science) übertragen. Der typische Aufbau eines Souther Blot besteht aus einer Schale, die mit 0,4x NaOH gefüllt wird und einer Platte, die als Brücke über die Schale gelegt wird. Darüber liegt dickes mit NaOH getränktes Wathmannpapier (Carl Roth GmbH), darauf das Elektrophoresegel, die Nylonmembran, sowie jeweils zwei Lagen angefeuchtetes dünnes und dickes Wathmannpapier. Den Abschluss bilden ein trockenes dickes Wathmannpapier, sowie mehrere Lagen saugfähiger Zellstoff. Dann folgt eine weitere Platte, die mit einem zusätzlichen Gewicht beschwert wird. Auf diese Weise entsteht die aufwärtsgerichtete Kapillarkraft. Dieser Aufbau wird über Nacht stehengelassen. Anschließend werden die Taschen des Gels auf der Nylonmembran markiert. Diese wird dann kurz in 2x SSC geschwenkt und bis zur Verwendung zwischen zwei Wathmannpapieren gelagert.

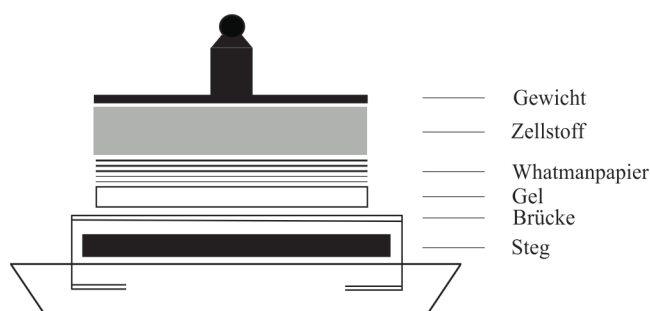


Abbildung 2.1: Aufbau Southern Blot

#### 2.2.4.4 Hybridisierung der Sonden

Die DNA wird zunächst in Church Puffer bei 65°C für mindestens eine Stunde in einem schwenkenden Wasserbad vorhybridisiert, um spezifische Bindestellen abzudecken. Anschließend wird die markierte Sonde (s. Abschnitt

2.2.4.2) zu 50ml Church Puffer gegeben, gut gemischt und dann über den Blot gegeben. Dieser wird über Nacht bei 65°C hybridisiert.

#### **2.2.4.5 Waschung der Membran**

Nach der Hybridisierung wird der Blot bei 65°C jeweils 15 Minuten erst in 2x SSPE mit 0,1% SDS, dann in 1x SSPE mit 0,1% SDS und wenn noch ausreichend Radioaktivität vorhanden ist, in 0,5x SSPE mit 0,1% SDS gewaschen. Nach diesen Waschschrinen wird der Blot in Folie eingeschweißt und bei -80°C ein X-Ray Film (CUREX AGFA-Gevaert N.V.) für fünf bis sechs Tage aufgelegt.

#### **2.2.4.6 Exposition und Entwicklung der X-Ray-Filme**

Nach der Expositionszeit von fünf bis sechs Tagen werden die Filme per Hand entwickelt. Hierfür wird der Film zunächst in Entwicklerlösung G153 (AGFA-Gaevert N.V.) für mehrere Sekunden bis Minuten, je nach Signalstärke, getaucht. Die Reaktion wird kurz mit Wasser gestoppt und der Film anschließend mit G354 Fixer (AGFA-Gaevert) fixiert. Nach dem Abwaschen der Fixierlösung können die erhaltenen Banden ausgewertet werden.

# Kapitel 3

## Ergebnisse

### 3.1 Kopplungsanalyse von acht neuen Familien mit North Carolina Makuladystrophie

In dieser Arbeit wurden insgesamt 54 NCMD-Patienten aus acht bisher molekulargenetisch nicht untersuchten Familien und acht solitären Patienten genotypisiert (Tab. 2.1.1). Um untersuchen zu können, ob die neuen untersuchten Familien ebenfalls denselben Haplotypen tragen wie die bereits veröffentlichten Familien und damit vermutlich die gleichen gemeinsamen Vorfahren haben, wurde die bereits publizierte Familie W als Vergleich genotypisiert. Um die Phase bestimmen zu können wurden erkrankte Individuen aus drei Generationen einbezogen. Bei Familie W wurden die acht polymorphen Marker Tetra5, Tetra2, Di5, Di10, Tri2, Di25, Di27 und Penta2 bestimmt (Abb. 3.1 und Tab. 3.1). Außerdem wurden 18 Personen als gesunde Vergleichsgruppe genotypisiert. Zur Lage der Mikrosatelliten in der Kandidatenregion auf Chromosom 6 siehe Abbildung 2.2. In Familie K (Abb. 3.1) konnten vier der betroffenen Personen in fünf Markern untersucht werden. Vier Marker stimmen bei den erkrankten Individuen mit dem Haplotypen der Familie W (Abb. 3.1) überein. Lediglich der zentromerwärts liegende Marker Tetra2 unterscheidet sich vom Haplotypen der Familie W. Auch in Familie D (Abb. 3.1) wurde der Haplotyp von Familie W (Abb. 3.1) in fünf Markern und an acht erkrankten Familienmitgliedern über drei Generationen bei Betroffene-

nen nachgewiesen. Des Weiteren wurden vier gesunde Personen der Familie mituntersucht. Bei ihnen konnte der krankheitsassoziierte Haplotyp nicht gefunden werden. Der Haplotyp von Familie J (Abb. 3.1) stimmt ebenso mit dem der Familie W überein. Hierfür wurden zwei erkrankte Personen aus zwei Generationen in vier Markern genotypisiert.

Auch in Familie ST (Abb. 3.1) konnte der krankheitsassoziierte Haplotyp beschrieben werden, der mit Familie W übereinstimmt. Familienmitglieder mit unklarer Diagnose wiesen diesen Haplotypen nicht auf. Es wurden drei Individuen betrachtet, wobei zwei der Individuen eineiige Zwillinge waren und damit genetisch identisch sind.

Die zwei erkrankten und genotypisierten Geschwister in Familie F (Abb. 3.2) tragen einen gemeinsamen Haplotypen, der bis auf den Marker Tetra5 von Familie W differiert. Eine Kopplung an die MCDR1 Region kann somit vorliegen. Die Häufigkeit des Markers Tetra5 mit der Eigenschaft der Familie W (17 Wiederholungen) in der Allgemeinbevölkerung liegt bei 62% (Abb. 3.5). Somit ist die Aussage, dass dieser Marker zufällig die Eigenschaft der anderen Familien trägt als wahrscheinlich anzunehmen. Dass dieser Haplotyp aus Rekombinationen des ancestralen Haplotypen hervorgegangen ist, ist jedoch nicht auszuschließen. Die DNA der betroffenen Mutter lag nicht vor. Bei Familie S (Abb. 3.2) wurde je ein Betroffener aus zwei aufeinander folgenden Generationen genotypisiert. Daraus lässt sich ein Haplotyp konstruieren, den die beiden untersuchten betroffenen Individuen teilen. Dieser stimmt allerdings nicht in allen Markern mit dem Haplotypen der Familie W überein. Drei Marker sind zwischen beiden Familien identisch (Di10, Tri2, Di27). Die Marker Di10 und Tri2 liegen benachbart auf dem Chromosom, weshalb dieser Haplotyp theoretisch durch Rekombinationsereignisse aus dem Haplotypen der Familie W hervorgegangen sein könnte. Der Marker Di5 ist in Familie S nicht informativ. Mit dem beschriebenen Haplotypen liegt eine Kopplung auf Chromosom 6 nahe. Eine Erstellung des Haplotypen war in Familie R (Abb. 3.3) auf Grund vieler nicht-informativer Marker nicht möglich. Ein Vorhandensein des ancestralen Haplotypen lässt sich mit den vorliegenden Daten weder ausschließen noch bestätigen. Mit dieser Datenlage ist keine weitere Auswertung der Familie möglich. In Familie WA (Abb. 3.4) kann-

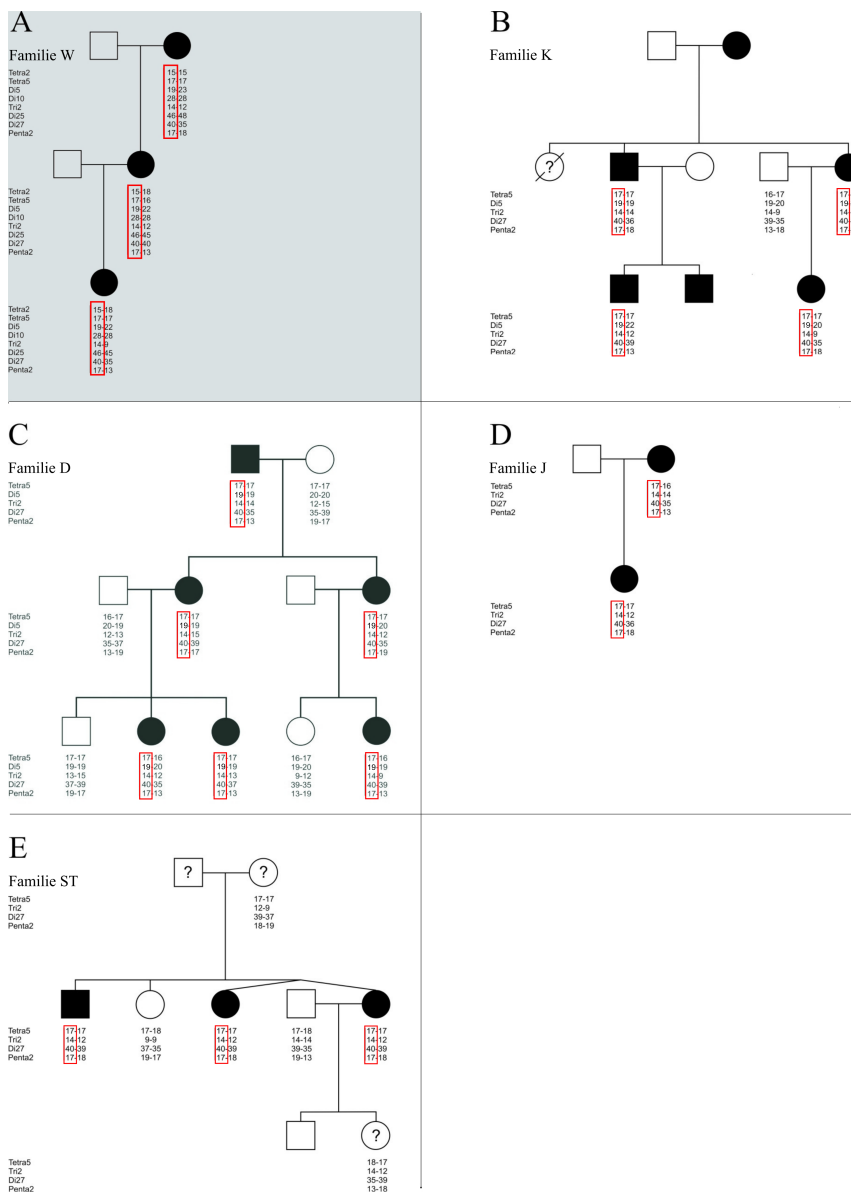


Abbildung 3.1: Stammbäume der Familie W sowie der Familien mit dem gemeinsamen, mit NCMD assoziierten Haplotypen A) Familie W, B) Familie K, C) Familie D, D) Familie J, E) Familie ST. Die bekannte Familie W ist grau hinterlegt. Die Marker sind von 6cen nach 6qtel sortiert (von oben nach unten) und stehen unter jedem Individuum. Der krankheitsassoziierte Haplotyp ist mit einem schwarzen Balken markiert. Erkrankte Personen sind durch ein dunkles Viereck (Männer) oder einen dunklen Kreis (Frauen) gekennzeichnet. Gesunde Personen sind durch helle Symbole dargestellt Familienmitglieder mit unklarer Diagnose sind mit einem „?“ und gestorbene durch ein „/“ markiert.

te nur ein erkranktes Individuum und zwei gesunde Individuen untersucht werden. Der mit diesen Daten erstellte Haplotyp stimmt im Marker Tetra5 mit dem beschriebenen ancestralen Haplotypen überein. In der Allgemeinbevölkerung konnte der Marker mit der Eigenschaft 17 Wiederholungen bei 62% beschrieben werden. Somit ist auch hier die Zufälligkeit derselben Eigenschaft als wahrscheinlich anzunehmen. Der Haplotyp kann jedoch ebenso durch Rekombinationen aus dem ancestralen Haplotypen hervorgegangen sein. In Familie EL (Abb. 3.4) konnte lediglich eine Person genotypisiert werden, da keine weitere DNA vorlag. Damit ist die Erstellung eines Haplotypen nicht möglich. Außerdem wurden noch Einzelpersonen (Abb. 3.4) untersucht. Eine Haplotypisierung ist nur möglich, wenn Informationen über Verwandtschaftsbeziehungen eingeholt oder weitere erkrankte Personen analysiert werden können.

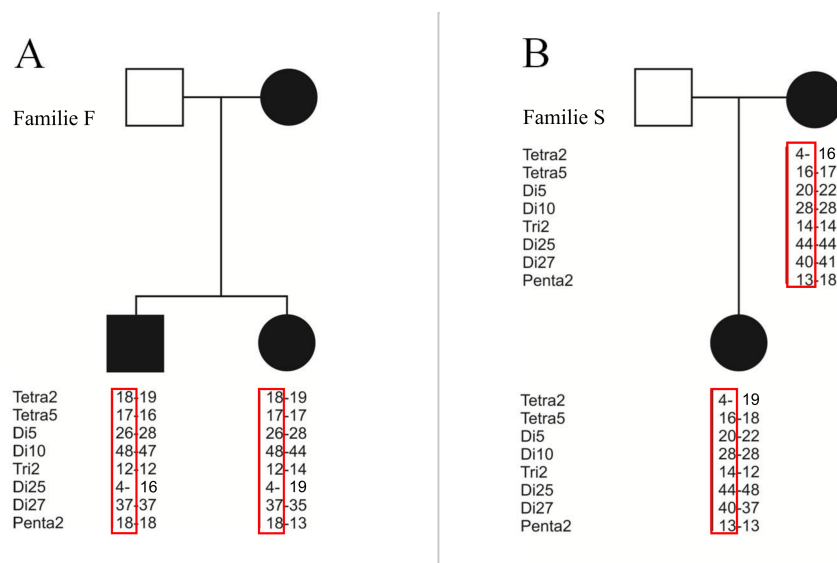


Abbildung 3.2: Stammbaum der Familie F und S A) Familie F, B) Familie S. Markersortierung 6cen nach 6qtel (von oben nach unten), weitere Legende s. Abb. 3.1

Insgesamt wurden vier weitere Familien (K, D, J, ST) mit dem bekannten ancestralen Kernhaplotypen gefunden (Tab. 3.1). Außerdem wurden zwei Familien mit einem differenten, aber mit der Erkrankung segregierenden Haplotypen gefunden (Familie F und S).

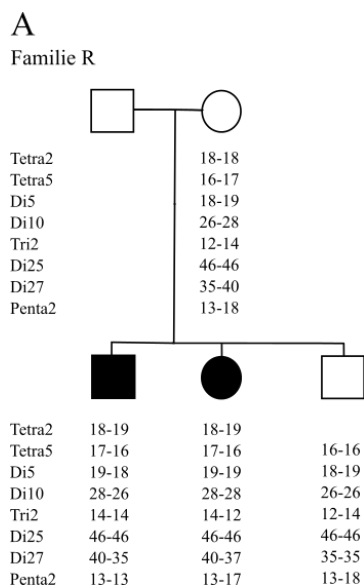


Abbildung 3.3: A) Stammbaum der Familie R. Markersortierung 6cen nach 6qtel (von oben nach unten), weitere Legende s. Abb. 3.1

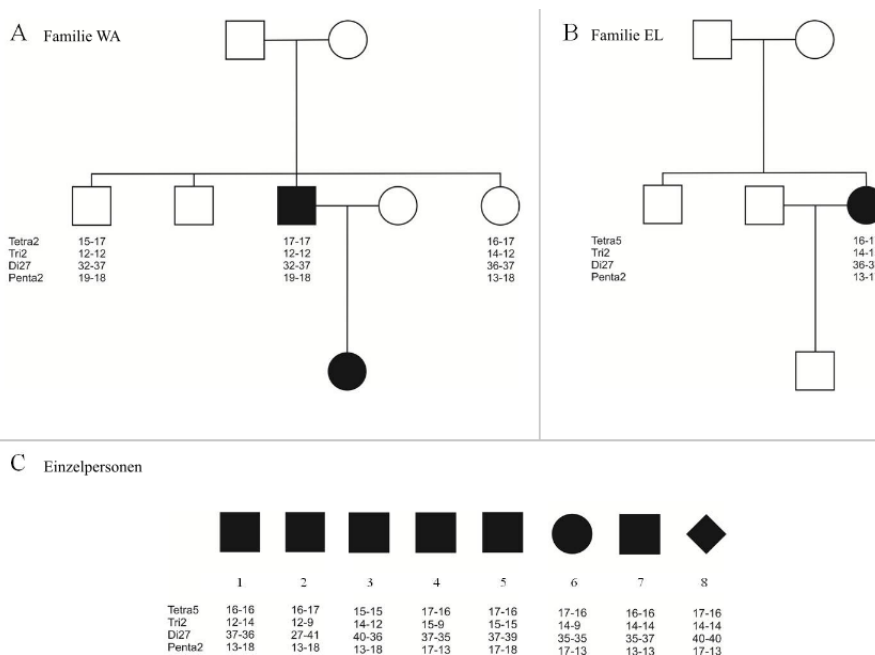


Abbildung 3.4: Einzelpersonen. A) Familie WA, B) Familie EL, C) Einzelpersonen ohne bekannte Verwandtschaftsbeziehungen. Markersortierung 6cen nach 6qtel (von oben nach unten), weitere Legende s. 3.1

Tabelle 3.1: Haplotypen der Familien. Markerloci sind von 6cen nach 6qtel (oben nach unten) sortiert, Familien sind in Spalten dargestellt. Der angenommene ancestrale Haplotyp ist dunkelgrau markiert. Bei nicht informativen Markern sind beide Allele angegeben worden. Nicht bei allen Familien bestimmte marker sind in Klammern angegeben.

Familie	W	K, D, J, ST	S	F
Locus				
Tetra2	15	(25)	4	21
Tetra5	17	17	16	17
Di5	19	(19)	20/22	18/19
Di10	28	(28)	28	26/28
Tri2	14	14	14	12
Di25	46	(46)	44	48
Di27	40	40	40	37
Penta2	17	17	13	18

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bei allen Familien, die den Haplotypen der Familie W teilen, der Marker Tetra2 nicht mit Familie W übereinstimmt. Dieser Unterschied führt zur Eingrenzung der genomischen Region um 60 Basenpaare am centomeren Rand der Region MCDR1. In dieser Region sind bislang keine Gene beschrieben. Als Ursache für diese Veränderung zwischen den Familien ist ein Rekombinationsereignis in der Meiose anzunehmen.

Um die Häufigkeit des mit der Krankheit assoziierten Allels unter gesunden Individuen abschätzen zu können, wurde zusätzlich bei gesunden Probanden ( $n = 20$ ) die Wiederholungen der STR der vier Marker Tetra2, Tri2, Di27 und Penta2 erhoben, die Häufigkeit der Allelverteilung bestimmt und mit der Allelverteilung aller erkrankten Personen verglichen, bei denen ein Haplotyp erstellt werden konnte (Abb. 3.5). Während die erkrankten Personen im Marker Tetra5 in der Mehrzahl 17 Wiederholungen (92% der Erkrankten) hatten, trugen 62% der normalen Chromosomen dieses Merkmal. Der Marker Tri2 war assoziiert mit 14 (85%) Wiederholungen bei NCMD Chromosomen. Normale Chromosomen trugen nur in 28% der Fälle diese Eigenschaft. Auch im folgenden Marker Di27 dominierte bei Betroffenen (55%)

eine Wiederholungsanzahl (40 Wiederholungen), wohingegen die Personen der Stichprobe eine größere Streuung auf verschiedene Wiederholungsanzahlen aufwiesen und lediglich 15% die Anzahl 40 Wiederholungen trugen. Mit einer eindeutigen Dominanz mit 92% bei NCMD Chromosomen wurden im Marker Penta2 17 Wiederholungen dargestellt. Im Gegensatz dazu trugen nur 20% der Stichprobe diese Eigenschaft. Anhand dieser Häufigkeiten lässt sich errechnen, dass die Zufallswahrscheinlichkeit der gesunden untersuchten Personen für die bei NCMD dominierende Kombination 17-14-40-17 (Tetra2, Tri2, Di27, Penta2) bei 0,63% liegt.

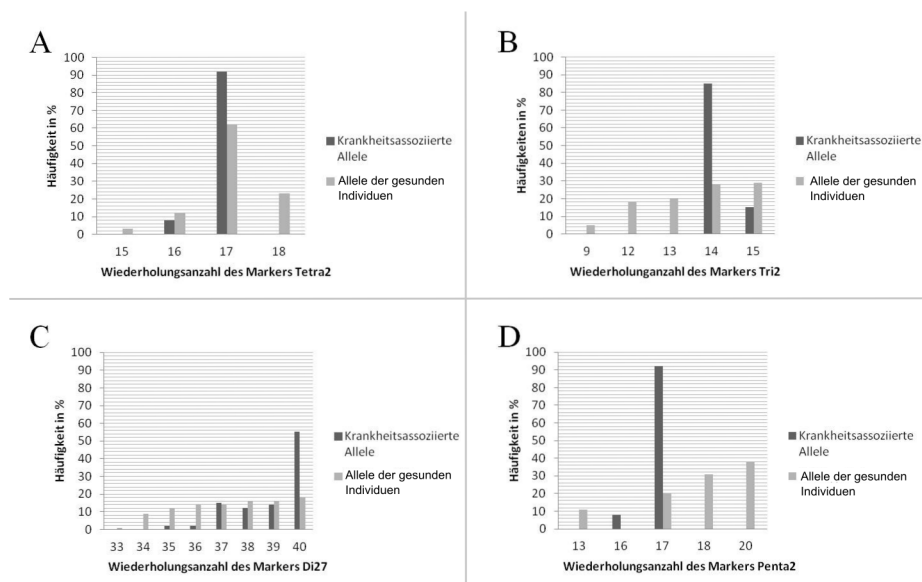


Abbildung 3.5: Häufigkeiten der Allele der vier Mikrosatellitenmarker Tetra2, Tri2, Di27 und Penta2; A) Tetra2, B) Tri2, C) Di27, D) Penta2. Legende rechts, Häufigkeiten in % in der Grafik. Wildtypen sind hellgrau, krankheitsassoziierte Allele sind dunkelgrau dargestellt. Die Wiederholungsanzahl des Markers ist horizontal unter der Grafik in absoluten Zahlen angegeben.

## 3.2 Mutationsanalyse in den Genen FAXC und PRDM13

### 3.2.1 Sequenzanalyse der Gene FAXC und PRDM13

Familie S (Abb. 3.2) besitzt einen von den anderen Familien und Familie W (Abb. 3.1) differenten Haplotypen, der dennoch mit der MCDR1 Region auf Chromosom 6 zu segregieren scheint. Damit könnte es sein, dass diese Familie eine von der Gründermutation unabhängig entstandene Mutation trägt. Da es sich bei Familie S um eine andere Mutation handeln könnte, könnte die Sequenzanalyse der Gene der MCDR1 Region dieser Familie zielführend sein. Deswegen wurde eine solche Analyse mit Familie S durchgeführt. Dafür wurden die Gene FAXC und PRDM13 herangezogen. Als Kontrolle wurde die DNA eines gesunden Probanden ebenfalls sequenziert und mit dem NCMD Patienten verglichen. Hierbei wurden in der DNA des gesunden Probanden heterozygot die SNPs rs221527, rs330843, rs9494877 und rs73500737 nachgewiesen (Abb. 3.6). In der DNA des NCMD Patienten konnten keine Mutationen oder SNPs identifiziert werden.

## 3.3 Chromosomale Rearrangmentanalyse des Gens PRDM13

Um chromosomale Rearrangements wie beispielsweise eine Inversion oder Deletion zu detektieren, wurde eine Southern Blot Analyse durchgeführt. Es wurde das Gen PRDM13 mit neun Sonden und zwei Enzymkombinationen untersucht. Es wurde jeweils DNA aus der publizierten Familie W (NCMD) mit der DNA eines gesunden Individuums verglichen (Abb. 3.7, Abb. 3.8, Abb. 3.9). Hierbei wurden bei Verdau 1 die Restriktionsenzyme AseI und SacI, sowie bei Verdau 2 die Enzyme NdeI und SacI verwendet. Blots, die mit den Sonden 1, 2, 3, 5, 6, 8 oder 9 markiert wurden, zeigten die erwarteten Banden und wiesen daneben keine Abweichungen auf. Hingegen können im mit Sonde 4 bearbeiteten Blot sowohl ein starker Hintergrund, als auch eine

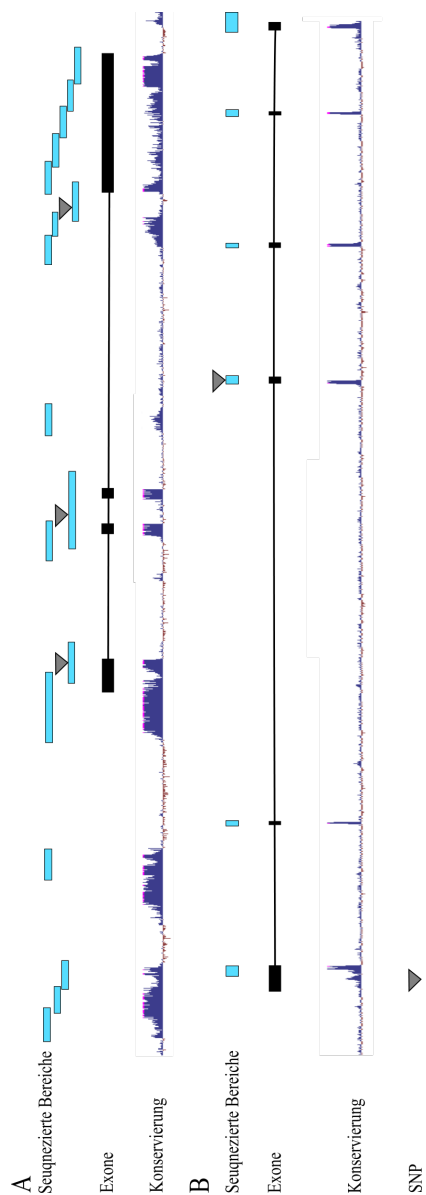


Abbildung 3.6: Sequenzanalyse A) PRDM13, B) FAXC; Sequenzierte Bereiche sind als hellblaue Balken gezeichnet, detektierte SNPs sind durch Pfeile markiert, die Exonstruktur ist mit schwarzen Balken dargestellt, die Konservierung ist mit einer dunkelblauen Kurve angegeben, deren Fläche positiv zur Konservierung korreliert.

zusätzliche Bande detektiert werden. Diese unerwartete Bande liegt bei dem NCMD Patienten, sowie bei der Kontrollperson vor. Deswegen ist von keiner NCMD zugrundeliegenden genetischen Aberration auszugehen. Eine Unspezifität des eingesetzten Verdauungsenzyms ist viel mehr anzunehmen, die zu einer zusätzlichen Schnittstelle in der DNA geführt hat. Eine weitere Möglichkeit wäre das Vorliegen eines Polymorphismus an der Schnittstelle des Enzyms. Ebenso weist der mit Sonde 7 markierte Blot neben den erwarteten Banden beim Betroffenen und beim gesunden Individuum nicht vorhergesehene Banden mit Fragmenten auf, die sowohl größer als auch kleiner sind als erwartet. Da keine Differenz zwischen den untersuchten Individuen vorliegt, ist von keiner pathologischen Veränderung auszugehen. Eher deutet dieses Ergebnis auf eine Verminderung der Bindungsspezifität des Verdauungsenzyms hin, die zu weiteren Schnittstellen im Genom bei einem gleichzeitigen unvollständigen Verdau führt.

Zusammenfassend ließ sich in keinem untersuchten Verdau ein belastbarer Unterschied zwischen Kontrollperson und Patient feststellen. Damit konnte durch diese Untersuchungsmethode keine Änderung des Genoms in der untersuchten Region detektiert werden, die als Ursache für die NCMD in Frage kommen könnte.

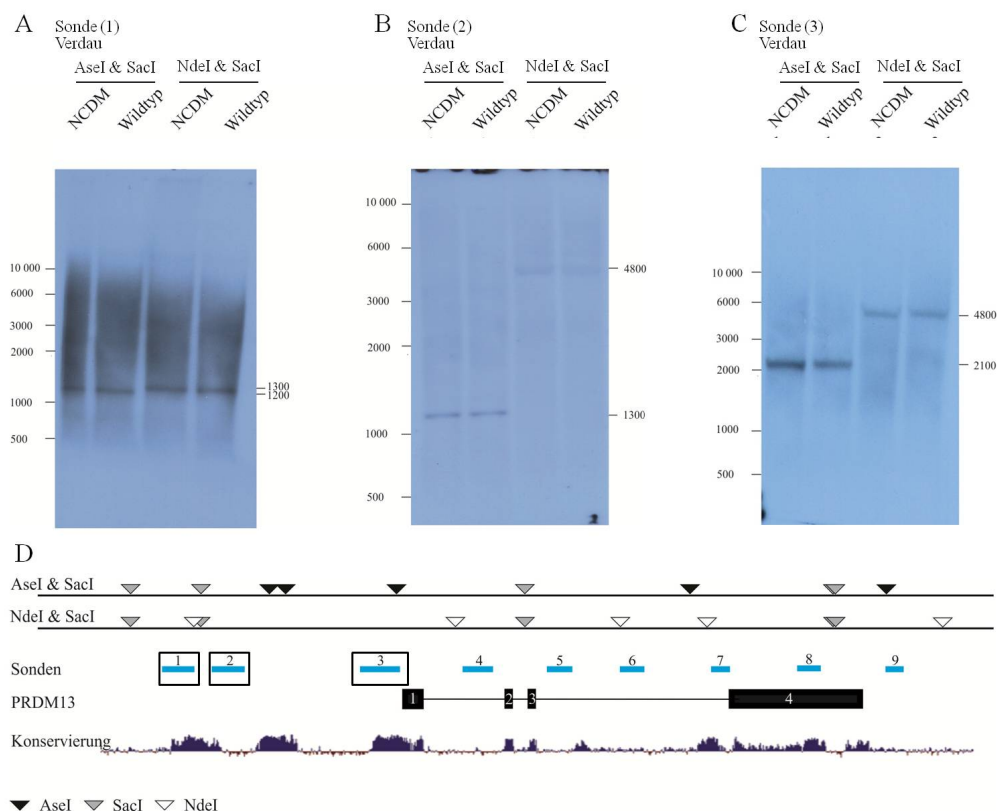


Abbildung 3.7: Southern Blot Analyse A) Sonde 1, B) Sonde 2, C) Sonde 3, D) Restriktionsverdau und Sonden des Gens PRDM13; Restriktionsverdau jeweils oberhalb der Southern Blots mit einem schwarzen Balken markiert, verwendete DNA mit Wildtyp oder NCDM oberhalb der Southern Blots angegeben, Größenstandard in bp links, erwartete Bandengrößen in bp rechts, Restriktionsverdau mit AseISacI und NdeISacI sind durch Pfeile markiert, Sonden sind als hellblaue Balken gezeichnet, darüber steht die Bezeichnung der Sonde, die in dieser Abbildung verwendeten Sonden sind mit einem schwarzen Rahmen markiert, die Exonstruktur ist mit schwarzen Balken dargestellt, die Konservierung ist mit einer dunkelblauen Kurve angegeben, deren Fläche positiv zur Konservierung korreliert..



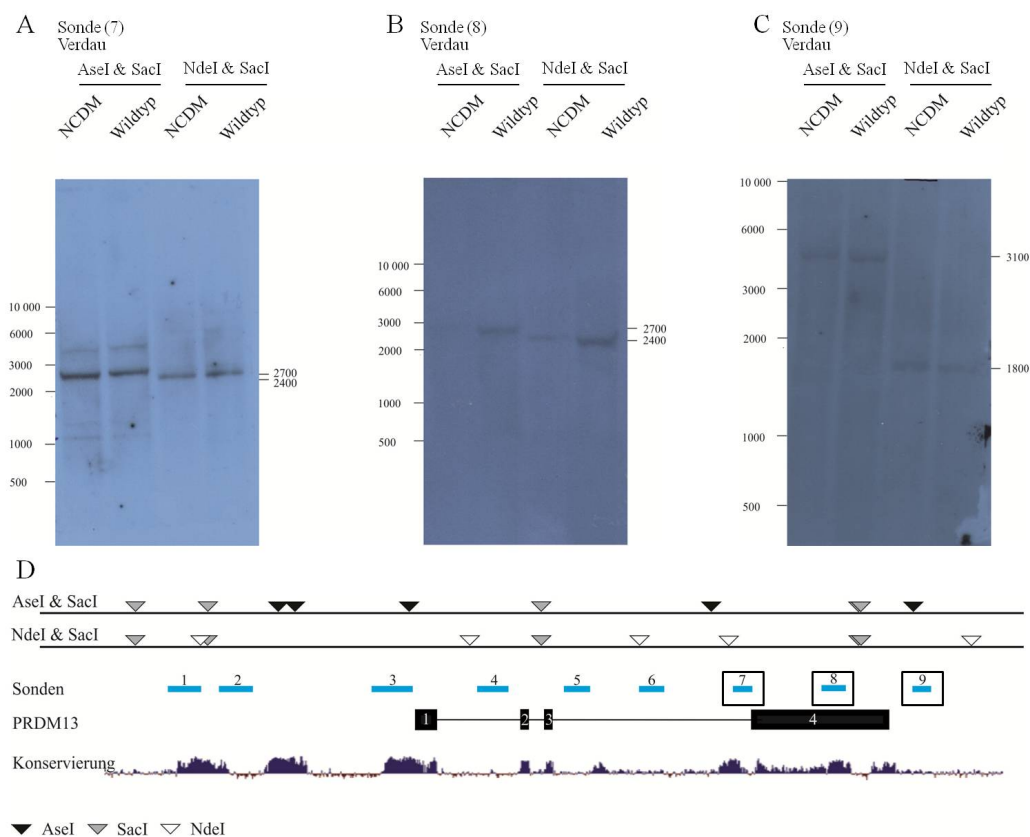


Abbildung 3.9: Southern Blot Analyse A) Sonde 7, B) Sonde 8, C) Sonde 9, D) Restriktionsverdau und Sonden des Gens PRDM13; Restriktionsverdau jeweils oberhalb der Southern Blots mit einem schwarzen Balken markiert, verwendete DNA mit Wildtyp oder NCDM oberhalb der Southern Blots angegeben, Größenstandard in bp links, erwartete Bandengrößen in bp rechts, Restriktionsverdau mit AseI/SacI und NdeI/SacI sind durch Pfeile markiert, Sonden sind als hellblaue Balken gezeichnet, darüber steht die Bezeichnung der Sonde, die in dieser Abbildung verwendeten Sonden sind mit einem schwarzen Rahmen markiert, die Exonstruktur ist mit schwarzen Balken dargestellt, die Konservierung ist mit einer dunkelblauen Kurve angegeben, deren Fläche positiv zur Konservierung korreliert..

# Kapitel 4

## Diskussion

### 4.1 Haplotypisierung und Kopplungsanalyse acht Familien mit North Carolina Macular Dystrophie

Die NCMD ist eine seltene, hereditäre Erkrankung, die kongenital beginnt und sich klinisch variabel darstellt. Der Krankheit liegt ein autosomal-dominanter Erbgang mit vermutlich vollständiger Penetranz zu Grunde [Lefler et al., 1971]. Bislang konnte NCMD in vielen unterschiedlichen ethnischen Gruppen, unter anderem in Großbritannien [Reichel et al., 1998], Frankreich [Small et al., 1997], Texas [Small et al., 1998], Belize [MF et al., 1998] und Korea [Kim et al., 2006], nachgewiesen werden. Ebenso wurden drei aus Deutschland stammende Familien beschrieben [Sauer et al., 1997]. Durch Kopplungsanalysen konnte bei all diesen Familien der krankheitsverursachende Locus im chromosomalen Bereich 6q16 nachgewiesen werden. Um die Region genauer einzugrenzen, in der der krankheitsverursachende Defekt liegt, wurden in der vorliegenden Arbeit acht Familien mit insgesamt 32 klinisch untersuchten Familienmitgliedern und zusätzlich zwölf Einzelpersonen mit der klinischen Diagnose NCMD genotypisiert. Zusätzlich wurde die bereits in der Literatur beschriebene Familie W [Sauer et al., 1997], [Käsmann et al., 1992] genotypisiert. Bei den hier untersuchten Familien konnte in sechs Fami-

lien der gleiche Haplotyp wie in Familie W [Sauer et al., 1997], nachgewiesen werden. Dies unterstreicht die These des Gründereffekts dieser Erkrankung. In dieser Arbeit wurden zwei Familien, Familie S und Familie F, untersucht, deren Kern-Haplotyp von den anderen differiert. Bei diesen Familien könnte zum einen eine Mutation vorliegen, die unabhängig von der der anderen Familien entstanden ist und somit vererbt wird. Es sollte jedoch nachgeprüft werden, ob die Familien klinisch richtig diagnostiziert wurden oder ob ihrem Leiden eine andere Erkrankung zu Grunde liegt. Sollte tatsächlich NCMD vorliegen und die krankheitsverursachende Mutation in der kodierenden Region eines Genes der Region MCDR1 liegen, könnte diese unter Umständen durch Sequenzierung der Exone der Region MCDR1 entdeckt werden. Auch möglich wäre bei diesen Familien eine Koppelung zum Locus MCDR3, der in der Literatur bereits bei zwei Familien beschrieben wurde [Michaelides et al., 2003], [Rosenberg et al., 2010]. Dies sollte in Folgearbeiten abgeklärt werden.

Bei Familie S wäre es hilfreich, in Folgearbeiten eine dritte Generation mit einer betroffenen Person genotypisieren zu können. Nur dann könnte sicher festgestellt werden, ob der Haplotyp mit der Erkrankung segregiert. Der vorliegende Haplotyp könnte sowohl unabhängig vom ancestralen Haplotypen, als auch durch Rekombinationen daraus entstanden sein. Familie F teilt einen Marker mit dem ancestralen Haplotypen. Auch hierbei könnte es sich um einen Zufall handeln oder der Haplotyp durch Rekombinationen entstanden sein. In Familie R reichen die gewonnen Daten zur Auswertung nicht aus, da einige Marker nicht informativ sind. Nach Abschluss des experimentellen Teils dieser Arbeit konnte bei der Familie eine pathogene Mutation im PRPH2-Gen nachgewiesen werden. Damit wurde bei der Familie die Verdachtsdiagnose Musterdystrophie, die klinisch ebenso zur Diskussion stand, bestätigt. Bei der vorliegenden Konstellation in Familie ST wäre eine Genotypisierung des Grossvaters sinnvoll, da davon auszugehen ist, dass dieser ebenso an NCMD erkrankt ist. Zu den Einzelpersonen, die den ancestralen Haplotypen tragen, sind weitere Informationen über die Verwandtschaftsverhältnisse für die weitere Auswertung erforderlich. Sollte der uns vorliegende Stammbaum der Person EL korrekt sein, ist eine autosomal dominant vererbte Erkrankung mit hoher Penetranz nur möglich, wenn Person EL selbst eine

Neumutation trägt, da ihre Eltern nicht erkrankt sind. Ebenso könnte ein anderes Erkrankungsbild vorliegen oder die Eltern auf Grund der variablen klinischen Expressivität nicht korrekt diagnostiziert worden sein. Auch bei der Familie WA wäre eine genetische Untersuchung der erkrankten Tochter von großem Interesse, um einen krankheitsassoziierten Haplotypen erstellen zu können. Für die weitere Eingrenzung der Kandidationregion MCDR1 wären mehr Rekombinationsereignisse in den bislang untersuchten Familien nötig oder die Untersuchung weiterer Patienten aus neuen Familien. Dass die Eingrenzung der Region so langsam fortschreitet, könnte darauf beruhen, dass zu wenige Betroffene untersucht wurden oder, dass es sich um eine Region handelt, in der wenige Rekombinationen vorliegen.

Um festzustellen, wie häufig der gefundene Haplotyp in der Allgemeinbevölkerung vorliegt, wurden klinisch gesunde Individuen genotypisiert. Eine Erstellung des Haplotypen war bei diesen gesunden Individuen ohne die Kenntnis der Verwandtschaftsbeziehungen nicht möglich. Deswegen wurden die Häufigkeiten der einzelnen Marker bestimmt und die statistische Wahrscheinlichkeit für die Markerkombination des vorliegenden Haplotypen errechnet. Dieser Wert lag bei 0,63% und beschreibt die Wahrscheinlichkeit den mit NCMD assoziierten Haplotypen zufällig in der Bevölkerung anzutreffen. Damit ist die zufällige Markerkombination des ancestralen-Haplotypen in Erkrankten Individuen als unwahrscheinlich anzusehen. In anderen Studien wurde bereits eine ähnliche Berechnung angestellt. So kommen Sauer et al., [1997] auf 0,015% Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen des ancestralen Haplotypen in der allgemeinen Bevölkerung. Der Unterschied zwischen den beiden Berechnungen könnte dadurch erklärt werden, dass die in der vorliegenden Arbeit untersuchten STRs nicht mit denen von Sauer et al., [1997] bestimmten STRs übereinstimmen und in der Allgemeinbevölkerung eine andere Frequenz dieser Marker vorliegen kann.

## 4.2 Mutationsanalyse der Gene C6ORF168 und PRDM13

### 4.2.1 Sequenzanalyse der Gene C6ORF168 und PRDM13

Bislang konnte der Nachweis einer NCMD verursachenden Mutation durch Sequenzanalyse der MDCR1 Region nicht erfolgen [Yang et al., 2008]. Sollte es sich bei Familie S aber um von den anderen Familien unabhängig entstandene Mutation handeln, könnte es möglich sein, die der Krankheit zugrundeliegende Mutation mittels Sequenzanalyse zu detektieren. Aus diesem Grund wurde von einem Individuum der Familie S die Exone der Gene PRDM13 und FAXC sequenziert und jeweils mit einem gesunden Individuum verglichen. Auch hochkonservierte Regionen vor oder zwischen den Exonen, die eine regulatorische Funktion tragen könnten, wurden in die Analyse miteinbezogen. Es konnte keine Mutation detektiert werden. Die übrigen sieben Gene der MDCR1 Region wurden nicht untersucht und kommen somit als Träger einer Mutation weiterhin in Frage.

Eine weitere Möglichkeit, die für alle an NCMD erkrankten Familien gilt, ist, dass die Mutation intergenisch in einer regulatorischen Region liegt. Einer Forschergruppe gelang es drei genetische Varianten zu beschreiben, die innerhalb einer DNase I-hypersensitiven Stelle vor den Genen PRDM13 und CCNC liegen [Small et al., 2015]. Diese Varianten konnten in zehn NCMD Familien beschrieben werden, jedoch in keiner öffentlich publizierten Datenbasis oder der untersuchten, gesunden Kontrollgruppe nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Region vor dem Gen PRDM13 nicht in die Sequenzierung mit einbezogen. In einer weiteren Familie wurde eine Tandemduplikation dieser Region beschrieben, die zu einer Duplikation des Gens PRDM13 führt. Diese 123kb umfassende Duplikation (chr6:100020205-100143306) konnte mit den in dieser Arbeit gewählten Fragmenten und Sonden (Tab. 2.12) nicht beschrieben werden. In der gleichen Arbeit wurde eine Familie mit einer Kopplung zu MCDR3 untersucht, bei der eine Duplikation des Gens IRX1 gezeigt werden kann. Es konnte also eine starke Assoziation zwischen genetischen Aberrationen und erkrankten Individuen gezeigt

werden. Es konnte jedoch kein Mechanismus zur Klärung der Ursache der Erkrankung etabliert werden [Small et al., 2015]. Eine sichere Entschlüsselung der genetischen Ursache der NCMD konnte somit nicht erfolgen.

Eine weitere Option wäre die Aktivierung einer kryptischen Splice-Stelle. Eine solche Mutation konnte beispielsweise bei der Leberschen kongenitalen Amourose beschrieben werden [Perrault et al., 2007].

### 4.3 Chromosomale Rearrangementanalyse des Gens PRDM13

Um strukturelle Aberrationen, die krankheitsverursachend sein könnten, aufzuspüren wurde eine qualitative Southern Blot Analyse durchgeführt. In dieser Arbeit wurde das Gen PRDM13 ausgewählt, da eine Expression bislang im Gehirn und im Auge nachgewiesen werden konnte und daher von einer wichtigen Funktion für die Retina ausgegangen wird. In dieser Arbeit konnten keine Unterschiede zwischen dem erkrankten Individuum und den gesunden mituntersuchten Personen beobachtet werden, jedoch stellte sich nicht immer das erwartete Ergebnis dar. So wiesen beispielsweise beide Untersuchten zu grosse Fragmente auf, was auf einen unvollständigen Verdau hinweisen kann. Auch zusätzliche zu kleine Fragmente wurden beobachtet und könnten auf eine Verstärkte Aktivität des Enzyms hinweisen. Hierbei ist die Selektivität des Enzyms herabgesetzt und es kommt zu neuen Schnittstellen. All diese Unterschiede betrafen jedoch stets beide untersuchten Individuen, weshalb ihnen keine Pathologie zugeschrieben wird. Dass in der gesamten Southern Blot Analyse kein Unterschied zwischen Familie W und dem mituntersuchten gesunden Individuum gefunden werden konnte, schließt eine strukturelle Aberration im Gen PRDM13 als krankheitsverursachend nicht aus. So könnte eine Inversion sich genau zwischen zwei von uns verwendeten Schnittstellen befinden und damit keinen Größenunterschied zeigen. Auch könnte eine kleine Deletion einen zu kleinen Größenunterschied zwischen den Banden liefern, so dass dieser Unterschied nicht wahrgenommen wird. Ebenso wäre denkbar, dass ein anderes Gen oder eine regulatorische Einheit zwischen

den Genen betroffen sein könnte. Die Familie S mit der vermutlichen unabhängig entstandenen Mutation könnte des Weiteren gescreent werden, um auch hier eine eventuell vorhandene strukturelle Veränderung, die sich unter Umständen von den anderen Familien unterscheidet, im Genom aufzufinden. Die von Small et al. gefundenen Veränderungen, die zu genetischen Veränderungen des Gens PRDM13 führen, könnten der Schlüssel zur Erklärung der Ursache der NCMD sein. Diese Veränderungen wurden in nicht-kodierenden Regionen beschrieben. Der genaue molekulargenetische Mechanismus dieser genetischen Veränderung bleibt ungeklärt, auch wenn eine Herunterregulation des Gens PRDM13 in Stammzellen beschrieben wird [Small et al., 2015]. Die NCMD veranschaulicht, dass selbst klassische, monogenetische Erkrankungen durch Mutationen in nicht-kodierenden Regionen verursacht werden könnten. Bei seltenen, monogenetischen Erkrankungen, deren Ursache ungeklärt ist, sollten die nicht-kodierenden Bereiche einbezogen werden, um neue Splicingprodukte, alternative Gen-kompatimentierungen oder Rearrangements der Exone aufdecken zu können [Weleber, 2016].

# Kapitel 5

## Zusammenfassung

Die North Carolina Makuladystrophie (NCMD) ist eine autosomal-dominant vererbte Netzhauterkrankung mit vollständiger Penetranz, die sich bereits in Utero manifestiert. Erstmals wurde sie 1971 in einer großen, aus Irland stammenden Familie, in North Carolina, USA beschrieben. Genetische Koppelungsanalysen in dieser Familie kartierten das ursächliche Gen in eine 7,2 cM große Kandidatenregion auf Chromosom 6q14-q16.2 (MCDR1). Haplotypenanalysen in dieser und anderen NCMD Familien führten zur schrittweisen Einengung der Kandidatenregion auf 3 cM (1,8 Mbp) und zeigten, dass die NCMD in den meisten bekannten Familien auf eine Gründermutation zurückzuführen ist.

In der MCDR1 Region liegen neun bekannte Gene. Darunter befindet sich PRDM13, welches eine regulatorische Rolle in der Entwicklung wichtiger zentralnervöser Strukturen spielt. Außerdem findet sich das Gen FAXC in dieser Region, welches für die Differenzierung und das Überleben von Fotorezeptoren verantwortlich ist. In früheren Studien konnte mittels Sequenzanalyse der kodierenden Regionen keine Krankheitsursache nachgewiesen werden.

Ziel dieser Arbeit war es, die MCDR1 Region mittels Haplotypanalyse weiter einzugrenzen und mit weiteren Untersuchungen der Ursache der NCMD näher zu kommen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Genotypisierung von acht Familien mit insgesamt 54 Individuen mit klinischer Diagnose NCMD mit acht Mikrosatellitenmarkern aus der Kandidatenregion durchge-

führt. Die anschließende Haplotypenanalyse zeigte, dass vier Familien den ancestralen Haplotypen tragen. Dadurch konnte die Region um 60 Mbp am centromeren Ende eingegrenzt werden. Bei einer weiteren, allerdings sehr kleinen Familie wurde eine Kopplung zum MCDR1-Lokus und ein nicht-ancestraler Haplotyp festgestellt. In dieser Familie könnte eine unabhängige Mutation im NCMD-Gen entstanden sein. Die Sequenzanalyse der kodierenden Exone der Kandidatengene PRDM13 und FAXC bei einer dieser beiden Familien zeigte keine krankheitsassoziierte Mutation.

Um zu untersuchen, ob der Gründermutation ein chromosomales Rearrangement, wie beispielsweise eine größere Inversion, Deletion oder Duplikation zugrunde liegt, wurde eine Southern Blot Analyse des PRDM13-Gens durchgeführt. Im Vergleich zu einem gesunden Probanden konnte keine Änderung des Genoms detektiert werden, die als Ursache für NCMD in Frage kommen könnte.

Diese Arbeit wurde im Zeitraum zwischen Oktober 2010 und Mai 2011 am Institut für Humangenetik der Universität Regensburg durchgeführt.

# Literaturverzeichnis

- A Agarwal and SD Schönberger. Macular caldera in north carolina macular dystrophy – reply. *JAMA Ophthalmology*, 132(6):787, 2014.
- S An, G Cutler, J J Zhao, S-G Huang, H Tian, W Li, L Liang, M Rich, A Bakleh, J Du, J-L Chen, and K Dai. Identification and characterization of a melanin-concentrating hormone receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(13):7576–7581, 2001.
- S ATANASOSKI, S SOLINAS TOLDO, I-U MALIPIERO, E SCHREIBER, R FRIES, I, and A FONTANA. Isolation of the human genomic brain-2/n-oct 3 gene (pouf3) and assignment to chromosome 6q16. *GENOMICS*, 26:272–280, 1995.
- AJ Augustin. *Augenheilkunde*. Springer, 2007.
- U Behrends, I Schneider, S Rössler, H Frauenknecht, A Golbeck, B Lechner, G Eigenstetter, C Zobywalski, S Müller-Wehrich, U Graubner, I Schmid, D Sackerer, M Späth, C Goetz, F Prantl, H-P Asmuss, K Bise, and J Mautner. Novel tumor antigens identified by autologous antibody screening of childhood medulloblastoma cdna libraries. *International Journal of Cancer*, 106:244–251, 2003.
- PA Blacharski. Fundus flavimaculatus. *Retinal Dystrophies and Degenerations*, pages 135–159, 1988.
- E Boitiera, F Degoula, I Desguerreb, C Charpentierc, D François, G Ponsotb, M Dirya, P Rustind, and C Marsaca. A case of mitochondrial enceph-

- phalomyopathy associated with a muscle coenzyme q10 deficiency. *Journal of the Neurological Sciences*, 156:41–46, 1998.
- D Cobrinik, R O Francis, D H Abramson, and T C Lee. Rb induces a proliferative arrest and curtails brn-2 expression in retinoblastoma cells. *Molecular cancer*, 5:72, 2006.
- J C Corbo, K A Lawrence, M Karlstetter, C A Myers, M Abdelaziz, W Dirkes, K Weigelt, M Seifert, V Benes, L G Fritsche, B H F Weber, and T Langmann. Crx chip-seq reveals the cis-regulatory architecture of mouse photoreceptors. *Genome Research*, 20(11):1512–1525, 2010.
- Dhellemmes, H Dollfus, E Fazzi, A Munnich, J Kaplan, and JM Rozet. Spectrum of nphp6/cep290 mutations in leber congenital amaurosis and delineation of the associated phenotype. *Human mutation*, 28(4):416, 2007.
- CL Fetkenhour, N Gurney, JG Dobbie, and E Choromokos. Central areolar pigment epithelial dystrophy. *American Journal of Ophthalmology*, 81:745–53, 1976.
- HR Frank, MB 3. Landers, RJ Williams, and JB Sidbury. A new dominant progressive foveal dystrophy. *American Journal of Ophthalmology*, 78:903–16, 1974. mit dem Namen "Dominante progressive foveals Dystrophie" 7 Generationen mit 545 Mitgliedern, davon 130 untersucht, davon 50 betroffen unterteilung in drei Grade: 1 (Drusen und Pigmentdispersion) 2 (konkludierende Drusen und fakultative Pigmentverdichtung) und 3 (choroidaler Atrophie).
- X Gai, D Ghezzi nd M A Johnson, C A Biagosch, H E Shamseldin, T B Haack, A Reyes, M Tsukikawa, C A Sheldon, S Srinivasan, M Gorza, L S Kremer, T Wieland, T M Strom, E Polyak, E Place, M Consugar, J Ostrovsky, S Vidoni, A J Robinson, L Wong, N Sondheimer, M A Salih, E Al-Jishi, C P Raab, C Bean, F Furlan, R Parini, C Lamperti, J A Mayr, V Konstantopoulou, M Huemer, E A Pierce, T Meitinger, P Freisinger, W Sperl, H Prokisch, F S Alkuraya, M J Falk, and M Zeviani. Mutations

- in *fbxl4*, encoding a mitochondrial protein, cause early-onset mitochondrial encephalomyopathy. *American Journal of Human Genetics*, 93(3): 482–495, 2013.
- D J Gass. Stereoscopic atlas of macular diseases: Diagnosis and treatment. *Mosby (St. Louis)*, 3:98–99, 1978. Benennt die Krankheit NCMD.
- J Hanotel, N Bessodes, A Th  lie, M Hedderich, K Parain, B Van Driessche, K Brand  o, S Kricha, MC Jorgensen, A Grapin-Botton, P Serup, C Van Lint, M Perron, T Pieler, KA Henningfeld, and E Bellefroid. The *prdm13* histone methyltransferase encoding gene is a *ptf1a-rbpj* downstream target that suppresses glutamatergic and promotes gabaergic neuronal fate in the dorsal neural tube. *Developmental biology*, 386(2):340–57, 2014.
- H Heimann and U Kellner. *Atlas des Augenhintergrundes*. Thieme, 2006.
- J Jarcho. Restriction fragment length polymorphism analysis. *Current Protocols in Human Genetics*, page 2.7.1–2.7.15., 2001.
- T Jonassen and C F Clarke. Isolation and functional expression of human *coq3*, a gene encoding a methyltransferase required for ubiquinone biosynthesis. *The journal of biological chemistry*, 275(17):12381–7, 2000.
- U Kellner, AB Renner, and H Tillack. Heredit  re netzhaut-aderhautdystrophien. *Der Ophthalmologe*, 101(4):397–414, 2004.
- N R Khurana, X Sun, E Pearson, Y Zhenglin, J Harmon, M F Goldberg, and K Zhand. A reappraisal of the ciliary spectrum of north carolina macular dystrophy. *Ophthalmology*, 116:1976–1983, 2009.
- DF Kiernan, RJ Shah, SM Hariprasad, MA Grassi, KW Small, JP Kiernan, and WF Mieler. Thirty-year follow-up of an african american family with macular dystrophy of the retina, locus 1 (north carolina macular dystrophy). *Ophthalmology*, 118:1435–1443, 2011.
- SJ Kim, SJ Woo, and HG Yu. A korean family with an early-onset autosomal dominant macular dystrophy resembling north carolina macular dystrophy. *Korean journal of ophthalmology*, 20:220–224, 2006.

- F Krämer, K White, D Pauleikhoff, A Gehrig, and L Passmore. Mutations in the vmd2 gene are associated with juvenile-onset vitelliform macular dystrophy (best disease) and adult vitelliform macular dystrophy but not age-related macular degeneration. *European Journal of Human Genetics*, 8:286–292, 2000.
- B Käsmann, A Blankenagel, and W Daus. Central areolar pigment epithelium dystrophy. its differentiation from other dominant macular dystrophies. *Der Ophthalmologe*, 89(1):60–6, 1992.
- GM Lathrop and JM Lalouel. Easy calculations of lod scores and genetic risks on small computers. *American Journal of Human Genetics*, 36:460–465, 1984.
- T Leeb, B Brenig, and GA Rohrer GA. Characterization and linkage mapping of four gene-associated porcine microsatellites. *Animal genetics*, 36(3):279–80, 2005.
- WH Lefler, JA Wadsworth, and JB Jr. Sidbury. Hereditary macular degeneration and amino-aciduria. *American Journal of Ophthalmology*, 71: 224–30, 1971. Nicht mehr findbar, nur in Zitaten;erste Benennung auf "Dominante progressive foveale Dystrophie".
- E Leshinsky-Silver, G Malinger, L Ben-Sira, D Kidron, S Cohen, S Inbar, T Bezaleli, A Levine, C Vinkler, D Lev, and T Lerman-Sagie. A large homozygous deletion in the samhd1 gene causes atypical aicardi–goutières syndrome associated with mtdna deletions. *European Journal of Human Genetics*, 19:287–292, 2011.
- AS Leveille, PH Morse, and JP Kiernan JP. Autosomal dominant central pigment epithelial and choroidal degeneration. *Ophthalmology*, 89(12):1407–13, 1982.
- IM MacDonald and T Lee. Best vitelliform macular dystrophy. *GeneReviews [Internet]*, 2013.

- MF Rabb MF, L Mullen, S Yelchits, N Udar, and KW Small. A north carolina macular dystrophy phenotype in a belizean family maps to the mcd1 locus. *American Journal of Ophthalmology*, 125:502–8, 1998.
- M Michaelides, S Johnson, AK Tekriwal, GE Holder, C Bellmann, E Kinning, G Woodruff, RC Trembath, DM Hunt, and AT Moore. An early-onset autosomal dominant macular dystrophy (mcd3) resembling north carolina macular dystrophy maps to chromosome 5. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, pages 2178–83, 2003.
- Y Miyata, Y Liu, V Jankovic, G Sashida, J May Lee, J-H Shieh, T Naoe, M Moore, and S D Nimer. Cyclin c regulates human hematopoietic stem/progenitor cell quiescence. *Stem Cells*, 28(2):308–317, 2010.
- S Ogasahara, A G Engel, D Frens, and D Mack. Muscle coenzyme q deficiency in familial mitochondrial encephalomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86:2379–2382, 1989.
- D Pauleikhoff, CG Sauer, CR Muller, M Radermacher, A Merz, and BH Weber. Clinical and genetic evidence for autosomal dominant north carolina macular dystrophy in a german family. *American Journal of Ophthalmology*, 124:412–5, 1997.
- I Perrault, N Delphin, S Hanein, S Gerber, JL Dufier, O Roche, S Defoort-Dhellemmes, H Dollfus, E Fazzi, A Munnich, J Kaplan, and JM Rozet. Spectrum of nphp6/cep290 mutations in leber congenital amaurosis and delineation of the associated phenotype. *Human mutation*, 28(4):416, 2007.
- V Quesada, A Diaz-Perales, A Gutierrez-Fernandez, C Garabaya, S Cal, and C Lopez-Otin. Cloning and enzymatic analysis of 22 novel human ubiquitin-specific proteases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 314:54–62, 2004.
- MB Reichel, RE Kelsell, J Fan, CY Gregory, K Evans, AT Moore, DM Hunt, FW Fitzke, and AC Bird. Phenotype of a british north carolina macular dystrophy family linked to chromosome 6q. *British Journal of Ophthalmology*, 82:1162–8, 1998.

- T Rosenberg, B Roos, T Johnsen, N Bech, TE Scheetz, M Larsen, EM Stone, and JH Fingert. Clinical and genetic characterization of a danish family with north carolina macular dystrophy. *Molecular Vision*, 16:2659–2668, 2010.
- C G Sauer, H D Schworm, M Ulbig, A Blanknagel, K Rohrschneider, D Paulleikhoff, T Grimm, and B H F Weber. An ancestral core haplotype defines the critical region harbouring the north carolina macular dystrophy gene (mcd1). *Medical genetics*, 34:961–966, 1997.
- M Schuelke. An economic method for the fluorescent labeling of pcr fragments. *Nature Biotechnology*, 18:233–234, 2000.
- GD Schuler, MS Boguski, EA Stewart, LD Stein, G Gyapay, K Rice, RE White, P Rodriguez-Tomé, A Aggarwal, E Bajorek, S Bentolila, BB Birren, A Butler, AB Castle, N Chiannikulchai, A Chu, C Clee, S Cowles, PJ Day, T Dibling, N Drouot, I Dunham, S Duprat, C East, C Edwards, JB Fan, N Fang, C Fizames, C Garrett, L Green, D Hadley, M Harris, P Harrison, S Brady, A Hicks, E Holloway, L Hui, S Hussain, C Louis-Dit-Sully, J Ma, A MacGilvery, Mader, A Maratukulam, TC Matise, KB McKusick, J Morissette, A Mungall, D Muselet, HC Nusbaum, DC Page, A Peck, S Perkins, M Piercy, F Qin, J Quackenbush, S Ranby, T Reif, S Rozen, C Sanders, X She, J Silva, DK Slonim, C Soderlund, WL Sun, P Tabar, T Thangarajah, N Vega-Czarny, D Vollrath, S Voyticky, T Wilmer, X Wu, MD Adams, C Auffray, NA Walter, R Brandon, A Dehejia, PN Goodfellow, R Houlgatte, JR Jr Hudson, SE Ide, KR Iorio, WY Lee, N Seki, T Nagase, K Ishikawa, N Nomura, C Phillips, MH Polymeropoulos, M Sandusky, K Schmitt, R Berry, K Swanson, R Torres, JC Venter, JM Sikela, JS Beckmann, J Weissenbach, RM Myers, DR Cox, MR James, D Bentley, P Deloukas, ES Lander, and TJ Hudson. A gene map of the human genome. *Science*, 274(5287):540–6, 1996.
- H D Schworm, M W Ulbig, J Hoops, G Rudolph, B H F Weber, O Ehrt, and K P Boergen. North-carolina-makuladystrophie hereditäre makulaerkrankung mit guter funktioneller prognose. *Ophthalmologie*, 95:13–18, 1998.

- K Small, A DeLuca, S Whitmore, T Rosenberg, R Silva-Garcia, N Udar, B Puech, C A Garcia, T A Rice, G A Fishman, E Héon, J C Folk, L M Streb, C M Haas, L A Wiley, T E Scheetz, J H Fingert, R F Mullins, B A Tucker, and E M Stone. North carolina macular dystrophy is caused by dysregulation of the retinal transcription factor prdm13. *Ophthalmology*, S0161-6420(15):01153–7, 2015.
- KW Small. North carolina macular dystrophy, revisited. *Ophthalmology*, 96: 1747–54, 1989.
- KW Small, J Killian, and WC McLean. North carolina’s dominant progressive foveal dystrophy: how progressive is it? *Journal of Ophthalmology*, 74: 401–406, 1991a. 15 Leute über 10 Jahre: nur einer Progressiv und nur auf einem Auge!
- KW Small, JL Weber, W-Y Hung, J Vance, A Roses, and M Pericak-Vance. North carolina macular dystrophy: Exclusion map using rflps and microsatellites. *Genomics*, 11:763–766, 1991b.
- KW Small, V Hermsen, N Gurney, CL Fetkenhour, and JC Folk. North carolina macular dystrophy and central areolar pigment epithelial dystrophy. one family, one disease. *Archives of Ophthalmology*, 110:115–8, 1992a.
- KW Small, JL Weber, A Roses, F Lennon, JM Vance JM, and MA Pericak-Vance. North carolina macular dystrophy is assigned to chromosome 6. *Genomics*, 13:681–5, 1992b.
- KW Small, J Weber, A Roses, and P Pericak-Vance. North carolina macular dystrophy (mcd1). a review and refined mapping to 6q14-q16.2. *Ophthalmic paediatrics and genetics*, 14:143–50, 1993.
- KW Small, B Puech, L Mullen, and S Yelchits. North carolina macular dystrophy phenotype in france maps to the mcd1 locus. *Molecular Vision*, 3:1, 1997.
- KW Small, CA Garcia, G Gallardo, N Udar, and S Yelchits. North carolina macular dystrophy (mcd1) in texas. *Retina*, 18:448–52, 1998.

- KW Small, N Udar, S Yelchits, R Klein, C Garcia, G Gallardo, B Puech, V Puech, D Saperstein, J Lim, J Haller, C Flaxel, R Kelsell, D Hunt, K Evans, F Lennon, and M Pericak-Vance. North carolina macular dystrophy (mcdrl) locus: a fine resolution genetic map and haplotype analysis. *Molecular Vision*, 5:38, 1999.
- A Tomashevski, DR Webster, P Grammas, M Gorospe, and II Kruman. Cyclin-c-dependent cell-cycle entry is required for activation of non-homologous end joining dna repair in postmitotic neurons. *Cell death and differentiation*, 17(7):1189–98, 2010.
- X Wang, C Xue, X Wang, H Liu, Y Xu, R Zhao, Z Jiang, MV Dodson, and J Chen. Differential display of expressed genes reveals a novel function of sfrs18 in regulation of intramuscular fat deposition. *International Journal of Biological Science*, 5(1):28–33, 2009.
- RG Weleber. Dysregulation of retinal transcription factor prdm13 and north carolina macular dystrophy. *Ophthalmology*, 123(1):2–4, 2016.
- Z Yang, Z Tong, L J Chorich, E Pearson, X Yang, A Moore, D M Hunt, and K Zhang. Clinical characterization and genetic mapping of north carolina macular dystrophy. *Vision Research*, 48:470–477, 2008.
- W Zhou, H Chen, and L Zhang. The pcg protein hpc2 interacts with the n-terminus of histone demethylase jarid1b and acts as a transcriptional co-repressor. *Biochemistry and Molecular Biology Reports*, 42(3):154–159, 2009.

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Funduskopie und OCT Untersuchung . . . . .	4
1.2	Genomische Region MCDR1 Stand 2003 . . . . .	11
1.3	Expressionsanalyse PRDM13 . . . . .	14
2.1	Aufbau Southern Blot . . . . .	37
3.1	Stammbäume der Familie W sowie der Familien mit dem gemeinsamen, mit NCMD assoziierten Haplotypen . . . . .	41
3.2	Stammbaum der Familie F und S . . . . .	42
3.3	Stammbaum der Familie R . . . . .	43
3.4	Einzelpersonen . . . . .	43
3.5	Häufigkeit der Allele . . . . .	45
3.6	Sequenzanalyse . . . . .	47
3.7	Southern Blot Analyse . . . . .	49
3.8	Southern Blot Analyse . . . . .	50
3.9	Southern Blot Analyse . . . . .	51

# Tabellenverzeichnis

2.1	Einsender der Patienten . . . . .	17
2.2	Chemikalien und Reagenzien . . . . .	18
2.3	Reaktionskits . . . . .	20
2.4	Pufferlösungen . . . . .	21
2.5	Enzyme . . . . .	22
2.6	Oligonukleotide für die Mikrosatellitenanalyse . . . . .	23
2.7	Oligonukleotide für die Sequenzanalyse . . . . .	24
2.8	Oligonukleotide für die Sondenherstellung . . . . .	25
2.9	Verbrauchsmaterialien . . . . .	26
2.10	Geräte . . . . .	28
2.11	Software . . . . .	30
2.12	Restriktion . . . . .	30
3.1	Haplotypen der Familien . . . . .	44

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Larissa Holterman, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen, als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Larissa Holterman

## Danksagung

Das Anfertigen dieser Arbeit wäre ohne die umfassende Unterstützung, die ich bekommen habe, nicht möglich gewesen.

Zuerst möchte ich Herrn Prof. Dr. Bernhard Weber danken, der dieses Projekt initiiert und ermöglicht hat. Dann möchte ich Frau PD Dr. Heidi Stöhr danken für die gute und umfangreiche Betreuung und Begleitung meiner Arbeit. Sie war immer mit wichtigen Ratschlägen behilflich und hat mein Vorhaben maßgeblich unterstützt.

Desweiteren gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Helbig, der die Zweitgutachtertätigkeit freundlicherweise übernommen hat.

Desweiteren möchte ich allen Labormitarbeitern danken, die stets für mich da waren, wenn ich Hilfe benötigt habe.

Ausserdem möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken für ihre Unterstützung während des gesamten Prozesses. Vor allem meinen Eltern, die mir das Studium und diese Arbeit ermöglicht haben. Zuletzt danke ich meinem Mann für seine unerschöpfliche Geduld und Unterstützung.

## Lebenslauf

Name	Larissa Christiane Holterman
Geburtsdatum	27. Oktober 1988
Geburtsort	München
Staatsangehörigkeit	Deutsch

## Schulbildung

1994 bis 1998	Grundschule, Aying
1998 bis 2002	Edith-Stein-Gymnasium, München
2002 bis 2007	St-Anna-Gymnasium, München
30. Juni 2007	Allgemeine Hochschulreife

## Hochschulstudium

2007 bis 2014	Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
2010	Beginn der Dissertation am Insti- tut für Humangenetik der Universität Regensburg, unter der Betreuung von PD Dr. Heidi Stöhr

2014

Staatsexamen

Berufstätigkeit

seit 2014

Assistenzärztin an der Vårdcentral  
Tranås, Schweden