

---

**UNTERSUCHUNGEN ZU DEN GENETISCHEN URSACHEN  
HEREDITÄRER NETZHAUTDEGENERATIONEN  
DES MENSCHEN**

Die Positionsklonierung als Strategie  
zur Isolierung und Charakterisierung  
retinaler Gene

---

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
**Christian Sauer**  
aus Aschaffenburg

Würzburg 2001

Eingereicht am: 14.02.2001

bei der Fakultät für Biologie

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Werner Goebel

Gutachter: Prof. Dr. Bernhard Weber

Gutachter: PD Dr. Gert Pflugfelder

Tag des Promotionskolloquiums: 02.05.2001

Doktorurkunde ausgehändigt am:

## **Erklärung**

Die vorliegende Arbeit wurde von mir selbständig durchgeführt.  
Andere als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen wurden nicht verwendet.  
Hiermit erkläre ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher, noch in ähnlicher  
Form in einem anderen Prüfungsverfahren bereits vorgelegt habe.

Würzburg, den 14.02.2001

*Christian Sauer*

MEINEN FAMILIEN

Die hier vorliegende Arbeit wurde am Institut für Humangenetik der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg von Mai 1996 bis Februar 2001 unter der Leitung von Prof. Dr. Bernhard Weber angefertigt. Die Arbeit wurde von Mai 1996 bis April 1999 mit einem Promotionsstipendium der Pro Retina Deutschland e.V. (vormals: Deutsche Retinitis Pigmentosa Vereinigung e.V.) und ab Mai 1999 im Rahmen des DFG-Projektes WE1259/11-1 finanziell gefördert.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bernhard Weber für die Überlassung des behandelten Themas, seine ständige Diskussionsbereitschaft und seine engagierte Förderung dieser Promotionsarbeit.

Herrn PD Dr. Gert Pflugfelder möchte ich für die kurzfristige Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen ehemaligen und aktuellen MitarbeiterInnen des Instituts für Humangenetik, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen und mich tatkräftig unterstützten. Dies gilt im Besonderen für die Mitglieder der Arbeitsgruppe Weber.

Auch allen Mitgliedern anderer Lehrstühle, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, sei herzlich gedankt.

Ein großes Dankeschön gilt auch meinen Eltern, Geschwistern, Schwiegereltern und Verwandten, die mich in Studium und Promotion nicht nur finanziell unterstützt haben.

Allen Freunden und Bekannten danke ich für die schöne Zeit außerhalb des Labors. Insbesondere bei Herrn Dr. Helge Blanke bedanke ich mich für die Beseitigung der größten germanistischen Mängel in ausgewählten Teilen dieser Arbeit.

Bei meiner Frau Chrimie möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mich immer unterstützt hat und mir immer zur Seite stand. Meinem Sohn Leo danke ich dafür, dass er so ist wie er ist.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>I. Zusammenfassung</b>	<b>6</b>
<b>Summary</b>	<b>8</b>
<b>II. Einleitung</b>	<b>10</b>
1. Aufbau und Funktion des menschlichen Auges und der Netzhaut.....	10
2. Die Positionsklonierung als Strategie zur Isolierung von Krankheitsgenen.....	13
3. Erkrankungen der Netzhaut.....	16
3.1 Hereditäre Netzhauterkrankungen.....	16
3.1.1 Generalisierte Netzhaut-Aderhautdegenerationen mit peripherem Beginn	16
3.1.2 Generalisierte Netzhaut-Aderhautdegenerationen mit zentralem Beginn..	19
3.1.3 Makuladegenerationen .....	19
3.2 Altersbedingte Makuladegeneration.....	27
4. Zielsetzungen.....	31
<b>III. Methoden</b>	<b>32</b>
1. Patienten und klinische Daten.....	32
2. Präparation von DNA.....	34
2.1 Isolierung humaner genomischer DNA aus Vollblut.....	34
2.1.1 Salzextraktion .....	35
2.1.2 Phenolextraktion und Ethanol-fällung.....	35
2.2 Isolierung von genomischer DNA aus Gewebe .....	35
2.3 Präparation rekombinanter DNA.....	36
2.3.1 Isolierung von Plasmid/Cosmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	36
2.3.1.1 Analytische Plasmid-Isolierung.....	36
2.3.1.2 Halbpräparative Plasmid-Isolierung.....	37
2.3.2 Halbpräparative Isolierung von P1/PAC-DNA.....	37
2.3.3 Halbpräparative Isolierung von $\lambda$ -Phagen-DNA.....	38
2.3.3.1 Herstellung von Phagenlysaten.....	38
2.3.3.2 Lambda-DNA Isolierung.....	38
2.3.4 Präparation von DNA aus Hefezellen.....	39
2.4 Konzentrationsbestimmung von DNA.....	40
3. Präparation von Gesamt-RNA.....	40
3.1 Isolierung aus Gewebe .....	40
3.1.1 Homogenisierung.....	41
3.1.2 Extraktion .....	41
3.2 Isolierung aus peripheren Blutlymphozyten.....	41

---

3.3	Isolierung aus Zellkulturen.....	42
3.3.1	Kultivierung von lymphoblastoiden Zelllinien.....	42
3.3.1.1	Isolierung von Lymphozyten mittels Dichtegradienten-Zentrifugation.....	42
3.3.1.2	Transformation mit Epstein-Barr-Viren (EBV).....	42
3.3.2	Kryokonservierung von Zellen.....	43
3.3.3	RNA-Isolierung.....	43
3.4	Konzentrationsbestimmung von RNA.....	43
4.	Gelelektrophoretische Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten.....	43
4.1	Agarose-Gelelektrophorese.....	43
4.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	44
4.3	Isolierung von DNA-Fragmenten.....	45
4.3.1	Niedrig schmelzende Agarose.....	45
4.3.2	Elektroelution.....	45
4.3.3	Kieselsäure-Gele.....	46
5.	Herstellung rekombinanter DNA.....	46
5.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	46
5.2	Klonierung von restriktionsverdauten DNA Fragmenten.....	47
5.2.1	Präparation der Vektor-DNA.....	47
5.2.2	Dephosphorilierung des Vektors.....	47
5.2.3	Ligation.....	47
5.3	Transformation von Bakterienzellen.....	48
5.3.1	Chemische Transformation.....	48
5.3.1.1	Herstellung kompetenter Zellen.....	48
5.3.1.2	Transformation von <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	48
5.3.2	Elektroporation.....	49
5.3.2.1	Herstellung elektrokompenter Zellen.....	49
5.3.2.2	Transformation.....	49
6.	Nachweis spezifischer Nukleinsäure-Fragmente.....	50
6.1	Transfer auf Nylonmembranen.....	50
6.1.1	Southern-Blot.....	50
6.1.2	Dot-Blot.....	51
6.1.3	Koloniehybridisierung.....	51
6.1.4	Northern Blot.....	52
6.1.4.1	Elektrophoretische Auftrennung von RNA in Agarose-Gelen.....	52
6.1.4.2	Vakuum-Transfer auf Nylonmembranen.....	52
6.2	Radioaktive Markierung von DNA.....	53
6.2.1	Markierung durch <i>random-priming</i> .....	53
6.2.2	5'-Endmarkierung.....	53
6.2.3	Reinigung der Sonden.....	54
6.3	Hybridisierung.....	54
6.3.1	Vorbereitung und Hybridisierung der Nylonmembran.....	54
6.3.2	Waschen der Membran und Autoradiographie.....	55
6.3.3	Entfernen der Hybridisierungssonde.....	55
7.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	55
7.1	Standard-PCR-Reaktion.....	56
7.2	PCR-Amplifikation langer DNA-Fragmente.....	57
7.3	Klonierung von PCR-Produkten.....	57

7.3.1	Klonierung mit dem TA Cloning® Kit.....	57
7.3.2	Klonierung mit dem pCR-Script™ Amp SK (+) Kit.....	58
7.4	Anwendungen der PCR.....	58
7.4.1	Charakterisierung polymorpher Mikrosatelliten: Kopplungsanalyse.....	58
7.4.1.1	Berechnung von <i>lod scores</i> .....	59
7.4.1.2	Wahrscheinlichkeitsberechnung für <i>haplotype sharing</i> .....	60
7.4.2	Analyse von Einzelstrang-Konformationspolymorphismen (SSCP).....	61
7.4.3	Isolierung von Sequenzfragmenten durch Inter-Alu-PCR.....	61
7.4.4	Isolierung von YAC-Endfragmenten durch ligationsvermittelte PCR.....	62
7.4.4.1	Restriktionsverdau der Hefe-DNA.....	62
7.4.4.2	Ligation von doppelsträngigen Linker-Molekülen.....	62
7.4.4.3	PCR-Amplifikation der Insertionsenden.....	63
7.4.5	Isolierung von PAC-Endfragmenten durch DOP-Vektor PCR.....	63
7.4.6	Reverse Transkriptase (RT)-PCR.....	64
7.4.6.1	Synthese des cDNA-Erststranges.....	64
7.4.6.2	Nachweis intakter cDNA.....	65
7.4.7	Schnelle Vervielfältigung von cDNA-Enden (RACE-PCR).....	65
7.4.7.1	5'-RACE-PCR.....	66
7.4.7.2	3'-RACE-PCR.....	66
8.	DNA Sequenzanalyse.....	66
8.1	Sequenzanalyse mit [ $\alpha$ - <sup>35</sup> S]-dATP.....	67
8.2	Zyklische Sequenzierung mit [ $\alpha$ - <sup>33</sup> P]-ddNTPs.....	67
8.3	Sequenzierung von PCR-Produkten.....	68
8.4	Sequenzierung von Plasmid-DNA.....	68
9.	Identifikation spezifischer DNA-Fragmente aus DNA-Banken.....	68
9.1	Ausplattieren einer retinalen $\lambda$ -Phagen-cDNA-Bank.....	68
9.2	CEPH YAC-Bank.....	69
9.3	RPCI-humane PAC-Bank.....	69
9.4	LLNLP humane Chromosom 2 spezifische PAC-Bank.....	70
10.	RNA <i>in situ</i> -Hybridisierung an Paraffinschnitten.....	70
10.1	Herstellung von Gewebeschnitten.....	70
10.2	Herstellung und Markierung der RNA-Sonde.....	71
10.2.1	Linearisierung der Plasmid-DNA.....	71
10.2.2	Markierung der RNA-Sonde durch <i>in vitro</i> -Transkription.....	71
10.3	Hybridisierung.....	72
10.4	Histologische Doppelfärbung mit Hämalaun und Eosin.....	73
11.	Das Hefe Zwei-Hybrid System.....	73
11.1	Herstellung spezifischer Fusionsklone.....	75
11.2	Herstellung kompetenter Hefen.....	75
11.3	Transformation.....	76
11.4	Nachweis von Protein-Protein Interaktionen.....	76
12.	Computergestützte Analyse von Sequenzdaten.....	76
12.1	Lokale Software.....	76
12.2	Molekularbiologische Ressourcen im <i>World Wide Web</i> .....	77
12.2.1	Datenbanken.....	77
12.2.2	Sequenzvergleiche durch BLAST-Algorithmen.....	78
12.3	Berechnung des <i>splice site discrimination score</i> zur Identifikation von Spleißstellen.....	79



**IV. Ergebnisse****81**

1. Kopplungsanalyse bei der North Carolina Makuladystrophie.....	81
1.1 Genotypisierung.....	81
1.2 Zwei-Punkt Kopplungsanalyse.....	82
1.3 Verfeinerung der minimalen Kandidatenregion.....	82
1.4 Analyse eines gemeinsamen krankheitsassoziierten Haplotypen.....	85
2. Analyse der Kandidatengenregion für die X-gebundene Retinoschisis auf Xp22.2.....	87
2.1 Erstellung eines PAC- <i>contigs</i> .....	87
2.2 Analyse des Kandidatengens TU12.....	88
2.2.1 Isolierung und Klonierung der TU12-cDNA.....	88
2.2.2 Expressionsanalyse.....	90
2.2.3 Genomische Organisation.....	91
2.2.4 Analyse der vorhergesagten Proteinsequenz.....	92
2.2.5 Mutationsanalyse in Retinoschisis Patienten.....	94
2.3 Untersuchungen zur Funktion des <i>RS1</i> -Gens in der Retina.....	96
2.3.1 Klonierung des orthologen Mausgens <i>Rs1h</i> .....	96
2.3.2 Analyse der räumlichen Expression von <i>Rs1h</i> .....	96
2.3.2.1 RNA <i>in situ</i> -Hybridisierung an Paraffinschnitten.....	96
2.3.2.2 RT-PCR von <i>Rs1h</i> in verschiedenen Mauslinien.....	97
2.3.3 Analyse der zeitlichen Expression von <i>Rs1h</i> .....	99
3. Analyse der Kandidatengenregion für radiäre Drusen auf 2p16-21.....	101
3.1 Erstellung eines YAC-, PAC- <i>contigs</i> .....	101
3.2 Untersuchung des Kandidatengens <i>pNEU60</i> .....	102
3.2.1 Isolierung und Klonierung der vollständigen cDNA-Sequenz.....	102
3.2.2 Expressionsanalyse.....	104
3.2.3 Genomische Organisation.....	105
3.2.4 FISH-Kartierung von <i>pNEU60</i> .....	106
3.2.5 Analyse der vorhergesagten Proteinsequenz.....	107
3.2.6 Mutationsanalyse in Patienten mit radiären Drusen.....	108
3.2.7 Mutationsanalyse in AMD Patienten.....	108
3.2.8 Analyse der räumlichen Expression von <i>pNEU60</i> .....	111
3.3 Untersuchung von <i>EFEMP1</i> .....	111
3.3.1 Genomische Struktur von <i>EFEMP1</i> .....	112
3.3.2 Analyse der R345W Mutation in DHRD/MLVT-Familien.....	113
3.3.3 Mutationsanalyse in Patienten mit sporadischen radiären Drusen.....	114
3.3.4 Untersuchungen zur Funktion von <i>EFEMP1</i> .....	115
3.3.4.1 Klonierung des orthologen <i>EFEMP1</i> -Gens vom Rind.....	116
3.3.4.2 Analyse zur Interaktion von <i>EFEMP1</i> mit anderen Proteinen.....	118
4. Untersuchungen zur räumlichen Expression von <i>CACNA1F</i> in der Retina.....	121
4.1 RNA- <i>in situ</i> -Hybridisierung von <i>CACNA1F</i> an Paraffinschnitten.....	121
4.2 Analyse des räumlichen Expressionsprofils des <i>CACNA1F</i> -Gens der Maus.....	122
4.2.1 RT-PCR von <i>jm8</i> in verschiedenen Mauslinien.....	122
4.2.2 RNA <i>in situ</i> -Hybridisierung von <i>jm8</i> an Paraffinschnitten.....	123

---

<b>V. Diskussion</b>	<b>124</b>
<b>VI. Literatur</b>	<b>142</b>
<b>VII. Publikationen</b>	<b>160</b>
1. Begutachtete bzw. eingereichte Veröffentlichungen.....	160
2. Kongreßbeiträge.....	161
<b>VIII. Anhang</b>	<b>163</b>
A. Chemikalien und Enzyme.....	163
B. Synthetische Nukleinsäuren und Nukleotide .....	163
C. Geräte .....	165
D. Verbrauchsmaterialien.....	166
E. Mauslinien.....	167
F. Hefestamm .....	168
G. Bakterienstämme.....	168
H. Medien .....	168
I. Antibiotika.....	170
J. PCR-Bedingungen.....	171
K. Verwendete Abkürzungen.....	175
L. Genetischer Code.....	178
M. Bezeichnung degenerierter Oligonukleotide.....	178

## I. Zusammenfassung

Die Positionsklonierung hat sich als erfolgreiche Strategie zur Identifizierung und Isolierung von Genen erwiesen. Da ihre Anwendung im Allgemeinen keine Informationen über den zugrundeliegenden Pathomechanismus einer Erkrankung voraussetzt, eignen sich die Methoden der Positionsklonierung in besonderem Maße für die Erforschung hereditärer Netzhauterkrankungen. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurden sie zur Untersuchung ausgewählter retinaler Degenerationen eingesetzt. Dabei konnten wichtige Beiträge für die Aufklärung der genetischen Ursachen dieser Erkrankungen geleistet werden.

Die autosomal dominante North Carolina Makuladystrophie (NCMD) oder die zentral areoläre Pigmentepitheldystrophie (CAPED) sind allelische Erkrankungen mit allenfalls gering progredientem Verlauf. Ihr Genlokus liegt in einem etwa 7,2 cM großen Bereich auf 6q14-q16.2 zwischen den DNA-Markern D6S424 und D6S1671. Mit Hilfe von 21 polymorphen DNA-Markern welche den NCMD-Lokus (MCDR1) flankieren, wurden Kopplungsanalysen in drei deutschen NCMD-Familien durchgeführt. Die Analyse der krankheitsassoziierten Haplotypen erbrachte Hinweise auf einen gemeinsamen Vorfahren aller drei Familien. Darüber hinaus konnte der MCDR1-Lokus auf 3,2 cM eingeeengt werden und wird von den Markern D6S249 und D6S475 flankiert. Dies bedeutet einen wichtigen Schritt auf dem Weg zur Klonierung des zugrundeliegenden Krankheitsgens.

Eine häufige Ursache für den frühzeitigen Verlust der zentralen Sehschärfe bei Jungen ist die X-gebundene juvenile Retinoschisis (RS). Ihr Genlokus wurde in einen etwa 900 kb großen Bereich auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms (Xp22.2) kartiert, wo er von den DNA-Markern DXS418 und DXS999/DXS7161 flankiert wird. Die Analyse von EST-Sequenzen aus dieser Region ermöglichte die Isolierung eines neuen retinaspezifischen Transkriptes, welches als RS1 bezeichnet wurde. Das RS1-Gen besteht aus sechs Exonen und codiert ein Protein, welches eine in der Evolution hoch konservierte Discoidin-Domäne enthält. Diese Domäne ist in anderen Proteinen u.a. an der Ausbildung von Zell-Zell-Interaktionen beteiligt. Mutationsanalysen in betroffenen Personen aus neun nicht-verwandten RS-Familien ergaben neun verschiedene Sequenzveränderungen die mit dem Krankheitsbild der jeweiligen Familie segregierten. Einen ersten Einblick in die zeitliche und räumliche Expression ergab die Untersuchung des murinen Orthologs *Rs1h* mit Hilfe von Northern Blot, RT-PCR und RNA *in situ*-Hybridisierungen. *Rs1h* wird in der Maus hauptsächlich in den Photorezeptoren exprimiert. Die Expression beginnt erst postnatal und ist mit der Entwicklung der Photorezeptoren korreliert.

Das Auftreten zahlreicher weißlich-gelber Flecken, sogenannter Drusen, in radiärer Anordnung am hinteren Augenpol ist das charakteristische Merkmal einer Gruppe von Netzhauterkrankungen mit gemeinsamer Ätiologie, die unter dem Begriffen Doynsche Honigwabens Dystrophie (DHRD), Malattia Leventinese (MLVT) oder radiäre Drusen zusammengefasst werden. Der Genlocus dieser Erkrankung wurde auf den kurzen Arm von Chromosom 2 in den Bereich 2p16 kartiert. Die Durchsuchung von EST-Datenbanken führte zur Identifizierung des neuronal exprimierten Gens *pNEU60*. Dieses besteht aus zwei Exonen, wobei der vollständige codierende Bereich im zweiten Exon liegt. Die Analyse des pNEU60-Proteins ergab eine Struktur aus sieben Transmembrandomänen, dem gemeinsamen Merkmal G-Protein gekoppelter Rezeptoren, wie z.B. Rhodopsin. Patienten mit radiären Drusen zeigten keinerlei Sequenzveränderungen in *pNEU60*. Die Untersuchung von fast 200 Patienten mit der phänotypisch sehr ähnlichen altersbedingten Makuladegeneration (AMD), führte zur Identifizierung von drei potentiellen Mutationen, darunter eine *nonsense*-Mutation, sowie zwei polymorphen Veränderungen.

Die Assoziation einer einzigen *missense*-Mutation (R345W) im ubiquitär exprimierten Gen *EFEMP1* (*EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1*) mit der DHRD und MLVT wurde von einer amerikanischen Arbeitsgruppe nachgewiesen. Die R345W Mutation in diesem proximal zu *pNEU60* liegenden Gen wurde in den zur Verfügung stehenden zwei MLVT-Familien sowie einer DHRD-Familie nachgewiesen. Bei der Analyse von 14 Patienten mit sporadischen radiären Drusen konnte weder die R345W Mutation, noch irgendeine andere krankheitsassoziierte Mutation nachgewiesen werden. Es wurden jedoch drei polymorphe Sequenzvarianten, sowie zwei polymorphe Di- bzw. Trinukleotidsequenzen identifiziert. Die Klonierung des orthologen *EFEMP1*-Gens des Rinds diente als Voraussetzung zur Untersuchung der Interaktionsfähigkeit von EFEMP1 mit anderen Proteinen. Mit der Anwendung des Hefe Zwei-Hybrid Systems konnte gezeigt werden, dass die EGF-Domänen von EFEMP1 eine Interaktion mit sich selbst ermöglichen. Die Einführung der R345W Mutation hatte dabei keinen Einfluss auf diese Wechselwirkungen. Die beschriebene Interaktion mit dem zur Familie der Ubiquiline gehörenden Protein DA41 konnte nicht reproduziert werden.

Das Gen welches mit der inkompletten Form der X-gebundenen kongenitalen stationären Nachtblindheit (CSNB2) assoziiert ist, codiert die  $\alpha$ 1-Untereinheit des retinaspezifischen spannungsabhängigen L-Typ Kalziumkanals (*CACNA1F*). Mit Hilfe von RT-PCR Analysen und RNA *in situ*-Hybridisierungen wurde die räumliche Expression dieses Gens in der Netzhaut untersucht. Dabei wurde das *CACNA1F*-Transkript in der äußeren und inneren Körnerschicht, sowie in der Ganglienzellschicht nachgewiesen.

## Summary

The positional cloning strategy is a powerful tool for the identification and isolation of genes. The application of positional cloning methods to the investigation of hereditary retinal disorders proved to be suitable as they require no information about the pathology underlying the disease. For the investigations described in this thesis several retinal degenerations were selected for the examination with the positional cloning strategy. The findings of those researches contribute to the further enlightenment of the genetic causes of those disorders.

Autosomal dominant North Carolina macular dystrophy (NCMD) or central areolar pigment epithelial dystrophy (CAPED) is an allelic disorder with slow progression. It maps to an approximately 7.2 cM interval between DNA markers at D6S424 and D6S1671 on 6q14-q16.2. A total of 21 polymorphic DNA markers flanking the NCMD locus (MCDR1) were used for genetic linkage analysis in three multigeneration families of German descent expressing the NCMD phenotype. The analysis of the disease associated haplotypes provide evidence for an ancestral founder for all three families. In addition the haplotype analysis refined the MCDR1 locus to a 3.2 cM interval flanked by markers D6S249 and D6S475. This facilitates further approaches in cloning the gene underlying NCMD.

X-linked juvenile retinoschisis (RS) is an important cause of early vision lost in males. The RS gene has been localized to Xp22.2 to an approximately 900 kb interval between DXS418 and DXS999/DXS7161. The analysis of expressed sequence tags (ESTs) have identified a novel transcript, designated RS1, within the RS locus that is exclusively expressed in retina. RS1 consists of six exons and encodes for a protein containing the highly conserved discoidin-domain which is implicated in cell-cell interaction. Mutational analyses of RS1 in affected individuals from nine unrelated RS families revealed nine different sequence variations segregating with the disease phenotype in the respective families. The temporal and spatial expression of the murine ortholog *Rs1h* was studied by northern blot and RT-PCR analyses as well as RNA *in situ* hybridizations. Predominant expression of *Rs1h* was found in photoreceptor cells starting postnatal with correlation to photoreceptor development.

The appearance of multiple yellowish-white drusen in the posterior pole of the retina is characteristic of a group of retinal disorders with a common etiology, often referred to as Doyne honeycomb retinal dystrophy (DHRD), Malattia Leventinese (MLVT) or radial drusen. The gene underlying this disorder has been mapped to the short arm of chromosome 2 at 2p16. EST database searches led to the identification of the neuronal tissue specific gene

*pNEU60*. The complete coding sequence of this gene is located in the second of two exons. Motif searches in protein databases revealed homology to a seven transmembrane domain which is a hallmark for G-protein coupled receptors like rhodopsin. While mutational analyses in patients with radial drusen identified no sequence variation in *pNEU60*, three potential pathogenic variants and two frequent polymorphic changes were found in a cohort of almost 200 patients with phenotypically similar age-related macular degeneration (AMD).

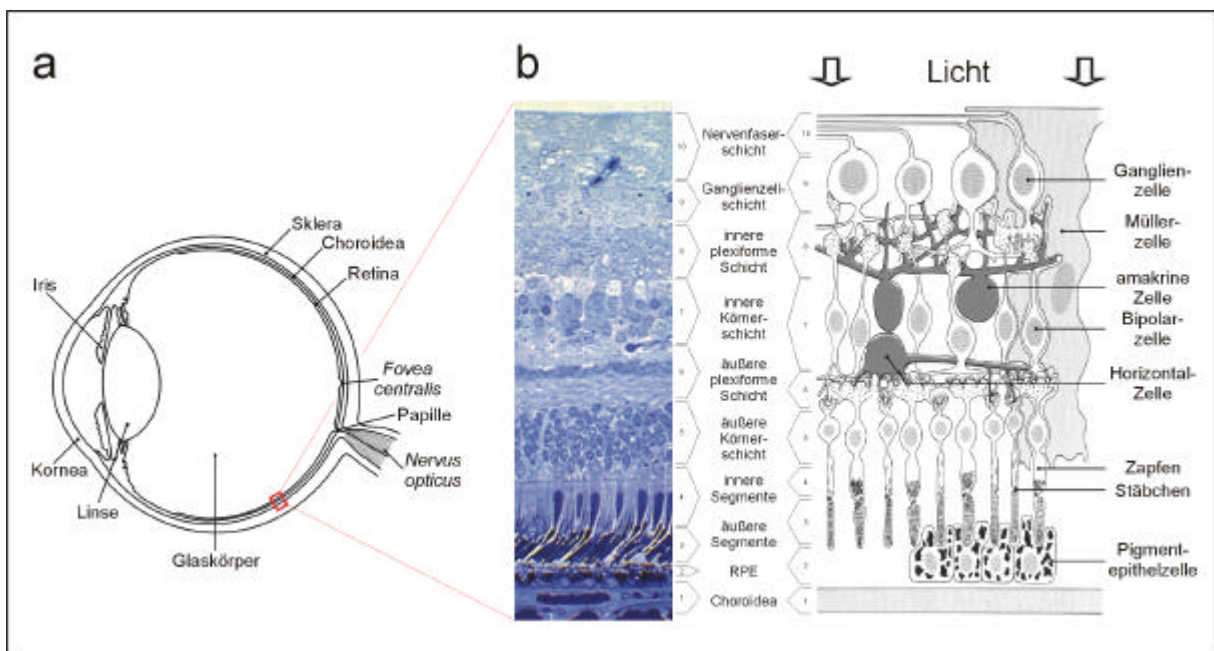
The association of DHRD and MLVT with a single missense mutation (R345W) in the ubiquitously expressed gene encoding the EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 (EFEMP1) has been recently demonstrated by a research group from the United States. The presence of the R345W mutation has been demonstrated for our two MLVT-families and the one DRHD-family. The mutational analyses in 14 unrelated individuals with sporadic early onset drusen did not detect the R345W mutation or any other disease-associated mutation. Three different polymorphic sequence variations and two intragenic polymorphic repeats were present in similar frequencies in the patients and control individuals. As a prerequisite to the analysis of the interaction capability of EFEMP1, the bovine ortholog of this gene has been cloned. The use of a yeast two hybrid system demonstrated that the EGF-motifs of EFEMP1 could interact with each other. The introduction of the R345W mutation had no effect on that interaction. The described interaction of EFEMP1 with DA41, a family member of the ubiquilin protein family could not be reproduced.

The gene associated with the incomplete form of the X-linked congenital stationary nightblindness encodes the  $\alpha$ 1-subunit of a retina specific L-type calcium-channel (CACNA1F). The spatial expression of this gene within the retina has been investigated by RT-PCR analyses and RNA *in situ* hybridizations. Transcriptional activity could be detected in the outer and inner nuclear layer as well as in the ganglion cell layer.

## II. Einleitung

### 1. Aufbau und Funktion des menschlichen Auges und der Netzhaut

Das Auge ist das wichtigste Sinnesorgan des Menschen. Es ermöglicht uns die genaue räumliche Orientierung in unserer Umwelt. Dabei liegt die besondere Leistungsfähigkeit des Sehorgans in seinem Aufbau begründet (Abbildung 1). Der Augapfel wird von einem festen Bindegewebe, der Lederhaut (Sklera) umgeben. Darunter liegt die Aderhaut (Choroidea), welche von großen und kleinen Blutgefäßen (Choriokapillaris) durchzogen wird. Die wichtigsten Bestandteile des optischen Apparates umfassen neben der Hornhaut (Kornea), durch die das Licht in das Auge eintritt, die ringförmige Regenbogenhaut (Iris) und die Linse. Die Iris dient als Blende zur Regulierung der einfallenden Lichtmenge, die Linse zur Fokussierung des Lichtes (Abbildung 1a). Sie ist durch Akkomodation in der Lage, ihre Brechkraft zu verändern und somit die Bilder unterschiedlich weit entfernter Gegenstände scharf auf die Netzhaut (Retina) zu projizieren. Die Retina ist ein hochspezialisiertes Gewebe, das Lichtenergie absorbiert, in elektrische Signale umwandelt (Phototransduktion) und zum Gehirn weiterleitet. Die aus mehreren Schichten aufgebaute Netzhaut besteht aus zwei funktionell unterschiedlichen Einheiten. Auf der dem Licht abgewandten Seite liegen die lichtempfindlichen Photorezeptoren. Diese sind direkt mit einem hochgradig geordneten Netz verschiedenster Neuronen verknüpft (Abbildung 1b).



**Abb. 1: Querschnitt durch das menschliche Auge und die Netzhaut.**

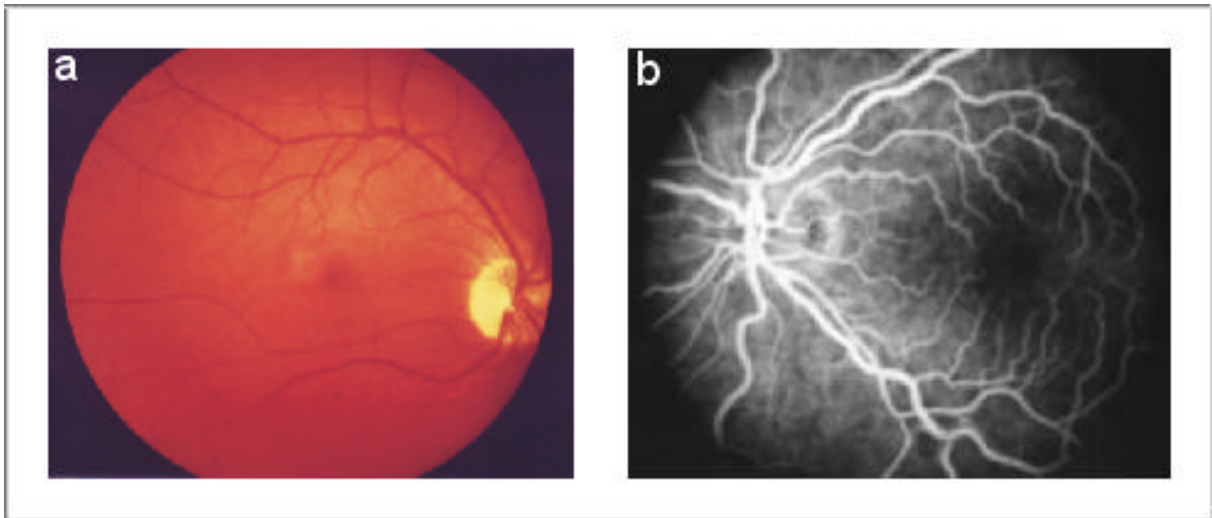
**a**, schematischer Querschnitt durch das menschliche Auge. **b**, histologischer und schematischer Querschnitt durch die menschliche Netzhaut (nach SPALTON *et al.* 1993; HOLLWICH 1988). Erklärungen siehe Text.

Die äußeren Segmente der Photorezeptoren stehen in physiologischem Kontakt mit dem einschichtigen retinalen Pigmentepithel (RPE). Die RPE-Zellen sind voller Melaningranula, welche der Absorption von Streulicht dienen. Darüber hinaus übernimmt das RPE wichtige Funktionen in der Versorgung und Instandhaltung der Photorezeptoren. Die Versorgung des RPE und damit der Photorezeptoren erfolgt über die Choriokapillaris, welche durch eine Basallamina, der sog. Bruchschichten Membran, vom RPE abgegrenzt wird. Man unterscheidet zwei funktionelle Photorezeptortypen. Die etwa 125 Millionen Stäbchen vermitteln das Dämmerungs- und Bewegungssehen, wohingegen die etwa 6 Millionen Zapfen auf das Hell- und Farbsehen spezialisiert sind. Die äußeren Segmente beider Rezeptortypen sind aus gestapelten Membranscheibchen aufgebaut. In diesen Membranstrukturen sind die Photopigmente eingebettet, welche aus dem lichtabsorbierenden Pigmentmolekül Retinal und dem assoziierten Membranprotein Opsin bestehen. Die Membranscheibchen besitzen nur eine begrenzte Lebensdauer und werden kontinuierlich erneuert. So wird das äußere Segment eines Stäbchens innerhalb von etwa 8-14 Tagen, das eines Zapfens innerhalb eines Jahres vollständig ersetzt. Die inneren Segmente der Photorezeptoren beinhalten den Zellkern und sind über Synapsen (äußere plexiforme Schicht) mit intermediären Neuronen, den Bipolar und Horizontalzellen, verschaltet. In diesem als innere Körnerschicht bezeichneten neuronalen Netzwerk finden sich auch amakrine Zellen, welche für eine horizontale Querverbindung zwischen den Neuronen sorgen. Die Weiterleitung der elektrischen Signale aus der inneren Körnerschicht erfolgt über Synapsen (innere plexiforme Schicht) auf Ganglienzellen. Die in der Nervenfaserschicht liegenden Axone der Ganglienzellen bilden den Sehnerv (*Nervus opticus*). Dieser tritt an der Papille („blinder Fleck“) aus und leitet die gesammelten Informationen an das Gehirn weiter. Eine Art Grundgerüst der neuronalen Retina bilden die sog. Müller-Zellen. Diese Gliazellen durchziehen den gesamten neuronalen Bereich der Retina. Sie besitzen eine Stützfunktion und versorgen die inneren Segmente der Photorezeptoren. Außerdem spielen Müller-Zellen eine Rolle bei der Ausbildung synaptischer Verbindungen (REICHENBACH & ROBINSON 1995). Die Versorgung der inneren Schichten der Retina erfolgt über die Äste der Zentralarterie. Den optischen Mittelpunkt der Netzhaut bildet die flachovale, etwa 2,5 mm breite *Makula lutea* („gelber Fleck“). Im Zentrum dieses, durch das Karotinoid Xantophyll gelb gefärbten, retinalen Bezirks liegt die 1,5 mm große, stäbchenfreie Sehgrube, die *Fovea centralis*. Diese wird auch als Stelle des schärfsten Sehens bezeichnet, was in der sehr hohen Zapfendichte von 150.000 pro mm<sup>2</sup> und einer direkten eins zu eins Verschaltung zwischen den Zapfen und den nachfolgenden Neuronen begründet liegt.

Eine Untersuchung der morphologisch-anatomischen Integrität der Netzhaut und der Makula ermöglicht die Ophthalmoskopie (Funduskopie). Dabei wird mit Hilfe eines Augenspiegels der Augenhintergrund (Fundus) betrachtet (Abbildung 2a). Für die



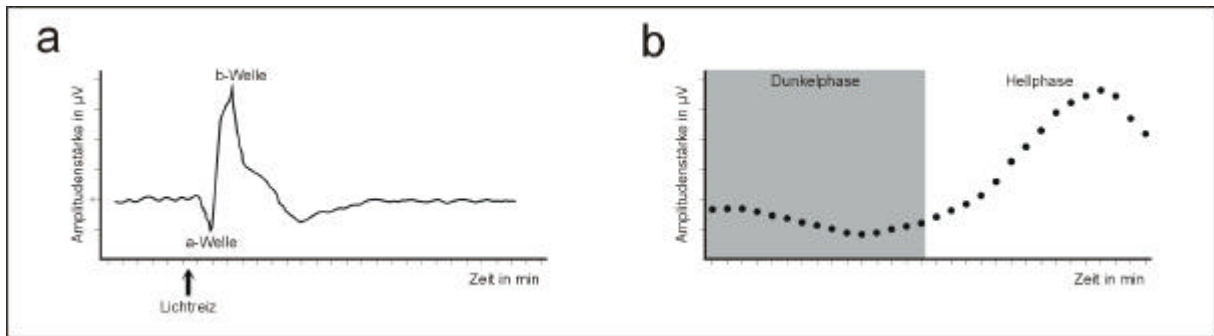
differenziertere Darstellung des retinalen Gefäßsystems wird die sog. Fluoreszenzangiographie verwendet (Abbildung 2b). Damit lassen sich z.B. Störungen im retinalen Blutkreislauf erkennen.



**Abb. 2: Aufnahmen des Augenhintergrundes klinisch unauffälliger Personen.**

**a**, normale Fundusaufnahme des rechten Auges. Die retinalen Gefäße entspringen der als hellgelbem Fleck erscheinenden Papille. Die Makula ist als heller Fleck in der Mitte der Aufnahme zu erkennen (aus STÖHR 1998). **b**, fluoreszenzangiographische Aufnahme des linken Auges. In der hier dargestellten sog. späten arteriovenösen Phase, sind sowohl Arterien als auch Venen vollständig mit dem Fluoreszenzfarbstoff gefüllt. Die Makula zeigt sich als dunkle, ungefärbte Zone, frei von Kapillargefäßen (aus PORTER *et al.* 1997).

Aussagen über den physiologischen Zustand der Netzhaut ermöglichen elektrophysiologische Untersuchungsmethoden. Das Elektretinogramm (ERG) registriert Potentialschwankungen der Retina nach einem Lichtreiz. Die Ableitung erfolgt bei licht- (photopischem) bzw. dunkeladaptiertem (skotopischem) Auge über eine Ringelektrode an der Kornea und eine indifferente Schläfenelektrode (LEYDHECKER 1987). Dabei erhält man einen charakteristischen biphasischen Kurvenverlauf mit einer negativen a-Welle, gefolgt von einer positiven b-Welle (Abbildung 3a). Dieser ermöglicht Aussagen über den Zustand der Bipolarzellen, der Müllerzellen und der Photorezeptoren (SPALTON *et al.* 1993). Modifikationen im ERG sind oft bereits nachweisbar, bevor morphologische Veränderungen am Fundus sichtbar werden. Für eine differenziertere Untersuchung einzelner Netzhautareale wird das multifokale ERG verwendet. Dabei werden mit Hilfe von multiplen, in einem festen Raster dargebotenen Lichtblitzen eine Topographie lokaler Potentiale erstellt (APFELSTEDT-SYLLA *et al.* 2000). Das Elektrookulogramm (EOG) misst die lichtabhängige Potentialdifferenz zwischen Kornea und Retina während der Bewegung des Auges. Die Ableitung erfolgt hierbei über indifferente Stirn- und Schläfenelektroden. Nach der Dunkeladaptation der Augen in der ersten Phase der Messung steigt die EOG-Amplitude bei plötzlicher Helladaptation (Abbildung 3b). Dieser sog. Hellanstieg ist auf die Reizantwort des RPE zurückzuführen (STEINBERG *et al.* 1983).



**Abb. 3: Elektrophysiologische Untersuchung der Netzhautfunktion mit ERG und EOG.**

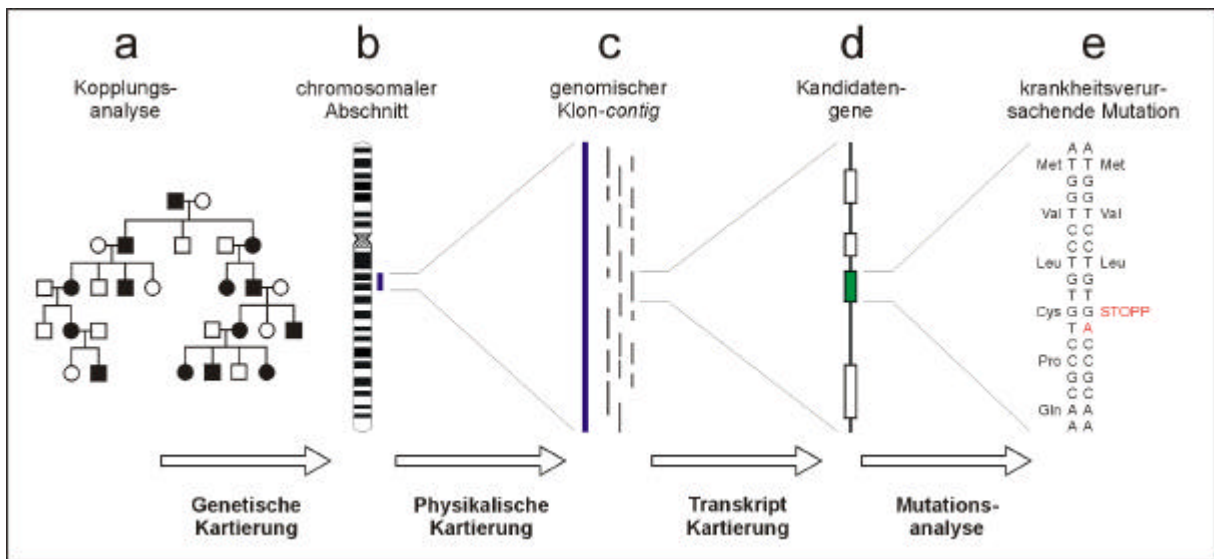
**a**, Elektretinogramm einer gesunden Person. Der negativen a-Welle folgt die positive b-Welle (nach LEYDHECKER (1988)). **b**, normales Elektrookulogramm. Anstieg der Amplitude in der Hellphase nach Dunkeladaptation (nach SPALTON *et al.* 1993).

## 2. Die Positionsklonierung als Strategie zur Isolierung von Krankheitsgenen

Trotz der verschiedenen diagnostischen Ansätze existieren bislang keine genauen Vorstellungen über die Pathomechanismen von Erkrankungen der Netzhaut bzw. Makula (APFELSTEDT-SYLLA *et al.* 2000). Die Möglichkeiten einer direkten biochemischen Analyse des erkrankten Gewebes sind stark eingeschränkt. Das erkrankte Gewebe ist in der Regel nicht bzw. nur in sehr geringen Mengen verfügbar. Darüber hinaus verhindert oft ein bereits mehrere Jahre vor der Diagnose beginnender Krankheitsverlauf, eine Unterscheidung der primären, sekundären oder tertiären Veränderungen zum Zeitpunkt einer biochemischen Untersuchung. Einen alternativen Forschungsansatz bietet der Einsatz verschiedener molekulargenetischer Techniken. Als Methode der Wahl erweist sich hier die sogenannte Positionsklonierung, da hierbei keinerlei Vorkenntnisse zur Pathogenese einer Erkrankung vonnöten sind. Die Isolierung des krankheitsverursachenden Gens erfolgt ausschließlich aufgrund seiner chromosomalen Lokalisation (Abbildung 4). In der Praxis konnten mit Hilfe dieses Ansatzes bereits die Gene einiger wichtiger Erbkrankheiten isoliert werden, so z.B. das Gen für die Zystische Fibrose (Mukoviszidose) (ROMMENS *et al.* 1989), die Myotone Dystrophie (BROOK *et al.* 1992) oder die Gene für die familiären Formen des Brust- und Ovarialkrebses (MIKI *et al.* 1994, WOOSTER *et al.* 1995).

Der erste Schritt bei der positionellen Klonierung eines Gens ist die Bestimmung seiner chromosomalen Lage (Abbildung 4a). Dazu werden in der Regel Kopplungsanalysen durchgeführt, wobei die exakte klinische Erfassung von betroffenen und nicht-betroffenen Familienmitgliedern eine wesentliche Voraussetzung für den Erfolg dieser Methode darstellt. Die mit Hilfe von Kopplungsanalysen durchgeführte genetische Kartierung beruht auf der Suche nach dem minimalen gemeinsamen chromosomalen Abschnitt aller betroffenen Mitglieder einer Familie. Die genaue Lokalisierung wird durch die mehr oder weniger gleichmäßige Verteilung polymorpher DNA-Marker aus zwei bis vier sich

wiederholenden Nukleotiden (*short tandem repeats, STRs*) ermöglicht. Je geringer der physikalische Abstand zweier Merkmale, z.B. Krankheitsgen und DNA-Marker ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass diese beiden Merkmale bei der meiotischen Rekombination nicht getrennt und damit gemeinsam vererbt werden. Die durch die Anstrengungen des Humangenom-Projektes generierten, hochaufgelösten, genetischen Karten ermöglichen schließlich, eine mehr oder weniger feine Lokalisierung des Krankheitsgens innerhalb eines chromosomalen Abschnitts, mit einer Größenordnung von einigen Centimorgan (Abbildung 4b).



**Abb. 4 Schematische Darstellung der einzelnen Schritte bei der Positionsklonierung.**  
a-e, Erklärungen siehe Text (nach SCHULER *et al.* 1996).

Der nächste Schritt besteht in der physikalischen Klonierung der genetischen Kandidatenregion mit Hilfe überlappender genomischer DNA-Klone (Abbildung 4c). Die hierbei verwendeten Vektorsysteme sind in der Lage sehr große DNA-Fragmente aufzunehmen, so dass die Anzahl der Klone, welche benötigt werden um eine Region vollständig abzudecken, überschaubar bleibt. Die ursprünglich dazu verwendeten künstlichen Hefechromosomen (YAC, *yeast artificial chromosomes*) können zwar DNA-Fragmente von über einer Megabase aufnehmen, doch sind sie oft chimär, d.h. sie enthalten als Artefakte DNA-Abschnitte, die im Genom nicht zusammenhängen. Daher ist man dazu übergegangen, bakterielle Systeme wie die künstlichen Bakterienchromosomen (BACs, *bacterial artificial chromosome*) und die vom Phagen P1 abgeleiteten künstlichen Chromosomen (PACs, *P1-derived artificial chromosomes*) zu verwenden. Da diese jedoch nur DNA-Fragmente mit einer durchschnittlichen Größe von 150-300 kb aufnehmen können, benötigt man mehr Klone um einen Bereich mit einer gewissen Redundanz abzudecken. Für die Lokalisierung der einzelnen Klone innerhalb einer als *contig* bezeichneten, zusammenhängenden, genomischen Region verwendet man als feste Bezugspunkte kurze, bekannte Sequenzabschnitte, sogenannte STS (*sequence tagged site*)-Marker. Auch die Enden bereits isolierter Klone können für die Identifizierung neuer Klone verwendet werden.

Eine auf diese Weise klonierte Kandidatenregion, umspannt häufig mehrere hundert Kilobasen DNA und enthält meist eine Vielzahl von Genen (Abbildung 4d). Das Herausfiltern eines gesuchten Krankheitsgens aus der Masse der vorhandenen Gene in einer bestimmten Kandidatenregion ist eine der größten Herausforderungen bei der Positionsklonierung (COLLINS 1992). Es gibt viele verschiedene Methoden mit denen exprimierte Sequenzen in genomischer DNA identifiziert werden können, um die Transkriptkarte einer Kandidatenregion zu erstellen. Hierzu zählen das Durchsuchen von cDNA-Banken, die cDNA-Selektion (ROMMENS *et al.* 1993), EST(*expressed sequence tag*)-Datenbankanalysen, die Identifizierung von CpG-Inseln (VALDES *et al.* 1994), das Exon-trapping (NEHLS *et al.* 1994), Zoo-Blots oder die computergestützte Vorhersage codierender Bereiche in genomischen Sequenzen (UBERBACHER & MURAL 1991; CLAVERIE 1997). Letzteres gewinnt im Zuge der fortschreitenden Sequenzierung des menschlichen Genoms immer mehr an Bedeutung. Um möglichst alle Transkripte aus einer Kandidatenregion zu isolieren, werden meist mehrere der genannten Methoden gleichzeitig angewendet. Da man davon ausgeht, dass Gene, die mit Netzhautdegenerationen assoziiert sind, vor allem in der Retina und/oder dem RPE exprimiert werden, sind Klone aus diesen Geweben von besonderem Interesse. Die mit einer der oben genannten Methoden identifizierten cDNA-Klone repräsentieren jedoch häufig nur Teilsequenzen des zugehörigen Gens. Um die vollständige Sequenz eines Transkriptes zu erhalten, versucht man überlappende cDNA-Klone zu identifizieren und zusammensetzen. Mit Hilfe der auf der Polymerasenkettenreaktion (PCR) basierenden RACE (*rapid amplification of cDNA ends*)-Methode lassen sich zusätzlich die häufig unterrepräsentierten 5'-Enden eines Transkriptes isolieren.

Der Nachweis, dass ein isoliertes Kandidatengen das gesuchte Krankheitsgen darstellt, erfolgt schließlich über die Identifizierung von Mutationen in diesem Gen bei mehreren, nicht miteinander verwandten, betroffenen Individuen (Abbildung 4e). Dazu wird zunächst durch den Vergleich der cDNA- mit der genomischen Sequenz die Exon-Intron-Struktur des Gens bestimmt. Anschließend werden die codierenden Bereiche des Gens durch PCR amplifiziert und die erhaltenen Produkte mit verschiedenen Methoden, wie z.B. SSCP (*single strand conformation polymorphism*), DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*), DHPLC (*denaturing high pressure liquid chromatography*), PTT (*protein truncation test*) und/oder direkter Sequenzanalyse, auf Mutationen untersucht. Die Identifizierung und Charakterisierung eines krankheitsassoziierten Gens ist eine wesentliche und notwendige Voraussetzung für die Entwicklung neuer Ansätze bei der Behandlung und Betreuung von Patienten (WEBER 1997). Somit stellt die Klonierung eines Krankheitsgens den Ausgangspunkt für die Suche nach der Funktion seines Genproduktes und dessen Rolle in der Pathogenese der Erkrankung dar.

### **3. Erkrankungen der Netzhaut**

Die Netzhaut besitzt eine hochgeordnete Struktur, an deren Aufbau und Instandhaltung eine sehr große Anzahl verschiedenster Proteine beteiligt ist. Darüber hinaus sind unzählige weitere Proteine in die komplexen physiologischen Vorgänge der Retina involviert. Die Vielzahl der funktionell bedeutenden Gene lässt vermuten, dass die Inzidenz der genetisch bedingten Netzhauterkrankungen sehr hoch ist. Tatsächlich konnten bisher bereits 127 verschiedene Gene identifiziert werden, die den unterschiedlichsten Formen von Netzhauterkrankungen zugrunde liegen<sup>1</sup>.

#### **3.1 Hereditäre Netzhauterkrankungen**

In der Literatur werden die Begriffe „Degeneration“ und „Dystrophie“ häufig synonym verwendet. Doch während der Terminus „Degeneration“ im biologisch-medizinischen Sinn den Verfall von Zellen, Geweben oder Organen umschreibt, wird der Ausdruck „Dystrophie“ als Ernährungsstörung bzw. mangelhafte Versorgung eines Organs mit Nährstoffen definiert. Die „Netzhautdegeneration“ beschreibt daher den anatomisch-morphologischen Zustand der erkrankten Netzhaut, ohne Rücksicht auf die Ursachen, die zu diesem Zustand geführt haben. Eine „Netzhautdystrophie“ impliziert dagegen, dass die Ursachen für die pathologischen Veränderungen bekannt sind, dies ist in der Regel jedoch nicht der Fall. Dennoch hat sich für eine Reihe von Netzhautdegenerationen die Bezeichnung „Dystrophie“ eingebürgert. Als Beispiel seien die Doynesche Honigwabendystrophie oder die North Carolina Makuladystrophie genannt. Im Folgenden wird der Begriff „Dystrophie“ jedoch nur in den Fällen verwendet, in denen es sich um eine fest etablierte Bezeichnung einer Netzhauterkrankung handelt.

##### **3.1.1 Generalisierte Netzhaut-Aderhautdegenerationen mit peripherem Beginn**

Hereditäre Netzhauterkrankungen lassen sich aufgrund ihrer phänotypischen Erscheinungsformen in drei mehr oder weniger klar definierte Klassen einteilen (Tabelle 1). Eine sehr große Gruppe bilden die generalisierten Netzhaut-Aderhautdegenerationen mit peripherem Beginn, d.h. die Krankheitszeichen treten zuerst in der Netzhautperipherie auf und dehnen sich während des Krankheitsverlaufs über die gesamte Netzhaut aus. Diese Gruppe wird auch unter dem Sammelbegriff Retinitis Pigmentosa (RP) zusammengefasst.

---

<sup>1</sup> <http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/>

**Tab. 1: Vererbung und Häufigkeit verschiedener Netzhautdegenerationen (nach KELLNER 1997).**

Beurteilung der Häufigkeit : Ein Augenarzt wird von Patienten mit dieser Netzhautdegeneration (1) einen oder mehrere sehen, (2) wahrscheinlich einen sehen, (3) in spezialisierten Zentren einen oder mehrere sehen, (4) in spezialisierten Zentren wahrscheinlich einen sehen.

Abkürzungen : ad, autosomal dominant; ar, autosomal rezessiv; X, X-chromosomal.

Diagnose	Erbgang	Häufigkeit
<i>Generalisierte Netzhaut-Aderhautdegenerationen mit peripherem Beginn</i>		
Retinitis pigmentosa	ad, ar, X	1
Usher Syndrom	ar	2
Lebers kongenitale Amaurose	ar	3
Kongenitale stationäre Nachtblindheit	ad, ar, X	3
<i>Generalisierte Netzhaut-Aderhautdegenerationen mit zentralem Beginn</i>		
Zapfen-Stäbchendystrophie	ad, ar, X	2
Zapfendystrophie	ad, ar, X	3
<i>Makuladegenerationen</i>		
Morbus Stargardt (Fundus flavimaculatus)	ar, ad	1
Vitelliforme Makuladystrophie (Bestsche Erkrankung)	ad	2
X-gebundene juvenile Retinoschisis	X	2
Radiäre Drusen	ad	4
North Carolina Makuladystrophie	ad	4

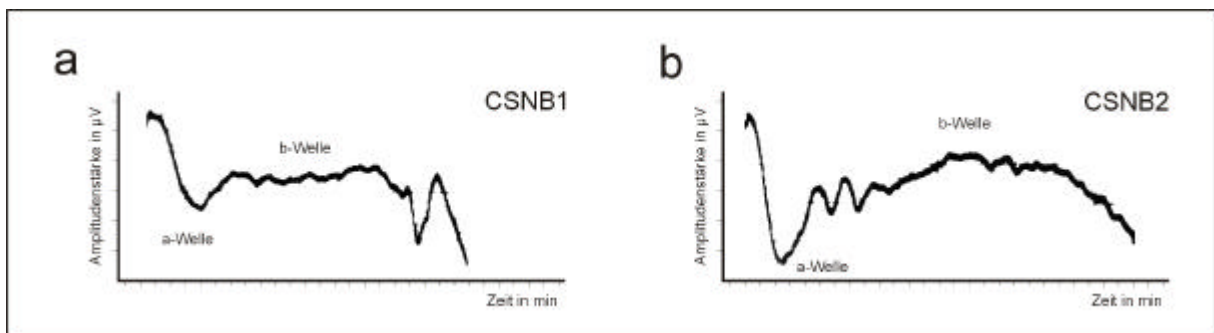
Die RP ist kein einheitliches Krankheitsbild, sondern eine Gruppe klinisch und genetisch äußerst variabler Erkrankungen. Zu den gemeinsamen klinischen Merkmalen gehören Nachtsehbeschwerden, sowie konzentrische Gesichtsfeldeinschränkungen (Ringskotome), die auch als „Tunnelblick“ bezeichnet werden (KELLNER 1997). Ein Verlust des Visus sowie Farbsinnstörungen treten erst in fortgeschrittenen Stadien auf. Das ERG ist v.a. bei Dunkeladaptation stark reduziert bis ganz erloschen. Der Hellanstieg im EOG ist reduziert bis nicht vorhanden. Das Erstmanifestationsalter reicht von angeborener Blindheit (Lebers kongenitale Amaurose), bis zur Diagnosestellung im hohen Alter, bei relativ geringen Sehbeeinträchtigungen. Der Vererbungsmodus der RP kann sowohl autosomal dominant, autosomal rezessiv oder X-chromosomal erfolgen. Bisher sind bereits 36 verschiedene RP-Gene bekannt oder vorhergesagt, davon sind 19 Gene bereits kloniert (PHELAN & BOK 2000). Die RP kann auch als Teilsymptom einer Systemerkrankung auftreten, z.B. beim Usher-Syndrom bei der die RP zusammen mit Schwerhörigkeit bzw. Taubheit auftritt (APFELSTEDT-SYLLA *et al.* 2000). Bislang gibt es für die RP keine grundlegende Therapie. Optische und elektronische Sehhilfen, sowie spezielle Lichtschutzgläser dienen lediglich der Linderung von Teilsymptomen. Eine besondere Position in der Gruppe der generalisierten Netzhaut-Aderhautdegenerationen mit

peripherem Beginn nimmt die kongenitale stationäre Nachtblindheit (CSNB) ein. Sie unterscheidet sich von der RP v.a. durch ihren stationären Verlauf sowie einer Visusminderung bereits im Kindesalter. Da die CSNB auch Gegenstand der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ist, sollen im Folgenden die wichtigsten klinischen und genetischen Charakteristika der CSNB dargestellt werden.

## X-gebundene kongenitale stationäre Nachtblindheit

### Klinik

Die kongenitale stationäre Nachtblindheit (CSNB) ist eine klinisch und genetisch sehr heterogene Gruppe von Netzhautdegenerationen, die allen Mendelschen Erbgängen folgen kann. Gemeinsame Merkmale aller Vererbungsformen sind eine angeborene, nicht-progressive Nachtblindheit, sowie ein meist unauffälliger Fundus (HÉON & MUSARELLA 1994). Bei der X-chromosomal vererbten CSNB finden sich darüber hinaus, mehr oder weniger starke Visusminderungen, Kurzsichtigkeit (Myopie) und Augenzittern (Nystagmus) (BIRD & JAY 1994). Das wichtigste diagnostische Hilfsmittel bei der CSNB ist das ERG. Unter skotopischen Bedingungen besitzen CSNB-Patienten eine weitgehend normale a-Welle und eine stark reduzierte bzw. völlig erloschene b-Welle (SCHUBERT & BORNSTEIN 1952). Abhängig vom Ausmaß der dabei nachweisbaren Stäbchenfunktion bzw. -dysfunktion, unterscheidet man bei der X-chromosomalen CSNB eine komplette Form (CSNB1), mit fehlender Stäbchenfunktion, von einer inkompletten Form (CSNB2) mit einer reduzierten Stäbchenfunktion (MIYAKE *et al.* 1986) (Abbildung 5).



**Abb. 5: Skotopisches ERG zweier Patienten mit X-gebundener CSNB.**

**a**, skotopisches ERG eines CSNB Patienten mit der kompletten Form (CSNB1), bei hoher Intensität des Lichtreizes. **b**, skotopisches ERG eines CSNB Patienten mit der inkompletten Form (CSNB2). Man beachte die höhere Amplitude der b-Welle im Vergleich zu **a** (nach KHOURI *et al.* 1988).

### Genetik

Die X-chromosomale Form der CSNB ist auch genetisch heterogen und besitzt mindestens zwei chromosomale Lozi. Die komplette Form (CSNB1) wurde in den chromosomalen Bereich Xp11.4-p11.3, die inkomplette Form (CSNB2) in den Bereich Xp11.23 kartiert (MUSARELLA *et al.* 1989; BOYCOTT *et al.* 1998; BERGEN *et al.* 1995). Als krankheitsassoziiertes

Gen bei der CSNB1 konnte kürzlich *NYX* identifiziert werden, dessen Genprodukt (Nyctalopin) elf leucinreiche Motive besitzt, die möglicherweise eine Rolle bei der Zelladhäsion und dem Wachstum von Axonen spielen (BECH-HANSEN *et al.* 2000, PUSCH *et al.* 2000). Bei Patienten mit CSNB2 konnten Mutationen im Gen für die  $\alpha$ 1-Untereinheit des retinaspezifischen, spannungsabhängigen L-Typ Kalziumkanals (*CACNA1F*) identifiziert werden (STROM *et al.* 1998, BECH-HANSEN *et al.* 1998). Aufgrund der charakteristischen ERG Befunde und der angenommenen Funktion des Genproduktes, wurde eine verringerte Transmitterausschüttung aufgrund eines gestörten  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluxes in der inneren Körnerschicht vermutet. Um diese Vermutung zu überprüfen und damit erste Einblicke in die physiologische Bedeutung von *CACNA1F* zu gewinnen, bieten sich Untersuchungen zur räumlichen Expression dieses Gens in der Retina an.

### **3.1.2 Generalisierte Netzhaut-Aderhautdegenerationen mit zentralem Beginn**

Bei den generalisierten Netzhaut-Aderhautdegenerationen mit zentralem Beginn treten i.d.R. ein früher Visusverlust, Zentralskotome, Farbsinnstörungen sowie erhöhte Blendungsempfindlichkeit auf (KELLNER 1997). Die häufigsten Vertreter dieser Netzhauterkrankungen sind die Zapfen-Stäbchendystrophien. Diese können analog zur RP autosomal dominant, autosomal rezessiv oder X-chromosomal vererbt werden. Elektrophysiologisch lassen sich im ERG der Verlust der zapfen- und später der stäbchenabhängigen Potentiale erkennen. Das ERG kann in fortgeschrittenen Stadien völlig erlöschen. Das EOG ist im Verlauf der Erkrankung reduziert. Vor allem das ERG dient zur Abgrenzung der Zapfendystrophien und Zapfen-Stäbchendystrophien von den Makuladegenerationen (KELLNER 1997).

### **3.1.3 Makuladegenerationen**

Degenerative Veränderungen im Bereich der Makula und der damit verbundene progressive Verlust des zentralen Sehvermögens sind das gemeinsame Merkmal der sowohl klinisch als auch genetisch heterogenen Gruppe der Makuladegenerationen. Eine Klassifizierung der verschiedenen Makuladegenerationen basiert vor allem auf dem Zeitpunkt ihres Manifestationsbeginns sowie morphologisch-anatomischer Veränderungen des Augenhintergrundes (DEUTMAN 1971; JIMENEZ-SIERRA *et al.* 1989). Diese Veränderungen sind zu Beginn oft sehr unspezifisch, d.h. die klassischen Symptome zeigen sich erst im weiteren Verlauf der Erkrankung. Die Spätstadien vieler Makuladegenerationen zeigen Übereinstimmungen mit dem klinischen Bild der altersbedingten Makuladegeneration (siehe 3.2). Dies kann eine Differentialdiagnose erschweren. Zu den subjektiven



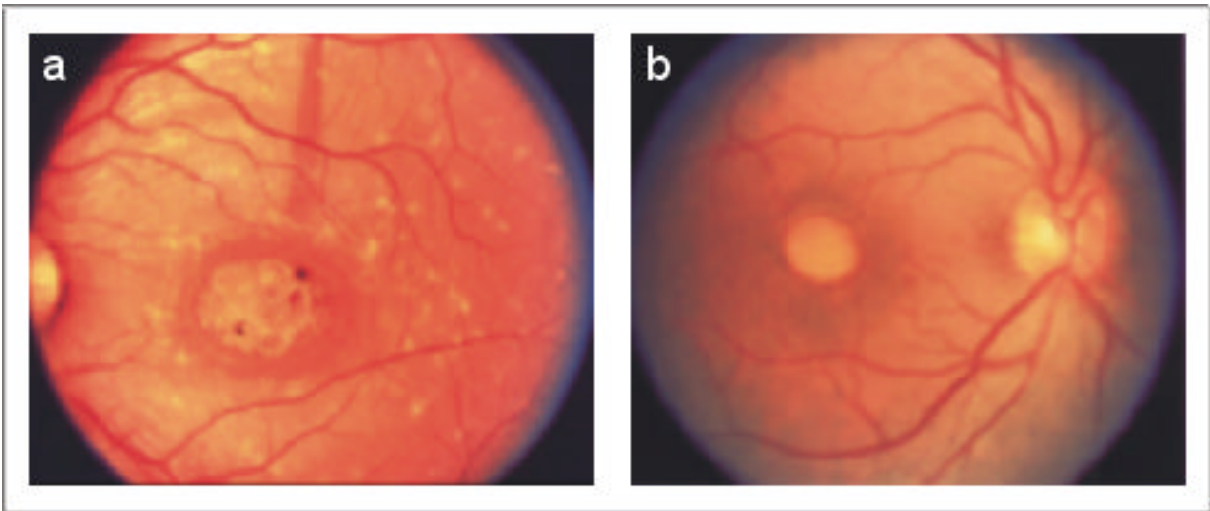
Funktionseinschränkungen bei Makuladegenerationen gehören die Herabsetzung der Sehschärfe und der Lesefähigkeit, zentrale Gesichtsausfälle (Zentralskotome), Störungen in der Farbwahrnehmung, Blendungsempfindlichkeit und verringerte Kontrastempfindlichkeit (APFELSTEDT-SYLLA *et al.* 2000). Elektrophysiologisch zeigen Makuladegenerationen, von einigen Ausnahmen abgesehen (z.B. X-gebundene juvenile Retinoschisis, Morbus Best), häufig keine Auffälligkeiten. Die enge räumliche Begrenzung der Erkrankungen auf den makulären Bereich, beeinflusst das mit dem ERG gemessene Summenpotential der gesamten Netzhaut kaum. Mit dem multifokalen ERG lassen sich die Funktionsstörungen jedoch spezifisch nachweisen. Makuladegenerationen können allen Mendelschen Erbgängen folgen.

### **Morbus Stargardt**

Die häufigste juvenile Makuladegeneration ist die autosomal rezessive Form des Morbus Stargardt (STGD1), mit einer Prävalenz von etwa 1:10.000. Als charakteristisches Merkmal dieser sich bereits im frühen Kindesalter manifestierenden Erkrankung gelten fleckförmige Veränderungen des Fundus (*Fundus flavimaculatus*) (Abbildung 6a). Der Verlauf der Erkrankung ist i.d.R. rasch progredient und führt zum bilateralen Visusverlust. Als krankheitsassoziiertes Gen konnte der netzhautspezifische ABC (ATP-binding cassette)-Transporter (*ABCA4*) auf dem kurzen Arm von Chromosom 1, im Bereich 1p21, identifiziert werden (ALLIKMETS *et al.* 1997a).

### **Morbus Best**

Eine weitere, relativ häufige Makuladegeneration ist der Morbus Best (VMD2), der auch als vitelliforme Makuladystrophie bezeichnet wird. Diese autosomal dominante Erkrankung tritt ebenfalls klinisch bereits sehr früh in Erscheinung. Die typischen „eidotterartigen“ (vitelliformen) Ablagerungen lassen sich jedoch erst in fortgeschrittenen Stadien erkennen und werden von einem progredienten Verlust des Sehvermögens begleitet (Abbildung 6b). Ein wichtiges diagnostisches Hilfsmittel, v.a. in den frühen Stadien der Erkrankung, ist das EOG. Bei Patienten mit Morbus Best ist der Hellanstieg deutlich reduziert. Mit Hilfe der Positionsklonierung konnte das RPE spezifische *VMD2*-Gen auf dem langen Arm von Chromosom 11, im Bereich 11q13, isoliert werden (MARQUARDT *et al.* 1998; PETRUKHIN *et al.* 1998).



**Abb. 6: Morbus Stargardt und Morbus Best.**

**a**, Fundusaufnahme des linken Auges eines Patienten mit Morbus Stargardt. Man erkennt eine ausgeprägte Makulopathie, sowie helle Flecken (*Fundus flavimaculatus*) (aus PRIMO 1997).

**b**, die Fundusaufnahme eines fortgeschrittenen Morbus Best im rechten Auge zeigt die typischen vitelliformen Ablagerungen im Bereich der Makula (aus PRIMO 1997).

Im Folgenden werden die wichtigsten klinischen und genetischen Charakteristika der in dieser Arbeit untersuchten Makuladegenerationen beschrieben und der jeweilige Forschungsstand dargestellt.

## North Carolina Makuladystrophie

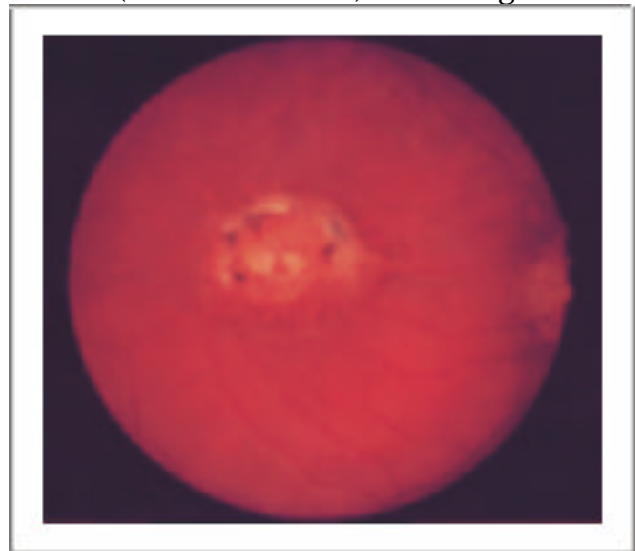
### *Klinik*

Die North Carolina Makuladystrophie (NCMD) wurde erstmals vor fast 30 Jahren in einer vier Generationen umfassenden Familie aus dem US-Bundesstaat North Carolina beschrieben (LEFLER *et al.* 1971). Ursprüngliche Bezeichnungen dieses Krankheitsbildes lauteten „vererbliche Makuladegeneration und Aminoacidurie“, „Lefler, Wadsworth, Sidbury Syndrom“ oder „dominante progressive foveale Dystrophie“ (FRANK *et al.* 1974), bevor sich die Bezeichnung „North Carolina Makuladystrophie“ (GASS 1987) durchsetzte. Später wurden auch betroffene Familien in anderen Ländern beschrieben (SMALL *et al.* 1993). Das klinische Bild der NCMD kann sehr stark variieren und wird in drei verschiedene Schweregrade unterteilt (FRANK *et al.* 1974). Grad 1 ist gekennzeichnet durch vereinzelte Drusen im Bereich der Makula und Pigmentdispersion. Diese Veränderungen findet man auch bei der altersbedingten Makuladegeneration (siehe unten). Die Kennzeichen von Grad 2 sind konfluierende Drusen und fakultative Pigmentverdichtungen. Bemerkenswert erscheint, dass bei den Ausprägungsformen der Grade 1 und 2 kaum Veränderungen der Sehschärfe (Visus) beobachtet werden. Bei Grad 3 zeigt sich eine choroidale Atrophie, welche bei deutlichen Funktionseinschränkungen

vereinzelt mit dem Ausfall des zentralen Gesichtsfeldes (Skotom) einhergeht (Abbildung 7). Entgegen ersten Vermutungen konnte gezeigt werden, dass diese Erkrankung keinen, allenfalls einen stark abgeschwächten, progressiven Verlauf nimmt (SMALL 1989; SMALL *et al.* 1991). Dies bedeutet, dass sich die oft bereits vor dem ersten Lebensjahr manifestierenden Erscheinungsformen der NCMD mit fortschreitendem Alter kaum verändern. Die Werte der elektrophysiologischen Untersuchungen, ERG und EOG, bleiben im Normbereich. Gleiches gilt für den Farbsinn, die Dunkeladaptation und das periphere Gesichtsfeld (SCHWORM *et al.* 1998). Eine ähnliche klinische Variabilität wie bei NCMD zeigt sich auch bei der zunächst als eigenständige Entität beschriebenen „zentral areolären Pigmentepitheldystrophie“ (CAPED) (FETKENHOUR *et al.* 1976). Spätere Untersuchungen konnten zeigen, dass CAPED in einem separaten Zweig gleicher Abstammung der ursprünglichen, sehr großen NCMD-Familie auftrat (SMALL *et al.* 1992a). Damit liegt der Schluss nahe, dass CAPED und NCMD, trotz Unterschieden im klinischen Erscheinungsbild, einer gemeinsamen nosologischen Entität entsprechen und daher allelische Erkrankungen darstellen.

**Abb. 7: North Carolina Makuladystrophie.**

Die Fundusaufnahme des rechten Auges eines NCMD-Patienten, zeigt einen durch Atrophie entstandenen Krater im Bereich der Makula (aus STONE & SHEFFIELD 1994).



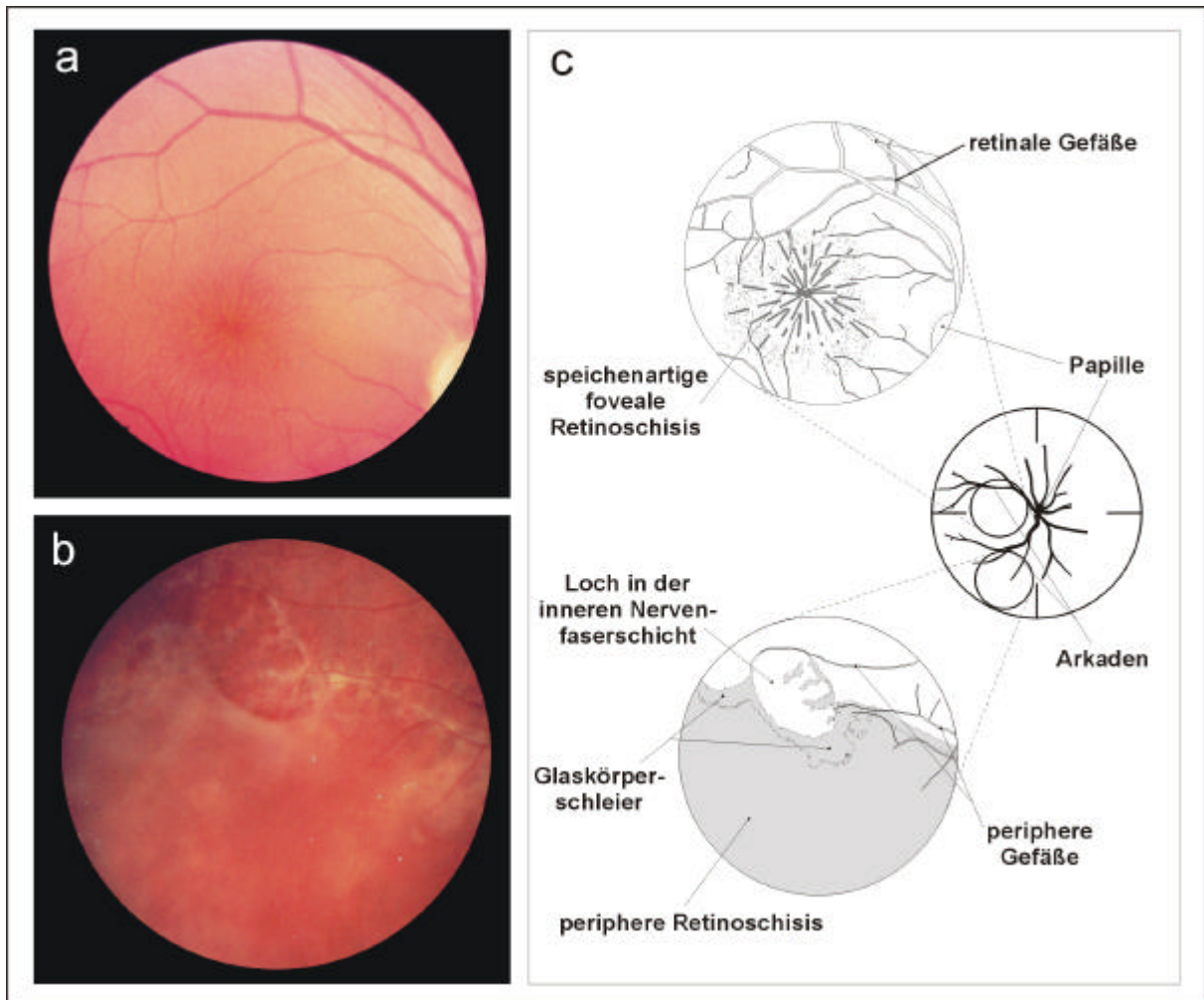
*Genetik*

Die NCMD folgt einem autosomal-dominanten Vererbungsmuster. Mit Hilfe von Kopplungsanalysen wurde der Genlocus zunächst dem langen Arm von Chromosom 6, im Bereich 6q13-q21 zugeordnet (SMALL *et al.* 1992b). Später konnte in einem überlappenden Bereich zu dieser chromosomalen Region eine weitere Makuladegeneration lokalisiert werden, die „progressive bifokale chorioretinale Atrophie“ (PBCRA) (KELSELL *et al.* 1995). Ob PBCRA, ähnlich wie CAPED, eine allelische Form von NCMD ist, konnte bislang noch nicht geklärt werden. Mit Hilfe weiterer Familien wurde der als MCDR1 (MC=macular, D=dystrophy, R=retinal, 1=1<sup>st</sup> macular degeneration genetically mapped) bezeichnete Locus, auf einen 7,2 cM großen Bereich zwischen den DNA-Markern D6S424 und D6S1671, im chromosomalen Bereich 6q14-q16.2 lokalisiert (SMALL *et al.* 1997). Für eine Klonierung des MCDR1-Gens mit den Mitteln der Positionsklonierung, muss der Genlocus jedoch zunächst weiter verfeinert werden.

## **X-gebundene juvenile Retinoschisis**

### *Klinik*

Die X-gebundene juvenile Retinoschisis (RS) ist die häufigste Ursache für eine erbliche Visusminderung bei Jungen im Kindesalter. Weibliche Überträgerinnen der Erkrankung sind klinisch nicht betroffen. RS wurde bereits vor über 100 Jahren erstmals beschrieben (HAAS 1898). Erste Symptome der Retinoschisis entwickeln sich sehr früh und könnten bereits zum Zeitpunkt der Geburt vorhanden sein (DEUTMANN 1977; KAWANO *et al.* 1981). Ein gemeinsames Merkmal aller betroffenen Individuen ist eine foveale, radspeichenartige Schisis, die sich histologisch als eine zystische Veränderung auf der Ebene der Nervenfaserschicht erkennen lässt (Abbildung 8a, c). Ansonsten zeigt sich eine sehr große Variabilität des Phänotyps. Bei etwa der Hälfte der Patienten findet man zusätzlich eine bilateral auftretende Spaltung der peripheren Retina (Abbildung 8b, c). Eine Folge dieser Spaltung ist die Bildung von Blasen, aus denen Löcher bzw. Risse entstehen können. Wenn dabei Blutgefäße verletzt werden, kommt es zu Blutungen in den Glaskörper des Auges. Gelegentlich wird eine Abhebung der Netzhaut beobachtet, von der in schweren Fällen die gesamte Retina betroffen ist (KELLNER *et al.* 1990; GEORGE *et al.* 1996). Ebenfalls sehr früh beginnt eine Verminderung der Sehschärfe, wobei das Ausmaß ein sehr weites Spektrum umfasst. Einige der RS-Patienten können dabei in der fünften oder sechsten Lebensdekade erblinden (FORSIUS *et al.* 1973). Ein wichtiges diagnostisches Hilfsmittel bei RS ist das ERG. Bei photopischem Auge kommt es bei den Betroffenen zum nahezu vollständigen Verlust der b-Welle. Als Ursache hierfür wird ein Defekt in den Müller-Zellen vermutet. (DEUTMANN 1977; MILLER & DOWLING 1970; REICHENBACH & ROBINSON 1995). Darüber hinaus besitzen RS-Patienten eine anormale suppressive Stäbchen-Zapfen-Interaktion, welche vermutlich auf einem postsynaptischen *feedback*-Mechanismus zwischen den Stäbchen, den Zapfen und den Horizontalzellen der Retina beruht und den einzigen diagnostischen Nachweis für weibliche Überträgerinnen darstellen könnte (ARDEN *et al.* 1988). Da Müller-Zellen auch an der Ausbildung von Neuriten und neuronalen Verknüpfungen beteiligt sind (SHEFFIELD & LI 1987; KLJAVIN & REH 1991), könnte die fehlerhafte Ausbildung neuronaler Verbindungen und die damit verbundenen Veränderungen in der Nervenfaserschicht, eine indirekte Folge eines Defekts der Müller-Zellen sein (ARDEN *et al.* 1988). Dies würde bedeuten, dass die RS eher auf einer fehlerhaften Entwicklung der Retina, als auf einem degenerativen Prozess beruht (ARDEN *et al.* 1988).



**Abb. 8 Fundusaufnahmen des rechten Auges eines elfjährigen RS-Patienten.**

**a**, foveale Retinoschisis mit charakteristischer radspeichenartiger Struktur im Bereich der Makula.

**b**, ausgeprägte periphere Retinoschisis mit einem großen Loch in der inneren Nervenfaserschicht und Glaskörperschleier. **c**, schematische Darstellung der in **a** und **b** gezeigten Fundusaufnahmen; Bezeichnung der klinischen Läsionen; Lokalisierung der Aufnahmen in der Retina (aus SAUER *et al.* 1997).

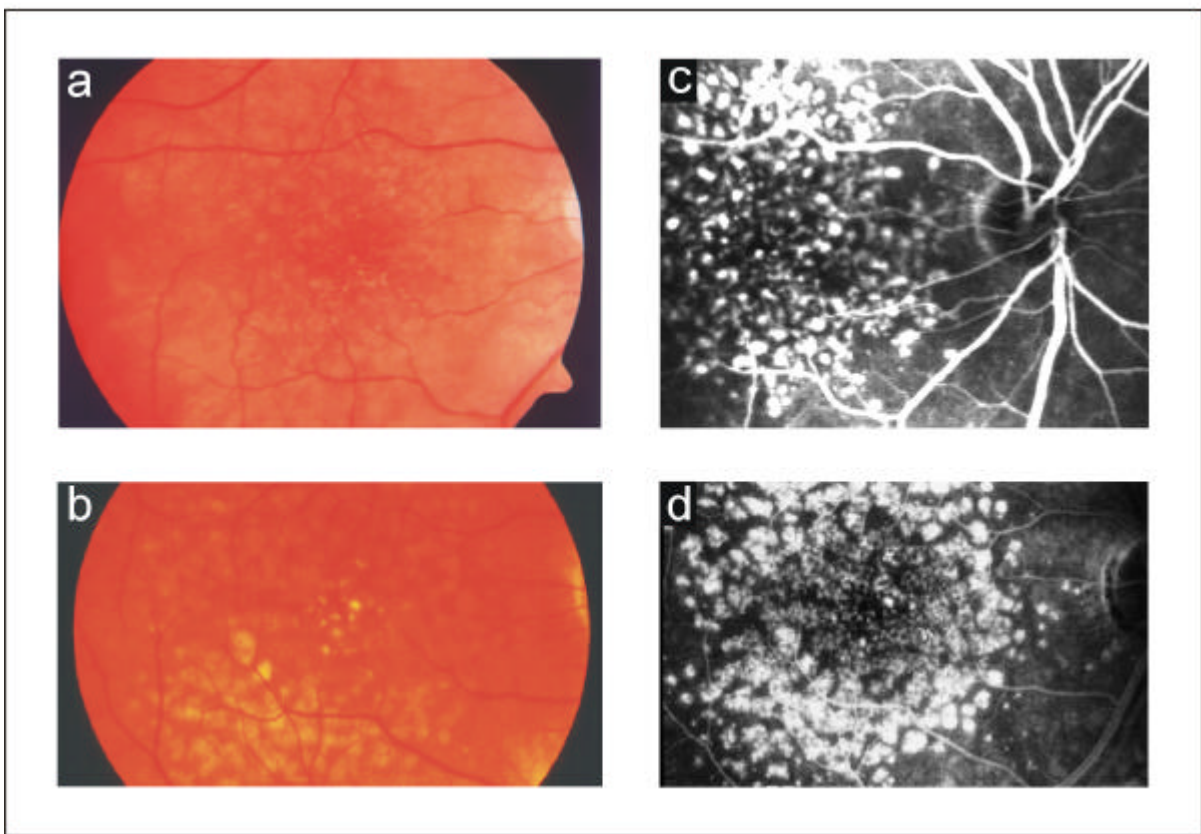
### Genetik

Eine ganze Reihe von Kopplungsanalysen kartierten den RS-Lokus auf den distalen kurzen Arm des X Chromosoms, in den Bereich Xp22 und zeigten so die genetische Homogenität der Erkrankung (IVES *et al.* 1970; WIEACKER *et al.* 1983; ALITALO *et al.* 1987; WEBER *et al.* 1995). Durch weitere Analysen konnte die kritische Region auf etwa 1 Mb eingengt werden (VAN DE VOSSE *et al.* 1996; HUOPANIEMI *et al.* 1997). Als flankierende Marker wurden auf der distalen Seite DXS418 und auf der proximalen Seite DXS999/DXS7161 bestimmt. Für diesen Bereich existierten bereits mehrere YAC-*contigs* (VAN DE VOSSE *et al.* 1996; HUOPANIEMI *et al.* 1997; ALITALO *et al.* 1995; FERRERO *et al.* 1995; WALPOLE *et al.* 1997). Damit waren gute Voraussetzungen geschaffen, um das krankheitsverursachende Gen für die X-gebundene juvenile Retinoschisis mittels der positionellen Klonierungsstrategie zu isolieren.

## Radiäre Drusen

### Klinik

Das gemeinsame charakteristische Merkmal einer Reihe chorioretinaler Erkrankungen ist das Auftreten kleiner, runder, weißlich-gelber, Flecken im Bereich der Makula und der Papille (Abbildung 9). Bei diesen als Drusen bezeichneten Strukturen, handelt es sich um Ablagerungen aus extrazellulärem Material zwischen dem RPE und der Bruchschen Membran. Die sehr variable Erscheinungsform der Drusen bezüglich Größe, Form und Verteilung hat zu einer Vielzahl mehr oder weniger gebräuchlicher Bezeichnungen dieses Krankheitsbildes geführt. Dazu zählen z.B. die Hutchinson-Tay Choroiditis (HUTCHINSON & TAY 1875), die Holthouse-Batten Chorioretinitis (HOLTHOUSE & BATTEN 1897), die Doynesche Honigwabenglykogen Dystrophie (DOYNE 1899), die Malattia Leventinese (MLVT) (VOGT 1925; KLAINGUTI 1932) oder die kristalline retinale Degeneration (DEUTMAN & JANSEN 1970). Mittlerweile werden meistens die Begriffe „Doynesche Honigwabenglykogen Dystrophie“ (DHRD), „dominante Drusen“ oder „radiäre Drusen“ verwendet, da man davon ausgeht, dass all diese Erkrankungen eine gemeinsame Ätiologie besitzen (FORNI & BABEL 1962; DEUTMAN & JANSEN 1970; GASS 1987; PIGUET *et al.* 1995).



**Abb. 9: Fundusaufnahmen von Patienten mit radiären Drusen**

Funduskopische Aufnahmen des rechten Auges **a**, einer 44-jährigen und einer **b**, 57-jährigen Patientin mit radiären Drusen. Die fluoreszenzangiographischen Aufnahmen **c** und **d** zeigen deutlich die radiäre Anordnung der Drusen um den Bereich der Makula (aus SAUER *et al.* 2001).



Der autosomal dominante Vererbungsmodus wurde bereits 1899 von Robert W. Doyme beschrieben (DOYNE 1899). Bei voller Penetranz, ist der Verlauf der Erkrankung nur schwach progressiv. Wie bei anderen Makuladegenerationen sind die phänotypischen Erscheinungsformen der DHRD sehr variabel und können in drei verschiedene Kategorien eingeteilt werden (EVANS *et al.* 1997). Bei der leichten Form findet man bei normalem Visus, nur wenige diskrete kleine Drusen, die radiär um den Bereich der Makula angeordnet sind. In der mittleren Kategorie zeigt sich bereits eine leichte Verminderung der Sehschärfe, sowie zusätzlich zu den kleinen makulären Drusen, große drusenoide Ablagerungen im Bereich der Papille. Die schwere Verlaufsform ist durch eine starke Visusminderung, sowie Drusen im Bereich einer abnormal pigmentierten Makula gekennzeichnet. Zudem kommt es in einigen Fällen zu einer Atrophie im Bereich der Makula und choroidaler Neovaskularisation. Ähnliche pathologische Merkmale finden sich auch bei der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) (siehe unten). Die Manifestation der Erkrankung beginnt bei der DHRD jedoch zwischen dem zwanzigsten und vierzigsten Lebensjahr, also deutlich früher als bei der AMD. Trotzdem hofft man, mit der Aufklärung der genetischen Ursachen bei der DHRD wichtige Informationen über den Pathomechanismus der AMD gewinnen zu können (HOLZ *et al.* 1997).

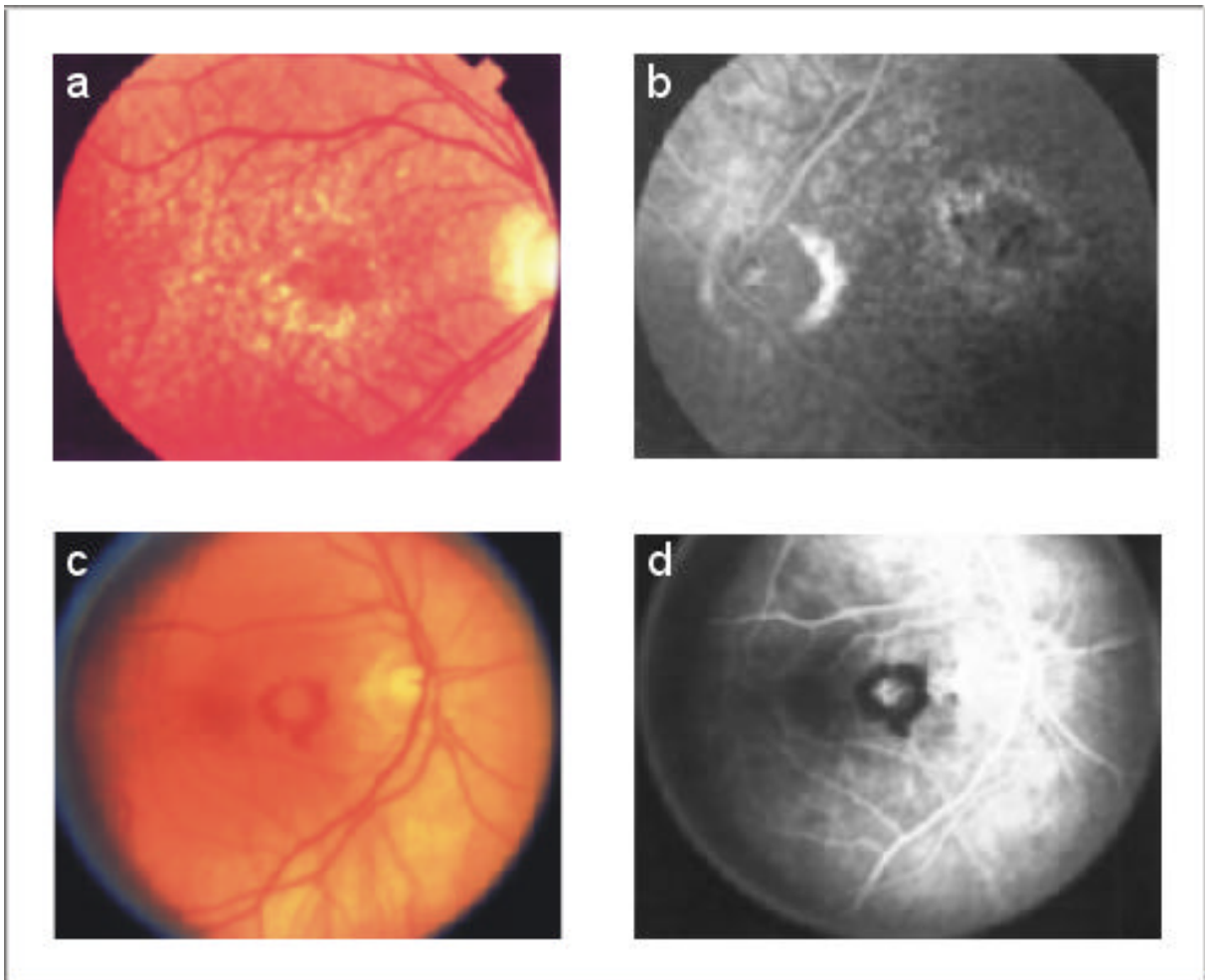
### *Genetik*

Kopplungsanalysen in vier Malattia Leventinese (MLVT) Familien kartierten das Krankheitsgen auf den kurzen Arm von Chromosom 2, im Bereich 2p16-21 (HEON *et al.* 1996). Der 14 cM große Bereich wird von den polymorphen DNA-Markern D2S1761 distal und D2S444 proximal flankiert. Genetische Kopplungsanalysen in einer großen DHRD-Familie kartierten das krankheitsverursachende Gen in einen 5 cM Abschnitt, der innerhalb des kritischen Bereichs für MLVT liegt. Als flankierende Marker wurden distal D2S2316 und proximal D2S378 identifiziert. Damit konnte die Vermutung, dass DHRD und MLVT identische nosologische Entitäten darstellen, untermauert werden (GREGORY *et al.* 1996). Mit Hilfe einer weiteren großen MLVT-Familie wurde der DNA-Marker D2S378 als proximale Grenze bestätigt (EDWARDS *et al.* 1998). Als flankierender Marker auf der distalen Seite wurde in dieser Familie D2S2227 bestimmt. Eine weitere Einengung der Kandidatenregion gelang mit Hilfe zweier neuer, betroffener Mitglieder der ursprünglichen DHRD-Familie (KERMANI *et al.* 1999). Als neue Grenzen der Kandidatenregion wurden die Marker D2S2352 distal und D2S2251 proximal gefunden. Der genetische Abstand betrug damit nur noch 1 cM. Basierend auf einem YAC-*contig* wurde die physikalische Größe der Region auf 700 kb geschätzt. Somit waren sehr gute Bedingungen für eine Identifizierung des Krankheitsgens mit den Mitteln der Positionsklonierung geschaffen.

### 3.2 Altersbedingte Makuladegeneration

#### *Klinik*

Die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) ist die häufigste Ursache für eine fortschreitende Sehbehinderung bei Menschen über 65 Jahre (HYMAN 1987; EVANS & WORMWALD 1996). Aufgrund zunehmender demographischer Verschiebungen der Altersstrukturen in den westlichen Industrienationen, erlangt die AMD eine immer stärker werdende sozioökonomische Bedeutung. Ungeachtet dessen gibt es bisher keine erfolgreichen Therapiemöglichkeiten, zumal die zugrundeliegenden Pathomechanismen bislang nicht bzw. nur sehr unzureichend verstanden werden. Die AMD zeigt bereits zu Beginn ihrer Manifestation ein sehr variables phänotypisches Erscheinungsbild (GREEN & KEY 1977). Das Vorkommen von gelblichweißen Ablagerungen, sogenannten „Drusen“, stellt einen der frühesten Befunde dar.



**Abb. 10: Fundusaufnahmen verschiedener Erscheinungsformen der AMD**

**a**, „trockene“ AMD mit Drusen und RPE-Atrophie. **b**, fluoreszenzangiographische Aufnahme einer „trockenen“ AMD. Helle hyperfluoreszierende Bereiche zeigen RPE-Atrophie. **c**, „nasse“ AMD mit hämorrhagischer Ablösung des RPE im Bereich der Makula. **d**, fluoreszenzangiographische Aufnahme zu **c** zeigt eine starke Hyperfluoreszenz infolge choroidaler Neovaskularisation (aus CAVALLERANO 1997).



Fortgeschrittene Stadien der AMD werden häufig in zwei Subklassen unterteilt. Bei der Mehrzahl der betroffenen Personen findet man die sogenannte „trockene“ Form der AMD (Abbildung 10a, b). Dabei handelt es sich um eine geographische Atrophie (GA) des RPE im Bereich der Makula, mit daraus resultierendem Abbau der assoziierten Photorezeptoren. Inwieweit hierbei apoptotische Vorgänge eine Rolle spielen, ist bislang unbekannt (ADLER *et al.* 1999). Da die *Fovea centralis* erst relativ spät von den atrophischen Prozessen betroffen ist, tritt ein Visusverlust i.d.R. erst im Endstadium einer GA auf (SUNNESS 1999). Die als „nasse“ Form bezeichnete Ausprägung der AMD wird auch als choroidale Neovaskularisation (CNV) bezeichnet (Abbildung 10c, d). Durch aberrante Angiogenese entstehen dabei im Bereich der Choroidea fragile Gefäße, die oft bluten. Dadurch kann eine seröse bzw. hämorrhagische Ablösung des RPE entstehen, welche schließlich zur Bildung einer disciformen Narbe führt (BRESSLER *et al.* 1988). Bei einer CNV tritt aufgrund der Blutungen ein Visusverlust oft sehr rasch ein. Interessanterweise können beide Formen der AMD beim gleichen Patienten auftreten, wobei in einem Auge eine GA und im anderen Auge eine CNV vorliegen kann. Augen mit GA entwickeln allerdings zusätzlich recht häufig eine CNV (SUNNES *et al.* 1999).

### Genetik

Die AMD zählt, ähnlich wie z.B. die Alzheimer-Erkrankung, Diabetes, Asthma oder Krebs, zu den komplexen Erkrankungen. Die Pathogenese der AMD wird von einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst. Dazu zählen zum einen Umwelt- bzw. physiologische Faktoren wie z.B. Bluthochdruck (KLEIN *et al.* 1997), Zigarettenrauch (SEDDON *et al.* 1996, CHRISTEN *et al.* 1996), Sonnenlicht (DARZINS *et al.* 1997) und Ernährungsweise (SEDDON *et al.* 1994, MARLES-PERLMAN *et al.* 1995). Andererseits scheinen genetische Faktoren entscheidend für eine Prädisposition zur AMD zu sein (KLEIN *et al.* 1994, SEDDON *et al.* 1997, KLAVER *et al.* 1998a). Die Identifizierung einer oder mehrerer genetischer Komponenten wird jedoch v.a. durch das sehr späte Auftreten der Symptome erschwert. So sind die Eltern einer betroffenen Person zum Zeitpunkt der Diagnose oft bereits verstorben und evtl. vorhandene Kinder noch zu jung um die klinischen Symptome der AMD zu manifestieren. Die Anwendung der Methoden der Positionsklonierung, v.a. von Kopplungsanalysen, wird somit erschwert bis unmöglich. In einer Studie konnte mit Hilfe einer großen, zwei Generationen umfassenden, AMD-Familie, ein Genlokus auf dem langen Arm von Chromosom 1, im Bereich 1q25-q31, zwischen den Markern D1S466 and D1S413, lokalisiert werden (KLEIN *et al.* 1998). Dieser Lokus konnte bisher jedoch mit keiner weiteren Familie bestätigt werden. Möglicherweise liegt dem besonderen Phänotypen dieser Familie ein einziges Gen zugrunde, welches ausschließlich mit dieser seltenen Erscheinungsform der Erkrankung assoziiert ist. In einer weiteren Studie wurde ebenfalls versucht, durch genomweite Kopplungsanalysen mögliche Kandidatenlozi für die AMD zu identifizieren (WEEKS *et al.* 2000). Dabei konnten zwei mögliche Kandidatenregionen gefunden werden.

Eine liegt auf dem langen Arm von Chromosom 10 im Bereich des DNA-Markers D10S1236. Eine weitere auf dem langen Arm von Chromosom 5, in der Nähe des polymorphen DNA-Markers D5S1480. Inwieweit die identifizierten Lozi jedoch tatsächlich mit der AMD assoziiert sind, bleibt abzuwarten, zumal die gefundenen Kopplungsdaten eine nur schwache Signifikanz aufwiesen.

Eine alternative Vorgehensweise bieten allelische Assoziationsstudien. Dabei versucht man in sog. Fall-Kontroll-Studien, eine statistische Assoziation zwischen der Erkrankung und einem Markergenotyp, z.B. einem SNP (*single nucleotide polymorphism*) in einem Kandidatengen, nachzuweisen. Um mit dieser Methode aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, gilt es einige wichtige Punkte zu beachten (ALLIKMETS 1999). Als besonders kritisch hat sich die Wahl geeigneter Kontrollpersonen erwiesen. Diese sollten aus der gleichen genetischen Subpopulation wie die Patienten stammen. Zusätzlich sollten sowohl die Patienten, als auch die Kontrollen nach den gleichen diagnostischen Kriterien beurteilt werden. Sehr wichtig ist zudem eine möglichst hohe Individuenzahl in beiden Gruppen. Um die Probleme, die hierbei entstehen können, zu überwinden, wurden Methoden wie der *transmission disequilibrium test* (TDT) entwickelt (SPIELMANN *et al.* 1993). Die Anwendung dieser Form von Assoziationsstudien erweist sich bei der Untersuchung der AMD jedoch als äußerst schwierig, da hierzu, ähnlich wie bei den Kopplungsanalysen, die Eltern der betroffenen Personen benötigt werden. Dennoch konnte kürzlich eine Assoziation zwischen dem Apolipoprotein E und AMD gefunden werden (SOUIED *et al.* 1998; KLAVER *et al.* 1998b). Dabei wurde gezeigt, dass eine reduzierte Prävalenz des  $\epsilon$ 4-Allels bei Patienten mit der „nassen“ Form der AMD, im Vergleich mit der Kontrollgruppe, besteht. Eine neuere Studie sieht diese Assoziation jedoch auf jüngere familiäre AMD-Fälle beschränkt (SCHMIDT *et al.* 2000).

Ein weiterer vielversprechender Ansatz ergibt sich aufgrund der phänotypischen Übereinstimmungen vieler hereditärer juveniler Makuladegenerationen mit der AMD. Zum einen erhofft man sich von der Aufklärung der Pathomechanismen monogenischer Makuladegenerationen einen Beitrag für das Verständnis der grundlegenden biochemischen Vorgänge bei diesen retinalen Erkrankungen (WEBER 1997). Andererseits könnten die krankheitsassoziierten Gene der monogenischen Erkrankungen auch direkt in die Pathogenese der AMD involviert sein. Daher wurden bereits einige dieser Gene bei AMD-Patienten analysiert.

Der Gewebshemmer der Metalloproteinasen3 (*TIMP3, tissue inhibitor of metalloproteinases 3*) ist bei Patienten mit der Sorsby Fundus Dystrophie (SFD) mutiert (WEBER *et al.* 1994). In den Spätstadien dieser autosomal dominanten Erkrankung kommt es, analog zur nassen Form der AMD, zu subretinaler Neovaskularisation mit anschließenden Blutungen und

Ausbildung einer disciformen Narbe (SORSBY *et al.* 1949). Bei Mutationsanalysen in AMD-Patienten wurden jedoch keine Veränderungen im TIMP3-Gen gefunden (FELBOR *et al.* 1997). Damit konnte *TIMP3* als potentielles Kandidatengen für die AMD ausgeschlossen werden (DE LA PAZ *et al.* 1997).

Mutationen im *Peripherin/RDS*-Gen wurden in unterschiedlichen Netzhautdegenerationen, mit klinischen Übereinstimmungen zur AMD, identifiziert (zusammengefasst in KOHL *et al.* 1998). Das Peripherin/RDS-Protein ist an der Morphogenese und an der Aufrechterhaltung der Integrität der äußeren Segmente der Photorezeptoren beteiligt. Bei einer Mutationsanalyse des *Peripherin/RDS*-Gens in 50 AMD-Patienten konnten keine signifikanten Sequenzveränderungen gefunden werden (SILVESTRI 1997).

Das Endstadium des Morbus Best ist durch RPE-Atrophie, makuläre Narbenbildung und Neovaskularisation gekennzeichnet und besitzt damit phänotypische Parallelen zur AMD. Die Analyse des *VMD2*-Gens in insgesamt über 450 AMD-Patienten ergab jedoch keinen Zusammenhang zwischen diesem Gen und der AMD (ALLIKMETS *et al.* 1999; KRÄMER *et al.* 2000).

Auch der Morbus Stargardt zeigt phänotypische Ähnlichkeiten zur AMD. Besonders in den späteren Stadien der Erkrankung finden sich ausgeprägte Pigmentepitheldefekte oder eine geographische Atrophie (KELLNER 1997). Mehrere unabhängig voneinander durchgeführte Mutationsanalysen des *ABCA4*-Gens kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Während in einer ersten Studie bei 16% der AMD-Patienten heterozygote Veränderungen gefunden wurden (ALLIKMETS *et al.* 1997b), ergaben andere Mutationsanalysen keinen signifikanten Zusammenhang zwischen *ABCA4* und der AMD (STONE *et al.* 1998; DE LA PAZ *et al.* 1999, RIVERA *et al.* 2000). In einer großen Studie wurden über 1.200 AMD-Patienten und über 1.250 Kontrollpersonen auf das Vorkommen zweier häufiger Sequenzveränderungen, G1961E und D2177N, untersucht (ALLIKMETS & THE INTERNATIONAL ABCR SCREENING CONSORTIUM 2000). Dabei konnte gezeigt werden, dass diese Variationen signifikant häufiger in AMD-Patienten auftreten. Um die tatsächliche Rolle des *ABCA4*-Gens bei der Prädisposition zur AMD zu klären, bedarf es sicherlich weiterer Studien mit größeren Patienten- und Kontrollkollektiven.

#### 4. Zielsetzungen

In der vorliegenden Arbeit sollten die verschiedenen Schritte der Positionsklonierung angewandt werden, um einen Beitrag zur Isolierung der genetischen Faktoren einer Reihe monogenetischer Makuladegenerationen zu leisten.

Umfassende Kopplungsanalysen in drei deutschen NCMD Familien sollten durchgeführt werden, um eine mögliche Assoziation zum MCDR1-Lokus auf dem chromosomalen Abschnitt 6q13q21 nachzuweisen. Während zwei Familien das klinische Bild der NCMD aufweisen, zeigt eine Familie den CAPED-Phänotyp. Als Ziel dieser Untersuchungen sollte der genetische Bereich des MCDR1-Gens weiter eingengt werden, um damit den Grundstein für die Isolierung des krankheitsverursachenden Genes zu legen.

Mit der Generierung genomischer Klon-*contigs* sollten die genetischen Kandidatenregionen der RS und der DHRD physikalisch kloniert werden. Das Ziel war die Umwandlung der bereits vorhandenen YAC-*contigs* der 1 Mb bzw. 700 kb großen, minimalen Kandidatenregionen in PAC-*contigs*, die dann wiederum der Sequenzierung und der computergestützten Analyse zur Verfügung gestellt werden konnten. Zudem sollten Transkriptkarten dieser Bereiche die Erfassung potentieller Kandidatengene ermöglichen. Hierzu wurde zunächst ein Expressionsprofil dieser Transkripte erstellt. Anschließend sollten die biologisch relevanten Gene vollständig kloniert werden. Mit der Aufklärung ihrer genomischen Struktur sollten schließlich die Voraussetzungen für die Durchführung von Mutationsanalysen geschaffen werden.

Mit Hilfe von Mutationsanalysen sollte eine mögliche Beteiligung solcher Gene bei der RS bzw. DHRD aufgeklärt werden. Inwieweit solche Gene auch in die Pathogenese der AMD involviert sind, sollte die Untersuchung einer großen Zahl von AMD-Patienten und entsprechender Kontrollpersonen zeigen.

Um einen ersten Einblick in die Funktion isolierter Gene zu erhalten, sollte deren zeitliches und räumliches Expressionsprofil erstellt werden. Dazu sollten, mit Hilfe der RT-PCR, verschiedenen Entwicklungsstadien des Mausauges, sowie unterschiedliche Mausstämmen mit diskreten Retinadefekten untersucht werden. Zur Aufklärung der Expression auf zellulärer Ebene sollten RNA *in situ*-Hybridisierungen an Augenschnitten von Mäusen durchgeführt werden. Mögliche Interaktionen zwischen verschiedenen Genprodukten sollten mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybridsystems untersucht werden.

### III. Methoden

#### 1. Patienten und klinische Daten

Für die genetischen Untersuchungen der verschiedenen Makuladegenerationen stehen jeweils mehrere Familien oder Einzelpersonen zur Verfügung, bei denen mit Hilfe umfassender ophthalmologischer Untersuchungen die jeweils spezifische Makuladegeneration diagnostiziert wurde.

Die Einengung des MCDR1-Lokus erfolgt mit Hilfe zweier NCMD-Familien (L) (PAULEIKHOFF *et al.* 1997) und (A) (SCHWORM *et al.* 1998) und einer CAPEDE-Familie (W) (KÄSMANN *et al.* 1992) mit jeweils drei Generationen (Abbildung 15). Die ophthalmologischen Untersuchungen, Diagnosen und Blutentnahmen wurden im St. Franziskus-Hospital, Münster (Fam. L), in den Augenkliniken der Universität München (A) und Heidelberg (W) durchgeführt. Für die Analysen stehen von Familie L 11 betroffene und 7 nicht-betroffene Individuen zur Verfügung. Familie A besteht aus 9 betroffenen und 6 nicht-betroffenen Familienmitgliedern. Bei Familie W zeigen 6 Personen den Krankheitsphänotypen während eine Person symptomfrei ist.

Untersuchungen zur X-gebundenen juvenilen Retinoschisis werden mit Hilfe mehrerer betroffener und nicht-betroffener Personen aus 9 verschiedenen Familien aus Kanada (A, B, D, E, F und G) und Deutschland (Gr, 10 und 26) durchgeführt. Detaillierte klinische Beschreibungen der Familien A und B finden sich bei EWING & IVES 1970. Die betroffenen Mitglieder der anderen Familien wurden mit Hilfe von Sehschärfetests, sowie direkter und indirekter Ophthalmoskopie untersucht.

Für die Untersuchungen von DHRD und MLVT stehen zwei MLVT-Familien und ein Zweig einer DHRD-Familie zur Verfügung (Abbildung 33). Die klinischen Daten der beiden MLVT-Familien (B und D), sowie die der DHRD-Familie (A1) wurden bereits beschrieben (HÉON *et al.* 1996; GREGORY *et al.* 1996). Von der größeren (B) der beiden MLVT-Familien steht genomische DNA von 11 betroffenen und 8 nicht-betroffenen Personen zur Verfügung. Bei der kleineren MLVT-Familie (D) kann auf die DNA von 7 erkrankten und 3 gesunden Individuen zurückgegriffen werden. Der verfügbare Zweig der DHRD-Familie (A1) besteht aus 3 erkrankten und 2 nicht-betroffenen Personen.

Die Untersuchung der sporadischen radiären Drusen kann mit Hilfe der genomischen DNA von 14 erkrankten Individuen erfolgen. Die ophthalmologischen Untersuchungen wurden an verschiedenen Augenkliniken in Deutschland und Kanada durchgeführt und umfassten die Bestimmung der Sehschärfe, Ophthalmoskopie und in den meisten Fällen Fluoreszenzangiographie und Elektroretinographie (Tabelle 2).

**Tab. 2: Klinische Befunde bei 14 Patienten mit sporadischen radiären Drusen.**

Patient	Alter bei der Untersuchung	Visus <sup>a)</sup> OD <sup>b)</sup> / OS <sup>c)</sup>	Klinische Befunde	familiärer Hintergrund
4	42	1,0 / 1,0	kleinere Gesichtsfeldausfälle; kleine noduläre perifoveale Drusen (>100); keine elektrophysiologische Untersuchung durchgeführt	Eltern mit unauffälligem Fundus
7	27	1,0 / 1,0	beidseitig multiple Drusen mit Defekten im RPE, keine Metamorphopsie; keine elektrophysiologische Untersuchung durchgeführt	negativ
8	33	1,0 / 1,0	Gesichtsfeldausfälle; harte Drusen temporal zur Fovea, stark autofluoreszierend, RPE Schäden; keine elektrophysiologische Untersuchung durchgeführt	negativ
9	44	0,7 / 0,8	multiple, teilweise konfluente Drusen über den gesamten hinteren Augenpol; keine elektrophysiologische Untersuchung durchgeführt	negativ
10	37	1,0 / 0,2	multiple Drusen am hinteren Pol; leichte Reduzierung des ERGs	Mutter mit atrophischer AMD
12	54	0,25 / 0,7	multiple, distinkte Drusen am hinteren Pol, hyperfluoreszierend; RPE Defekte; Verlust der zentralen und parazentralen Amplitude im multifokalen ERG (OD>OS)	3 Geschwister mit unauffälligem Fundus
13	55	0,1 / 0,1	multiple Drusen, hyperfluoreszierend, RPE Defekte; Zentralskotome; Verlust der zentralen Amplitude im multifokalen ERG	negativ
14	44	1,0 / 1,0	„verschleierte“ Sicht; multiple Drusen; kleinere RPE Defekte (OD); keine elektrophysiologische Untersuchung durchgeführt	negativ
15	48	0,1 / 0,6	einzelne Drusen temporal zur Fovea, hyperfluoreszierend; disciforme Narbe (OD); okkulte neovaskuläre Membran (OS)	negativ
16	67	0,02 / 0,8	zahlreiche Drusen, hyperfluoreszierend; periphere RPE Defekte und Verklumpung; zentrale Narbe (OD); Zentralskotoma (OS)	negativ
18	38	1,0 / 1,0	Metamorphopsie (OS>OD); multiple Drusen am hinteren Augenpol, früh hyperfluoreszierend; keine elektrophysiologische Untersuchung durchgeführt	2 Geschwister mit unauffälligem Fundus
19	55	0,8 / 0,1	beidseitige Metamorphopsie; multiple subkonfluente Drusen bis in die Peripherie, hyperfluoreszierend; disciforme Narbe (OS); keine elektrophysiologische Untersuchung durchgeführt	negativ
20	46	0,4 / 1,2	konfluente makuläre RPE Atrophie, perizentrale und peripapilläre Honigwaben-artige RPE Atrophie mit multiplen Drusen; Zentralskotoma, teilweise relativ, teilweise absolut	negativ
22	57	0,8 / 0,6	multiple hyperfluoreszierende weiche Drusen am hinteren Pol; einige harte Drusen; Drusen nasal und in der mittleren Peripherie; leicht abnormes ERG; RPE Abnormalitäten in der Fovea	negativ

<sup>a)</sup> Die Beurteilung des Visus ergibt sich aus dem Quotienten des Ist- und Sollwertes bei dem ein bestimmtes Zeichen noch erkannt wird. Erkennt z.B. der Proband ein Zeichen aus einer Entfernung von 5 m, ein Normalsichtiger kann das Zeichen jedoch bereits aus 50 m Entfernung identifizieren, so ergibt sich für den Probanden ein Visuswert von 0,1. Diese Untersuchung wird für beide Augen getrennt durchgeführt.

<sup>b)</sup> OD (*oculus dexter*): rechtes Auge

<sup>c)</sup> OS (*oculus sinister*): linkes Auge

Um Patienten mit AMD aus der Untersuchungsgruppe auszuschließen, besteht diese nur aus Personen mit einem frühen, symmetrischen Erkrankungsbeginn an der Makula

und/oder nasal zur Papille. Das mittlere Alter zum Zeitpunkt der Untersuchung beträgt 46 Jahre, mit einem Bereich von 27 bis 67 Jahren. Das vorhandene weite phänotypische Spektrum reicht vom isolierten Auftreten von Drusen, bis hin zu weit fortgeschrittenen Schäden des RPE mit signifikantem Verlust des Sehvermögens (Tabelle 2).

Für die Analyse der AMD standen 198 betroffene Individuen mit einem Durchschnittsalter von 75,6 Jahren (Bereich von 55 bis 93 Jahre), sowie 101 nicht betroffene Kontrollpersonen mit einem Durchschnittsalter 79,2 Jahre (Bereich 48 bis 102 Jahre) zur Verfügung (KRÄMER *et al.* 2000). Die Gruppe der AMD Patienten repräsentiert das breite klinische Spektrum der Erkrankung und enthält 99 Individuen mit geographischer Atrophie und 99 Individuen mit dem klinischen Bild der „nassen“ AMD, wobei 54 eine choroidale Neovaskularisation (CNV) und 45 Patienten Pigmentepithel-Ablösungen (PED) zeigen. Alle AMD-Patienten und Kontrollen wurden entweder im St. Franziskus-Hospital, Münster oder in der Universitätsaugenklinik, Heidelberg untersucht. Die Kontrollgruppe setzt sich aus Personen zusammen, welche in den gleichen Kliniken wie die AMD Patienten, jedoch aus anderen Gründen, untersucht wurden.

## 2. Präparation von DNA

Die Präparation von DNA vollzieht sich in mehreren Arbeitsschritten. Diese umfassen Zellaufschluss oder Lyse, die Abtrennung makromolekularer, nichtlöslicher Zellkomponenten, die Deproteinisierung und Präzipitation der DNA, sowie die Entfernung unerwünschter Nukleinsäuren, wie z.B. RNA.

### 2.1 Isolierung humaner genomischer DNA aus Vollblut

Die Gewinnung genomischer DNA erfolgt aus 5-10 ml EDTA-Blut (nicht koaguliert). Dieses gibt man in ein 50 ml Falconröhrchen, füllt mit kaltem Lysispuffer auf das 4-fache Volumen auf und inkubiert 15-30 min auf Eis, wobei das Röhrchen mehrere Male invertiert wird. Durch Zentrifugation (2.000 UpM, 10 min, 4°C) werden die kernhaltigen Leukozyten präzipitiert. Der Überstand mit den lysierten Erythrozyten wird verworfen. Das Pellet wird in 5 ml Lysispuffer gelöst und wie oben zentrifugiert. Der Überstand wird erneut abgeschüttet und das Sediment in 5 ml SE-Puffer gelöst. Danach gibt man 250 µl SDS (20%) und 50 µl Pronase E (10 mg/ml) zu und inkubiert bei RT über Nacht bzw. 2-3 h bei 55°C. Dabei werden die kernhaltigen Zellen aufgebrochen, die DNA von Zellbestandteilen getrennt und assoziierte Proteine proteolytisch verdaut.

**Lysispuffer**      155 mM    NH<sub>4</sub>Cl  
                           10 mM    KHCO<sub>3</sub>  
                           0,1 mM    Na<sub>2</sub>EDTA

**SE-Puffer**            75 mM    NaCl  
                           25 mM    Na<sub>2</sub>EDTA

*pH 8,0 mit 10 N NaOH einstellen*

*pH 7,4 mit 1 M HCl einstellen*

### 2.1.1 Salzextraktion

Nach erfolgter Proteolyse wird die freigesetzte DNA durch Zugabe von NaCl von Proteinen gereinigt und mit Hilfe von Ethanol gefällt (MILLER *et al.* 1988). Hierzu versetzt man die DNA-Lösung mit 2,5 ml SE-Puffer und 2,1 ml gesättigter (ca. 6 M) NaCl-Lösung und mischt kräftig. Eine Ausflockung des zugesetzten SDS wird durch Erwärmung für 10 min bei 55°C verhindert. Durch Zentrifugation (4.000 UpM, 15 min, RT) werden Zelltrümmer und ausgefällte Proteine präzipitiert. Der klare Überstand wird in ein frisches Falconröhrchen überführt und die enthaltene DNA mit Hilfe von 2Vol EtOH (100%) gefällt. Mit einem sterilen Glashaken kann die DNA als weißes, gut sichtbares Knäuel aus der Lösung gefischt werden. Die DNA wird mit 70% EtOH gewaschen und 10-20 min luftgetrocknet. Anschließend wird die DNA in ein Kryoröhrchen mit 400-800 µl TE-Puffer überführt und über Nacht bei RT auf einem Heidolph-Schüttler gelöst.

**TE-Puffer**            10 mM    Tris-HCl, pH 8,0  
                              1 mM    Na<sub>2</sub>EDTA

### 2.1.2 Phenolextraktion und Ethanolfällung

Um die DNA möglichst vollständig von Proteinen zu reinigen, werden Phenol/Chloroform-Extraktionen durchgeführt. Dazu wird die DNA-Lösung mit 1 Vol eines Gemisches aus Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI) im Verhältnis 25:24:1 versetzt, kräftig gemischt und zur Phasentrennung zentrifugiert (3.000 UpM, 3 min, RT). Die obere wässrige Phase, welche die DNA enthält, wird in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die Extraktion wiederholt. Falls nötig, kann man zur Entfernung von Phenolresten aus der wässrigen Phase noch einmal mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) extrahieren. Die DNA-Lösung mischt man mit 0,1 Vol 3M NaOAc-Lösung (pH 5) und 2,5 Vol EtOH (100%). Da Alkalisalze von Nukleinsäuren aufgrund der ungenügenden Hydratisierung ihrer ionisierenden Phosphatgruppen in dieser nun 70% EtOH-Lösung unlöslich sind, kommt es zu einer Ausfällung. Um die DNA möglichst quantitativ zu präzipitieren wird für 15 bis 30 min bei -80°C inkubiert. Nach der Zentrifugation (14.000 UpM, 25 min, 4°C) wird das Pellet in 70% EtOH gewaschen und anschließend in der Speed Vac unter Vakuum getrocknet. Die DNA wird anschließend im gewünschten Volumen TE-Puffer aufgenommen.

## 2.2 Isolierung von genomischer DNA aus Gewebe

Zur Isolierung von DNA eignet sich Gewebe, welches frisch entnommen wurde, oder unmittelbar nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert



Nach Zugabe von 400 µl Lösung II mischt man vorsichtig. Die anfangs trübe Lösung, wird dabei durch die Lyse der Bakterien nahezu durchsichtig. Danach wird mit 300 µl 3M NaOAc (pH 5,5) versetzt, sehr vorsichtig gemischt und 20 min bei -20°C inkubiert. Nach Zentrifugation (12.000 UpM, 25 min, RT), überführt man den Überstand in ein frisches Gefäß und führt eine Phenolextraktion mit anschließender Ethanol-fällung durch. Das Präzipitat wird in 40 µl TE-Puffer mit RNase A (DNase-frei) (100 µg/ml) gelöst und 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Konzentration, wie in Abschnitt 2.4 beschrieben, bestimmt.

Eine Möglichkeit sehr schnell an qualitativ hochwertige Plasmid-DNA zu gelangen, stellt der Einsatz eines kommerziell erhältlichen Kits (QIAprep® Spin Plasmid Kit (Qiagen) oder NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel) dar. Diese beruhen auf einer modifizierten alkalischen Lyse und der Adsorption von DNA an Kieselsäure-Gel-Membranen in Gegenwart einer hohen Salzkonzentration (VOGELSTEIN & GILLESPIE 1979). Die Präparation erfolgt nach den Angaben des Herstellers.

**Lösung I**

50 mM	Glucose
25 mM	Tris-HCl, pH 8,0
10 mM	Na <sub>2</sub> EDTA, pH 8,0

**Lösung II**

0,2 N	NaOH
1%	SDS

*jeweils frisch ansetzen*

*sterilfiltrieren, bei 4°C lagern*

### 2.3.1.2 Halbpräparative Plasmid-Isolierung

Um eine größere Menge Plasmid-DNA zu erhalten, kann man die oben beschriebene Präparation auch in einem größeren Volumen durchführen. Die dabei verwendeten Lösungen entsprechen den obigen. Ausgehend von 30 ml LB-Medium (+ Antibiotikum) wird die Präparation mit dem 10-fachen Volumen der Lösungen durchgeführt. Die Zentrifugationsschritte erfolgen jeweils in der Sorvall-Zentrifuge. Nach der Phenolextraktion und Ethanol-fällung wird das Präzipitat in 200 µl TE-Puffer mit RNase A (DNase-frei) (100 µg/ml) gelöst, 15 min bei 37°C inkubiert und eine Konzentrationsbestimmung durchgeführt (siehe Abschnitt 2.4).

### 2.3.2 Halbpräparative Isolierung von P1/PAC-DNA

Der Bakteriophage P1 (pAd10SacBII; PIERCE *et al.* 1992) und das davon abgeleitete, künstlichen Chromosom (PAC, *P1-derived artificial chromosome*) pCYPAC2 (IOANNOU *et al.* 1994) stellen Vektorsysteme dar, welche DNA-Fragmente bis über 200 kb aufnehmen können. Die Präparation entspricht im wesentlichen der Plasmid-Isolierung. Aufgrund der Größe der DNA sollten die Lösungen nach der Bakterienlyse mit besonderer Vorsicht behandelt werden um eine Degradierung der DNA zu vermeiden. Ausgehend von einer Einzelkolonie werden 3 ml LB-Medium (+ 50 µg/ml Kanamycin) angeimpft und über Nacht

wurde. Zum verwendeten Gewebe gibt man 1 Vol Laird's Lysispuffer, sowie 0,1 Vol SDS (20%) und 0,1 Vol Protease. Nach Inkubation auf einem Rundschtüttler bei 50°C über Nacht werden die unverdauten Zellreste abzentrifugiert (13.000 UpM, 10 min, RT). Der Überstand wird in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 0,7 Vol Isopropanol gefällt. Bei einer ausreichend hohen DNA-Konzentration kann die DNA mit einem sterilen Glashaken direkt aus der Lösung gefischt werden. Fällt die DNA nicht direkt sichtbar aus, so zentrifugiert man diese ab (13.000 UpM, 10 min, RT). Die DNA wird mit 70% EtOH gewaschen, 10-20 min luftgetrocknet und anschließend im gewünschten Volumen TE-Puffer aufgenommen.

<b>Laird's Lysispuffer</b>	0,2 M	NaCl
	0,1 M	Tris-HCl, pH 8,3
	5 mM	Na <sub>2</sub> EDTA pH 8,0

## 2.3 Präparation rekombinanter DNA

Die Isolierung rekombinanter DNA erfordert eine vorausgehende Kultivierung der prokaryotischen Wirtszellen sowie die damit verbundene Amplifikation der Vektor-assoziierten rekombinanten DNA, welche nach der Lyse der Wirtszellen isoliert und aufgereinigt werden kann.

### 2.3.1 Isolierung von Plasmid/Cosmid-DNA aus *E. coli*

Plasmid-Vektoren eignen sich für die Vermehrung von DNA-Fragmenten bis zu einer Größe von ca. 10 kb. Das Einsetzen von *cos*-Sequenzen aus dem  $\lambda$ -Phagengenom in Plasmide ermöglicht die Klonierung von 30-50 kb rekombinanter DNA (COLLINS & HOHN 1978).

#### 2.3.1.1 Analytische Plasmid-Isolierung

Damit man Plasmid-DNA in ausreichender Menge erhalten kann, muss man sie zunächst in einer Bakterienkultur amplifizieren. Danach werden die Bakterien lysiert und die freigesetzte Plasmid-DNA für die weitere Verwendung gereinigt. Die Präparation erfolgt nach dem Prinzip der alkalischen Lyse von Bakterien (SAMBROOK *et al.* 1989). Mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers impft man mit einer einzelnen Bakterienkolonie 3ml LB-Medium (+ geeignetes Antibiotikum) an und inkubiert über Nacht bei 37°C auf dem Rundschtüttler (225 UpM). 850  $\mu$ l dieses Ansatzes werden zum Herstellen einer Glycerinkultur mit 150  $\mu$ l sterilem Glycerin vermischt und bei -80°C aufbewahrt. Den Rest der Bakteriensuspension pelletiert man in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß (9.000 UpM, 1 min, RT). Der Überstand wird verworfen. Das Bakterienpellet wird in 200  $\mu$ l Lösung I auf dem Vortex resuspendiert.

bei 37°C geschüttelt. Diese Übernachtskultur wird in 27 ml LB-Medium (+ 50 µg/ml Kanamycin) gegeben. Durch Zugabe von 300 µl 0,1 M IPTG und anschließender Inkubation auf dem Rundschüttler (225 UpM, 3-4 h, 37°C) wird ein lytisches *multicopy replicon* induziert, das unter der Kontrolle des lac-Promotors steht. Dieses erhöht die Kopienzahl der P1/PACs. Die weitere DNA-Präparation erfolgt wie in Abschnitt 2.3.1.2 beschrieben.

### 2.3.3 Halbpräparative Isolierung von $\lambda$ -Phagen-DNA

Die Verwendung des Bakteriophagen  $\lambda$  als Klonierungsvektor (z.B.  $\lambda$ gt10) ermöglicht die gezielte und hocheffiziente Einschleusung von Fremd-DNA in eine Bakterienzelle. Lambda Vektoren werden daher häufig für die Konstruktion von cDNA-Banken verwendet (siehe Abschnitt 10.1).

#### 2.3.3.1 Herstellung von Phagenlysaten

Mit Hilfe einer sterilen Pasteurpipette wird ein einzelnes Plaque aus einer LB-Agarose Platte ausgestochen und in 1 ml SM-Puffer gegeben. Nach Inkubation bei 4°C für mindestens 1 h werden mit 10-50 µl ( $\sim 5 \times 10^5$  pfu) des nun phagenhaltigen Überstandes 600 µl ( $\sim 10^9$  Zellen) Wirtszellen (z.B. y1090r) infiziert und für 20 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Anschließend gibt man 10 ml Topagar (48-50°C) hinzu, mischt sehr vorsichtig und gießt die Lösung auf eine LB-Agarose-Platte. Für 50 µg DNA werden etwa vier Platten benötigt. Nachdem der Topagar fest ist, werden die Platten bei 37°C über Nacht inkubiert bis der Bakterienrasen nur noch als dünnes Netz zu erkennen ist (konfluente Lyse). Auf jede Platte werden 10 ml SM-Puffer gegeben und unter leichtem Schwenken für 2-3 h bei RT inkubiert. Anschließend wird der Überstand mit einer sterilen Pasteurpipette abgenommen und in ein 50 ml Falconröhrchen gegeben. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform pro Platte wird kräftig gemischt und zur Phasentrennung und Sedimentation von Bakterienresten zentrifugiert (5.500 UpM, 10 min, 4°C). Die phagenhaltige wässrige Phase wird in frische Reaktionsgefäße überführt. Ein Aliquot dieses Lysats wird mit 0,3% Chloroform versetzt und kann so bei 4°C über mehrere Monate aufbewahrt werden.

<b>SM-Puffer</b>	5,8 g	NaCl
	2 g	MgSO <sub>4</sub>
	25 ml	1 M Tris-HCl, pH 7,5
	2,5 ml	2% Gelatine
	ad 1000 ml	ddH <sub>2</sub> O

#### 2.3.3.2 Lambda-DNA Isolierung

Zu dem Phagenlysats gibt man jeweils 5 µg/ml RNaseA und DNaseI und inkubiert im Wasserbad für 30 min bei 37°C. Anschließend wird 1 Vol eiskalter SM-Puffer mit 20% (w/v)

PEG und 2 M NaCl zugegeben und 1 h bei 0°C im Eiswasserbad inkubiert. Nach Zentrifugation (10.000 UpM, 20 min, 4°C) wird der Überstand vollständig abgenommen und die Bakteriophagenpartikel in 0,5 ml SM-Puffer resuspendiert. Im Anschluss an einen weiteren Zentrifugationsschritt (6.600 UpM, 2 min, 4°C) wird der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, 5 µl SDS (10%) und 5 µl EDTA (0,5 M, pH 8,0) zugegeben und 15 min bei 68°C inkubiert. Anschließend gibt man 1 Vol Phenol zu, mischt kräftig und zentrifugiert zur Phasentrennung. Die wässrige Phase wird in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und dieser Extraktionsschritt noch jeweils einmal mit Phenol-Chloroform (1:1) und Chloroform wiederholt. Durch Zugabe von 1 Vol Isopropanol für 20 min bei -80°C wird die DNA präzipitiert und dann abzentrifugiert (14.000 UpM, 15 min, 4°C). Das DNA-Pellet wird schließlich in 70% Ethanol gewaschen, kurz unter Vakuum getrocknet und in 50 µl TE gelöst.

Die  $\lambda$ -DNA kann ausgehend vom hergestellten Phagenlysat auch schneller und einfacher mit Hilfe des QIAGEN Lambda Midi Kit (Qiagen) isoliert werden. Die Präparation erfolgt dabei nach Anleitung des Herstellers.

### **2.3.4 Präparation von DNA aus Hefezellen**

Mit Hilfe künstlicher Hefechromosomen (YACs, *yeast artificial chromosomes*) können sehr große (mehrere 100 kb bis 2Mb) DNA-Fragmente kloniert werden (BURKE *et al.* 1987). Alle für eine stabile Chromosomenfunktion erforderlichen Sequenzelemente wie zwei Telomere, ein Centromer und eine autonom replizierende Sequenz (ARS) sind im Klonierungsvektor (z.B. pYAC4) enthalten. Durch das direkte Einschleusen des YACs in die Hefezellen (z.B. *S. cerevisiae*, Stamm AH109) kann dieses bei der Zellteilung an beide Tochterzellen weitergegeben werden. Die Verwendung von AHC-Medium ermöglicht aufgrund des enthaltenen Adenins eine Selektion von pYAC4-Klonen mit und ohne Insertion von Fremd-DNA (BROWNSTEIN *et al.* 1989). Das am Adeninstoffwechsel beteiligte *ade2* Gen besitzt in den Wirtszellen eine Mutation, welche zur Bildung eines roten Farbstoffes führt. Die Anwesenheit des Suppressorgens SUP4 in pYAC4 unterdrückt diese Mutation, was dazu führt, dass die Kolonien weiß bleiben. Die Insertion von Fremd-DNA inaktiviert das SUP4 Gen, wodurch wiederum ein rötlich gefärbter Phänotyp entsteht.

Mit einer einzelnen Hefekolonie werden 10 ml AHC-Medium angeimpft und 48 h bei 30°C auf einem Rundschüttler (200 UpM) inkubiert. Die kultivierten Hefezellen werden durch Zentrifugation (2.000 UpM, 5 min, RT) pelletiert, anschließend in 500 µl sterilem ddH<sub>2</sub>O gelöst und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach erneuter Zentrifugation (14.000 UpM, 20 sec, RT) wird der Überstand verworfen und die Zellen in 200 µl GDIS aufgenommen. Anschließend werden 200 µl PCI (25:24:1) sowie 0,35 g, mit Salpetersäure gewaschene, Glaskügelchen (Ø 0,7-1,2 mm) zugegeben und 2,5 min kräftig auf dem Vortex gemischt. Diese Behandlung zerstört mechanisch die Zellwand der Hefen und die sich

bildenden Sphäroblasten werden lysiert. Nach Zugabe von 200 µl ddH<sub>2</sub>O wird die Lösung zentrifugiert (14.000 UpM, 4 min, RT). Die wässrige Phase wird in ein frisches Reaktionsgefäß gegeben, mit 1 ml Ethanol (100%) versetzt und durch Invertieren gemischt. Nach zweiminütiger Präzipitation bei RT wird die DNA abzentrifugiert (14.000 UpM, 15 min, RT). Das DNA-Pellet wird in 400 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst und nach Zugabe von RNaseA (100 µg/ml) 10 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Nach der Präzipitation für 10 min bei -80°C mit 8 µl NH<sub>4</sub>OAc und 1 ml Ethanol (100%), wird die DNA erneut sedimentiert (14.000 UpM, 15 min, RT), kurz getrocknet und in 50 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst.

<b>GDIS</b>	100 mM	NaCl
	10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	1 mM	Na <sub>2</sub> EDTA pH 8,0
	2%	Triton®X-100
	1%	SDS

bei -20°C lagern

## 2.4 Konzentrationsbestimmung von DNA

Bei geringen DNA-Mengen (< 250 ng/ml) kann man die Konzentration, aufgrund der quantitativen Einlagerung von EtBr in die DNA Doppelhelices, direkt durch Agarose-Gelelektrophorese mit einem parallel aufgetrennten Konzentrationsstandard (z.B. *low mass DNA Leiter, Life Technologies*) ermitteln. Eine genauere Konzentrationsbestimmung erfolgt mit Hilfe eines UV-Spektrophotometers bei 260 nm. Bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht der gemessene Absorptionswert ( $A_{260}$ ) von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und einer Oligonukleotid-Konzentration von 33 µg/ml. Der Quotient der Werte bei 260 und 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) gibt Aufschluss über den Reinheitsgrad der DNA-Lösung. Er sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Niedrigere Werte können durch Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenol verursacht werden, während höhere Werte auf eine Denaturierung der DNA oder die Gegenwart von RNA hinweisen (SAMBROOK *et al.* 1989).

## 3. Präparation von Gesamt-RNA

Zur Vermeidung von Kontaminationen mit RNasen werden bei allen Arbeiten mit RNA die bei SAMBROOK *et al.* (1989) beschriebenen Arbeitsregeln eingehalten. Die nachfolgenden Methoden beruhen auf der von CHOMCZYNSKI & SACCHI (1987) beschriebenen Guanidiniumthiocyanat-Methode.

### 3.1 Isolierung aus Gewebe

Zur Isolierung von RNA eignet sich Gewebe, welches frisch entnommen wurde oder unmittelbar nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert wurde.

#### 3.1.1 Homogenisierung

Für die Isolierung von Gesamt-RNA werden in ein auf Eis stehendes 50 ml Falconröhrchen, pro 100 mg Gewebe 1 ml Lösung D gegeben. Guanidiniumthiocyanat ist ein Protein-denaturierendes Agens mit RNase-hemmender Wirkung, welches zur Lyse der Zellen eingesetzt wird. Mit Hilfe eines Homogenisators (Ultra-Turrax T25) wird das Gewebe homogenisiert. Verbliebene Gewebereste werden durch Zentrifugation (6.000 UpM, 5 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) sedimentiert und der Überstand in ein frisches 15 ml-Polypropylenröhrchen mit Deckel überführt.

**Lösung D**

4 M	Guanidiniumthiocyanat
25 mM	Natriumcitrat, pH 7
0,5%	N-Lauroylsarcosin

*sterilfiltrieren*

*unmittelbar vor Gebrauch 0,1 M  $\beta$ -Mercaptoethanol zugeben*

#### 3.1.2 Extraktion

Zu dem Homogenat werden 0,1 ml 2 M NaOAc (pH 4,0), 1 ml wassergesättigtes Phenol und 0,2 ml Chloroform-Isoamylalkohol (49:1) gegeben, kräftig gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Zur Phasentrennung wird die Lösung in der Sorvall-Zentrifuge zentrifugiert (12.000 UpM, 15 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Die wässrige Phase wird vorsichtig abgenommen und in ein frisches Röhrchen gegeben. Nach Zugabe von 1 Vol Isopropanol wird die Lösung gemischt und 30 min bei  $-80^{\circ}\text{C}$  präzipitiert. Die RNA wird anschließend durch Zentrifugation (12.000 UpM, 20 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) pelletiert, in 300  $\mu\text{l}$  Lösung D gelöst und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Danach wird die RNA nochmals mit 1 Vol Isopropanol präzipitiert ( $-80^{\circ}\text{C}$ , 30 min) und abzentrifugiert (12.000 UpM, 20 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Das RNA-Pellet wird in 75% Ethanol gewaschen, unter Vakuum in der Speed Vac getrocknet, in 50  $\mu\text{l}$  DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### 3.2 Isolierung aus peripheren Blutlymphozyten

Die Leukozyten werden wie in Abschnitt 2.1 beschrieben aus 10 ml frischem EDTA-Blut isoliert. Das Leukozytenpellet wird mit 1 ml RNAClean LS™ (Hybaid) versetzt und durch eine sterile Kanüle ( $\varnothing 0,3 \mu\text{m}$ ) gepresst. Anschließend werden 0,2 Vol. Chloroform

zugegeben, kräftig gemischt und zur Phasentrennung zentrifugiert (12.000 UpM, 15 min, 4°C). Die wässrige Phase wird in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 0,5 Vol. 100% Ethanol bei -80°C für 30 min präzipitiert. Anschließend wird die RNA durch Zentrifugation (12.000 UpM, 15 min, 4°C) pelletiert, mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet, in 50 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst und bei -80°C gelagert.

### 3.3 Isolierung aus Zellkulturen

Gesamt-RNA wird aus transformierten B-Lymphozytenzellen präpariert. Alle Zellkulturarbeiten werden in einer sterilen Werkbank mit sterilen Glaspipetten und Einweg-Kunststoffartikeln durchgeführt.

#### 3.3.1 Kultivierung von lymphoblastoiden Zelllinien

Da Blutzellen in Kultur nur relativ kurz überleben, werden die Lymphozyten mit dem humanpathogenen Epstein-Barr-Virus (EBV) transformiert. Das Virus transformiert spezifisch B-Lymphozyten, ohne dass diese infektiöse Viren produzieren bzw. in großen Mengen in den Überstand abgehen (LINDL & BAUER 1989).

##### 3.3.1.1 Isolierung von Lymphozyten mittels Dichtegradienten-Zentrifugation

Zu 3 ml HBSS (Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-frei) (Life Technologies) werden 3 ml frisches EDTA-Blut gegeben und gemischt. Mit diesem Gemisch werden vorsichtig 3 ml sterilfiltrierte Ficoll-Lösung (Dichte: 1,077 g/ml) überschichtet, ohne dass sich die beiden Phasen mischen. Nach einer Zentrifugation (2.100 UpM, 30 min, RT) entstehen vier Phasen. Während die oberste Phase das Plasma und die unterste Phase als Pellet die Erythrozyten und Granulozyten enthält, befinden sich die Lymphozyten als weißer Ring direkt über dem Ficoll. Mit einer sterilen Pasteurpipette werden die Lymphozyten vorsichtig gesammelt und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Danach werden die Lymphozyten zweimal mit 2 ml HBSS gewaschen und jeweils abzentrifugiert (2.000 UpM, 10 min, RT). Das Zellpellet wird schließlich in 2 ml RPMI-Komplett-Medium gelöst.

<b>RPMI-Komplett-Medium</b>	84%	RPMI 1640 Medium (Life Technologies)
	15%	FKS
	1%	Penicillin/Streptomycin

##### 3.3.1.2 Transformation mit Epstein-Barr-Viren (EBV)

Die Isolierung des EBV erfolgt aus dem Überstand der Marmoset-Blutleukozytenlinie B 95-8, welche hohe Titer an transformierendem EBV im Überstand besitzt. Zu den gelösten

Lymphozyten werden 500 µl des sterilfiltrierten Virusüberstandes gegeben und 24 h bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Um das Virus aus dem Medium zu entfernen, werden die Zellen abzentrifugiert (2.100 UpM, 10 min, RT), der Überstand abgenommen und das Lymphozytenpellet in 3 ml frische RPMI-Komplett Medium gelöst. Das Medium wird nun zweimal pro Woche gewechselt. Eine erfolgreiche Transformation erkennt man u.a. an einer Verfärbung des Mediums von rot nach gelb aufgrund einer Abnahme des pH-Wertes im Medium, sowie einer Zunahme der Zellzahl. Bei ausreichendem Wachstum werden die Zellen in 50 ml Kulturflaschen überführt und können durch Aufteilung subkultiviert werden.

### 3.3.2 Kryokonservierung von Zellen

Die Zellkulturen können in flüssigem Stickstoff bei -196°C über lange Zeit gelagert werden. Dazu werden die Zellen einer 50 ml Kulturflasche pelletiert (2.100 UpM, 10 min, RT), in 2 ml frisch angesetzttem Einfriermedium gelöst und auf zwei Kryo-Röhrchen verteilt. Nach langsamem Einfrieren in einem Styroporständer bei -80°C über Nacht werden die Zellen in einen Flüssigstickstoffbehälter überführt.

Das Auftauen der Zellen zur Weiterkultur erfolgt rasch in einem 37°C Wasserbad. Die Zellen werden in eine frische Kulturflasche gegeben und mit auf 37°C vorgewärmten RPMI-Komplett-Medium versorgt. Am nächsten Tag erfolgt der erste Mediumwechsel.

<b>Einfriermedium</b>	50%	RPMI-Komplett-Medium
	40%	FKS
	10%	DMSO

### 3.3.3 RNA-Isolierung

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus den kultivierten Lymphozyten wird das RNAClean™ LS System (Hybaid) verwendet. Hierzu werden die Zellen einer 50 ml Kulturflasche pelletiert (2.100 UpM, 10 min, RT) und in 1 ml RNAClean LS™ (Hybaid) gelöst. Anschließend wird die Zellsuspension durch eine sterile Kanüle (Ø 0,3 µm) gepresst und wie unter Abschnitt 3.2 beschrieben behandelt.

### 3.4 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentration von RNA wird mit Hilfe eines UV-Spektrophotometers bei 260 nm bestimmt (siehe Abschnitt 2.4). Bei einem Absorptionswert ( $A_{260}$ ) von 1, beträgt die Konzentration der RNA 40 µg/ml (SAMBROOK *et al.* 1989).



## 4. Gelelektrophoretische Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten

### 4.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die horizontale Agarose-Gelelektrophorese dient der schnellen und einfachen Auftrennung, Analyse und Reinigung von DNA-Fragmenten (SAMBROOK *et al.* 1989). Die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit von linearer doppelsträngiger DNA ist umgekehrt proportional zum Logarithmus der Anzahl ihrer Nukleotidpaare. In Abhängigkeit von der Länge der aufzutrennenden DNA-Fragmente wählt man eine Agarose-Konzentration zwischen 0,7% und 2%. Durch Vergleich mit definierten DNA-Längenstandards kann so die Länge eines bestimmten DNA-Fragments ermittelt werden.

Zur Herstellung eines Agarose-Gels wird die der jeweils gewünschten Konzentration entsprechende Menge Agarose in 1× TBE-Puffer aufgeköcht, bis die Lösung klar ist. Nach Abkühlen auf Handwärme gibt man Ethidiumbromid (200 ng/ml) zu. Anschließend wird die Gellösung in eine Gelkammer gegossen und ein Taschenformer luftblasenfrei eingesetzt. Die DNA-Proben versetzt man mit 0,5 Vol Probenpuffer und füllt sie in die Geltaschen. Die Elektrophorese erfolgt in 1× TBE-Puffer bei 100 - 120 V. Nach der Elektrophorese lassen sich die DNA-Banden auf einem UV-Transilluminator, anhand rot-oranger Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids lokalisieren.

<b>10× TBE-Puffer</b>	0,89 M	Tris-HCl	<b>Probenpuffer</b>	0,25%	Bromphenolblau
	0,89 M	Borsäure		0,25%	Xylencyanol
	20 mM	Na <sub>2</sub> EDTA, pH 8,3		30%	Glycerin

### 4.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Polyacrylamid-Gele (PAA-Gele) entstehen durch Polymerisation von Acrylamidmonomeren, welche durch Quervernetzung mit N,N'-Methylenbisacrylamid stabilisiert werden. Diese Polymerisationsreaktion wird durch Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) und N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) katalysiert. Mit Polyacrylamid-Gelen können DNA-Fragmente, die einen Längenunterschied von nur einer Base aufweisen, aufgetrennt werden (SAMBROOK *et al.* 1989). Durch Variation der Acrylamidkonzentration lässt sich der Längenbereich der optimalen Auftrennung festlegen. Die hier verwendeten 6%-igen Polyacrylamid-Gele haben einen Trennbereich von etwa 20-500 bp. Zur Herstellung denaturierender Gele wird eine 20%-ige Acrylamidlösung und eine Harnstofflösung im Verhältnis 2:3 gemischt und pro 100 ml Lösung, 640 µl einer 10%-igen (w/v) APS-Lösung und 80 µl TEMED zugegeben. Für native PAA-Gele benötigt man eine 40%-ige Acrylamid-Stammlösung. Für 100 ml Gellösung werden 25 ml der

Acrylamid-Stammlösung mit 10 ml 5× TBE und 65 ml H<sub>2</sub>O gemischt und APS und TEMED wie oben zugegeben.

<b>20% Acrylamidlösung (denaturierend)</b>	96,5 g	Acrylamid
	3,35 g	N,N'-Methylenbisacrylamid
	233,5 g	Harnstoff
	50 ml	10× TBE
	ad 500 ml	ddH <sub>2</sub> O
<b>Harnstofflösung</b>	233,5 g	Harnstoff
	50 ml	10× TBE
	ad 500 ml	ddH <sub>2</sub> O
<b>40% Acrylamidlösung (nativ)</b>	190 g	Acrylamid
	10 g	N,N'-Methylenbisacrylamid
	ad 500 ml	ddH <sub>2</sub> O

Die Gellösung wird zügig und luftblasenfrei zwischen zwei Glasplatten gegossen, die durch 0,4 mm dicke Kunststoffstreifen getrennt sind. Für große Gele (35 × 40 cm) verwendet man 70 ml, für kleine (20 × 35 cm) 40 ml Gellösung. Mit Hilfe eines Haifischzahnkamms erhält man einzeln abgetrennte Taschen. Das Gel ist nach ca. einer Stunde auspolymerisiert. Vor dem Auftragen werden die radioaktiv markierten Proben mit 1 Vol PAA-Puffer gemischt und 1 min bei 100°C denaturiert. Zur Elektrophorese verwendet man eine mit 1× TBE-Puffer gefüllte, vertikale Gelkammer, bei 75 W (große Gele) bzw. 55 W (kleine Gele). Nach der Elektrophorese erfolgt die Lokalisierung der Banden durch Autoradiographie. Dazu wird das Gel auf Gel-Blotting Papier transferiert und in Frischhaltefolie eingeschlagen. In einem Vakuum-Geltrockner wird das Gel bei 80°C ca. eine Stunde getrocknet und schließlich auf einem Röntgenfilm 2 h bis mehrere Tage exponiert.

<b>PAA-Puffer</b>	95%	Formamid
	5 mM	NaOH
	0,1%	Bromphenolblau
	0,1%	Xylencyanol

### 4.3 Isolierung von DNA-Fragmenten

#### 4.3.1 Niedrig schmelzende Agarose

Die Isolierung von DNA-Fragmenten in Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt (*low melting point agarose*) (LMA) eignet sich besonders zur Präparation von DNA-Hybridisierungssonden. Nach der Elektrophorese in einem Agarose-Gel, schneidet man mit einem Skalpell direkt unterhalb der gewünschten DNA-Bande ein Rechteck aus der Agarose aus. Dieses wird mit einer 50°C warmen, 0,35% LMA-Lösung aufgefüllt und bei 4°C ausgehärtet. Danach lässt man die gewünschte DNA-Bande, durch Elektrophorese bei niedriger Wattzahl, in die LMA einlaufen. Nach erneuter Abkühlung des Gels, wird die gewünschte Bande mit einem Skalpell möglichst knapp ausgeschnitten und in ein

1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Für die weitere Verwendung wird die isolierte DNA zum Schmelzen der LMA kurz auf 60°C erhitzt.

### **4.3.2 Elektroelution**

Für die Isolierung großer DNA Mengen eignet sich die Elektroelution mit Hilfe von semipermeablen Dialysemembranen. Jeweils 5-10 cm lange Stücke eines Dialyseschlauches werden 10 min in 2% (w/v) NaHCO<sub>3</sub>, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA (pH 8,0) gekocht, mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und nochmals für 10 min in 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA (pH 8,0) gekocht. Nach dem Abkühlen können die Dialyseschläuche in 50% Ethanol bei 4°C aufbewahrt werden. Die zu isolierende DNA wird nach erfolgter Agarose-Gelelektrophorese mit einem Skalpell möglichst knapp ausgeschnitten. Das Agarose-Stück wird luftblasenfrei in einen Dialyseschlauch eingebracht und dieser mit zwei Klemmen fest verschlossen. Anschließend wird der Dialyseschlauch in einer, mit frischem 1×TBE-Puffer gefüllten, horizontalen Elektrophoreseapparatur fixiert, so dass die DNA aus der Agarose in den, zur Anode gerichteten, freien Schlauchteil wandern kann. Nach ca. 30 min Elektrophorese bei 120 V, polt man für ca. 30 sec um. Die Flüssigkeit mit der eluierten DNA wird in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und nochmals mit 100 µl TE-Puffer gespült. Nach einer Ethanol-fällung kann die DNA im gewünschten Volumen TE-Puffer resuspendiert werden.

### **4.3.3 Kieselsäure-Gele**

Für die Isolierung von DNA mit hohem Reinheitsgrad verwendet man Membranen oder Kügelchen auf Kieselsäurebasis (Siliziumdioxid). Die Isolierung erfolgt mit dem QIAquick Gel Extraktion Kit (1 - 10 kb große Fragmente) (Qiagen), dem QIAex II Gel Extraktion Kit (50 bp - > 50kb große Fragmente) (Qiagen) oder dem NucleoSpin<sup>®</sup> Extract (100 bp - 10 kb) (Macherey-Nagel) und richtet sich nach der jeweiligen Anleitung des Herstellers.

## **5. Herstellung rekombinanter DNA**

Rekombinante DNA wird durch enzymatische Ligation eines Vektor-Moleküls mit Fremd-DNA erzeugt.

### **5.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Restriktionsendonukleasen stellen sehr wichtige Werkzeuge zur Manipulation von DNA dar. Die hier verwendeten Typ II-Restriktionsenzyme (Restriktionsendonuklease- und Methylasefunktion in zwei verschiedenen Untereinheiten) binden spezifisch an

symmetrische Sequenzen aus vier oder mehr palindromischen Nukleotidpaaren und schneiden dort. Bei dieser Spaltung, zu der sie  $Mg^{2+}$  benötigen, können entweder überhängende, kohäsive (*sticky*) oder glatte (*blunt*) Enden entstehen (KESSLER *et al.* 1985; ROBERTS 1988; KORNBERG *et al.* 1974). Ein Spaltungsansatz enthält bei 1  $\mu$ g DNA etwa 1-4 U des Restriktionsenzym, sowie den entsprechenden 1 $\times$  Reaktionspuffer. Das Enzymvolumen sollte aufgrund einer möglichen Beeinträchtigung der Enzymaktivität durch den glyzerinhaltigen Aufbewahrungspuffer maximal 1/10 des Gesamtvolumens betragen. Der Reaktionsansatz wird mindestens 1 h bei der enzymspezifischen Reaktionstemperatur inkubiert.

## 5.2. Klonierung von restriktionsverdauten DNA Fragmenten

Restriktionsverdaut DNA-Fragmente werden in kompatible Schnittstellen der multiplen Klonierungsstelle eines Plasmid-Vektors (z.B. pBluescript® II KS (+); Stratagene) kloniert. Für eine erfolgreiche Selektion der gewünschten, rekombinanten DNA besitzt das Plasmid ein spezifisches Antibiotika-Resistenzgen, sowie das *lacZ*-Gen.

### 5.2.1 Präparation der Vektor-DNA

Abhängig von den im Vektor vorhandenen Schnittstellen wählt man ein Enzym aus, welches das gewünschte DNA-Fragment flankierend schneidet. Mit dem gleichen Enzym wird der Vektor linearisiert. Dazu spaltet man 20  $\mu$ g isolierte Plasmid-DNA in einem Volumen von 400  $\mu$ l mit 25 U Enzym bei der entsprechenden Reaktionstemperatur. Anschließend präzipitiert man den linearisierten Vektor durch Ethanol-Fällung.

### 5.2.2 Dephosphorilierung des Vektors

Zur Verhinderung der Selbstligation des linearisierten Vektors müssen die 5'-Phosphatgruppen entfernt werden. Dies geschieht mit Hilfe der alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP). Für die Dephosphorilierung wird das Ethanolpräzipitat des linearisierten Vektors in 356  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und 40  $\mu$ l 10 $\times$  Dephosphorilierungs-Puffer sowie 4  $\mu$ l CIAP zugegeben. Nach Inkubation für 30 min bei 37°C wird die CIAP durch eine PCI-Extraktion inaktiviert und die Vektor-DNA nach einer Ethanolfällung in 100  $\mu$ l TE-Puffer aufgenommen.

#### 10 $\times$ Dephosphorilierungs-Puffer

500 mM	Tris-HCl, pH 8,5
1 mM	Na <sub>2</sub> EDTA

### 5.2.3 Ligation

Für die Ligation von kohäsiven Enden werden Vektor und DNA-Fragment in äquimolarem Verhältnis eingesetzt. Bei glatten Enden beträgt das Verhältnis von Vektor zu DNA-Fragment etwa 1 zu 3. Ein typischer Reaktionsansatz enthält 200 ng Vektor-DNA, etwa 100-400 ng Fremd-DNA, 1× T4 Ligase-Puffer und 1 U T4 DNA Ligase. Die Ligation erfolgt bei 14-16°C für mindestens 2 h.

<b>1× T4 Ligase Puffer</b>	50 mM	Tris-HCl, pH 7,6
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>
	1 mM	DTT
	1 mM	ATP
	25% (w/v)	PEG-8000

## 5.3 Transformation von Bakterienzellen

Für die Amplifikation der religierten, zirkulären Plasmid-DNA wird diese in Bakterienzellen eingebracht, welche zuvor zur Erhöhung ihrer Aufnahmefähigkeit von Fremd-DNA in den sogenannten Kompetenzzustand versetzt werden. In dieser Arbeit wurden dafür die *E. coli*-Stämme DH5α und XL-1 Blue verwendet.

### 5.3.1 Chemische Transformation

#### 5.3.1.1 Herstellung kompetenter Zellen

Durch Behandlung der Bakterienzellen mit Alkali- und Erdalkalitionen wird die Aufnahmefähigkeit von Fremd-DNA drastisch erhöht (HANAHAN 1983). Die hier verwendeten *E. coli* DH5α wurden ursprünglich für die Transformation mit pUC-Plasmiden konstruiert. Ihre Transformationsrate mit pUC 19 beträgt durchschnittlich  $5 \times 10^8$  Transformanten pro µg Plasmid (BETHESDA RES. LAB. 1986). Eine *E. coli* DH5α Kolonie wird von einer LB-Agar-Platte mit einem sterilen Zahnstocher isoliert und in 2 ml LB-Medium überimpft. Nach Inkubation auf einem Rundschüttler (225 UpM) bei 37°C über Nacht, überführt man 1 ml dieser Vorkultur in 100 ml LB-Medium. Nach ca. 2 h Inkubation bei 37°C befinden sich die Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase ( $A_{600} = 0,6$ ). Man stellt die Kultur für ca. 30 min auf Eis und zentrifugiert die Zellsuspension in einem vorgekühlten Zentrifugenbecher (3.500 UpM, 15 min, 4°C). Der Überstand wird verworfen und das Bakterienpellet vorsichtig in 40 ml eiskalter Tfb I-Lösung resuspendiert. Nach Zentrifugation wie oben, werden die Zellen in 5 ml eiskalter Tfb II-Lösung aufgenommen. Anschließend aliquotiert man je 200 µl in Eppendorf-Reaktionsgefäße, die in einem Ethanol/Trockeneis-Bad stehen und lagert die kompetenten Zellen bei -80°C.

<b>TfB I-Lösung</b>	100 mM	CaCl <sub>2</sub>	<b>TfB II-Lösung</b>	10 mM	MOPS, pH 7,0
	50 mM	MnCl <sub>2</sub>		10 mM	KCl
	30 mM	KOAc, pH 7,5		75 mM	CaCl <sub>2</sub>
	15%	Glycerin		15%	Glycerin

### 5.3.1.2 Transformation von *E. coli* DH5a

Zu 100 µl kompetenten *E. coli* DH5α gibt man 50 ng rekombinante Plasmid-DNA und stellt 30 min auf Eis. Der Transformationsansatz wird für 45 sec auf 42°C erhitzt und anschließend mindestens 2min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 400 µl SOC-Medium wird der Ansatz, zur Expression des Antibiotikaresistenz-Gens, 45 min bei 37°C auf dem Rundschüttler (225 UpM) inkubiert. Mit einem Drygalski-Spatel werden 200 µl des Transformationsansatzes auf einer LB-Agarplatte ausplattiert. Den Agarplatten ist zur Selektionierung auf erfolgreiche Transformation das entsprechende Antibiotikum (Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml)) zugesetzt. Durch Ausplattieren von 100 µl X-Gal (20 mg/ml in Dimethylformamid) und 11 µl IPTG (200 mg/ml) erfolgt eine zusätzliche Selektion durch α-Komplementierung. Diese beruht auf der Unterbrechung des β-Galaktosidase-Gens aufgrund des Einbaus der Fremd-DNA. Dabei geht die Fähigkeit zur α-Komplementierung des deletierten, bakteriellen β-Galaktosidase-Gens (ΔM15) verloren und das chromogene Substrat X-Gal kann nicht verwertet werden. Daher können Bakterienklone welche ein solches rekombinantes Plasmid tragen an ihrer weißen Farbe erkannt werden.

## 5.3.2 Elektroporation

### 5.3.2.1 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Mit Hilfe der Elektroporation können *E.coli* Bakterien mit sehr hohen Effizienz transformiert werden. Die hierzu verwendeten *E.coli* XL-1 Blue besitzen eine maximale Transformationseffizienz von  $5 \times 10^9$  Transformanten pro µg Plasmid. Mit 10 ml Vorkultur wird 1 l LB-Medium (+ 15 µg/ml Tetracyclin) angeimpft und die Zellen bis zur logarithmischen Wachstumsphase ( $A_{600}=0,6-0,7$ ) auf einem Rundschüttler (225 UpM) bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die Zellen 15 min auf Eis abgekühlt und in vorgekühlten Zentrifugenbechern in einer Sorvall-Zentrifuge (5.200 UpM, 10 min, 4°C) sedimentiert. Die Bakterien werden in 1 Vol eiskaltem, sterilem ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und wie oben zentrifugiert. Dieser Waschschrift wird einmal wiederholt. Schließlich werden die präzipitierten Zellen in 0,5 ml sterilem ddH<sub>2</sub>O gelöst, mit 10% (v/v) Glycerin versetzt und wie in Abschnitt 5.3.1.1 beschrieben in 50 µl Portionen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

### 5.3.2.2 Transformation

Für die Elektroporation wird der GenePulser® (BioRad) mit angeschlossenem Pulse Controller (BioRad) verwendet. Die elektrokompentenen Zellen werden aufgetaut und auf Eis vorsichtig mit 50 ng rekombinanter DNA gemischt. Mit einer sterilen Pasteurpipette werden die Bakterien luftblasenfrei in eine eiskalte 0,2 cm breite Küvette gegeben. Diese wird zwischen die Kontakte der Elektroporationskammer gestellt. Die Transformation erfolgt durch einen 10 µsec dauernden elektrischen Impuls (25 µF, 2,5 kV, 200 ). Unmittelbar danach wird 1 ml SOC-Medium zugegeben und die Suspension in einem 2 ml-Reaktionsgefäß 1 h bei 37°C auf einem Rundschüttler (225 UpM) inkubiert. Anschließend werden die Zellen auf Selektionsmedium ausplattiert.

## 6. Nachweis spezifischer Nukleinsäure-Fragmente

Der Nachweis von spezifischen Nukleinsäuren beruht auf dem als Hybridisierung bezeichneten Vorgang der Anlagerung von zwei komplementären, einzelsträngigen Nukleinsäuremolekülen zu einem basengepaartem Duplexmolekül. Einer der Bindungspartner ist dabei irreversibel an eine Matrix gebunden.

### 6.1 Transfer auf Nylonmembranen

#### 6.1.1 Southern-Blot

Die von SOUTHERN (1975) entwickelte Methode zur Immobilisierung von DNA auf einer Membran, ermöglicht eine mehrmalige wiederholbare Analyse dieser DNA mit spezifischen Hybridisierungssonden. Nach der Elektrophorese wird das Agarose-Gel zusammen mit einem Lineal unter UV-Licht fotografiert, um die bei einer anschließenden Hybridisierung erhaltenen spezifischen Signale zuordnen zu können. Besteht die zu blottenden DNA aus sehr großen Fragmenten (z.B. Restriktionsverdau von genomischer DNA), so wird diese für zweimal 10 min mit einer 0,25 M HCl-Lösung depurinisiert. Anschließend denaturiert man die DNA für zweimal 10 min in Denaturierungslösung und neutralisiert danach für 15 min in Neutralisierungslösung (25 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,5). Auf eine mit Transferpuffer (10× SSC) gefüllte Kunststoffwanne legt man eine Glasplatte, über die eine aus dickem Filterpapier bestehende Pufferbrücke so gelegt wird, dass beide Enden in den Puffer eintauchen. Das vorbehandelte Agarose-Gel wird auf dieses Filterpapier platziert und eine im Transferpuffer angefeuchtete Nylonmembran (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham, Life Science) luftblasenfrei aufgelegt. Auf die Membran gibt man zwei in gleicher Weise befeuchtete, sowie drei trockene Gel-Blotting Papiere. Zur Verstärkung der Kapillarkräfte werden darauf noch

ca. 10-15 Lagen Zellstoff gelegt. Das Ganze wird mit einer Glasplatte abgedeckt und mit einem Gewicht (ca. 500 g) beschwert. Nach dem Kapillartransfer über Nacht, wird der Zellstoff und das Gel-Blotting Papier entfernt. Das Gel und die daran haftende Membran werden umgedreht und die Geltaschen mit einem Bleistift durchgezeichnet. Die Membran wird kurz in 5× SSC-Puffer gespült und anschließend getrocknet. Durch *UV-crosslinking* wird die DNA dauerhaft an die Membran gebunden. Das UV-Licht bewirkt, dass ein kleiner Teil der Thymidinreste der DNA mit positiv geladenen Amingruppen der Membran verbunden werden (CHURCH & GILBERT 1984). Die so behandelte Membran wird in eine Kunststofftüte verpackt und kann bei RT aufbewahrt werden. Liegt die zu blottende DNA in ausreichend hohen Konzentration vor (z.B. restriktionsverdaute Plasmid-DNA), so kann der Transfer auch durch einen sogenannten Squash-Blot (eine Richtung) oder Sandwich-Blot (beide Richtungen) erfolgen. Bei diesen beiden Verfahren handelt es sich um Varianten des oben beschriebenen Southern-Blots, bei denen der Transfer ohne Pufferreservoir durchgeführt wird was zu einer geringeren Transfer-Effizienz führt.

<b>Denaturierungslösung</b>	0,5 M	NaOH
	1,5 M	NaCl
<b>10× SSC</b>	1,5 M	NaCl
	150 mM	Na-Citrat

### 6.1.2 Dot-Blot

Das direkte Aufbringen einzelsträngiger DNA auf eine Nylonmembran wird als Dot-Blot bezeichnet. Hierzu wird 0,5-1 µg doppelsträngige DNA mit 1 Vol 1 N NaOH gemischt und bei RT für 5min inkubiert. Anschließend wird etwa 12 µl dieser DNA-Lösung auf eine markierte, möglichst kleine Nylonmembran aufgetropft und trocknen lassen. Nach kurzem Schwenken in 5× SSC-Puffer lässt man die Membran kurz antrocknen und fixiert die DNA durch *UV-crosslinking*. Die Membran kann bis zu ihrer weiteren Verwendung bei RT in eine Kunststofftüte verpackt gelagert werden.

### 6.1.3 Koloniehybridisierung

Durch Koloniehybridisierung ist es möglich, sehr schnell eine große Anzahl verschiedener Klone auf ein spezifisches DNA-Fragment zu untersuchen (GRUNSTEIN & HOGNESS 1975). Auf einer Agarplatte mit transformierten Bakterien (Ø 1-2 mm) oder durch Phagen lysierte Bakterien (Ø der Plaques ca. 1-3 mm), wird eine runde Nylonmembran (Colony/Plaque Screen™, DuPont) gelegt. Durch drei bis vier Einstiche mit einer sterilen Kanüle wird die Orientierung der Membran festgelegt. Mit Hilfe einer Pinzette wird die Membran vorsichtig abgehoben. Dabei bleiben Teile der Bakterien- bzw. Phagenklone an der Membran haften und man erhält eine exakte Kopie der Anordnung der Klone auf der Agarplatte.



Bakterienklone werden für einige Stunden bei 37°C nachwachsen lassen. Als positiv identifizierte Klone können für die weitere Analyse direkt von der Agarplatte isoliert werden. Die Membranen werden für 2 min mit der klonfreien Oberseite auf ein mit Denaturierungslösung getränktes Filterpapier gelegt. Anschließend transferiert man die Membran auf mit Neutralisierungslösung getränktes Filterpapier. Mit einem in Neutralisierungslösung getränktem Schwamm oder einem Papiertuch, werden Bakterienklone von der Membran gewaschen. Nach dem Trocknen der Membran wird die DNA durch *UV-crosslinking* fixiert. Liegen die Bakterienklone in Flüssigkultur in einer Mikrotiterplatte vor, so werden sie mit Hilfe eines Replikators auf die Nylonmembran überstempelt, welche auf einer LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum liegt. Die Platte wird zusammen mit der Membran bei 37°C über Nacht inkubiert und die Membran anschließend wie oben beschrieben weiterbehandelt.

#### 6.1.4 Northern Blot

Der Transfer elektrophoretisch aufgetrennter RNA auf eine Membran wird als Northern-Blot bezeichnet.

##### 6.1.4.1 Elektrophoretische Auftrennung von RNA in Agarose-Gelen

Für die elektrophoretische Auftrennung von RNA wird ein denaturierendes Agarose-Gel verwendet. Das als denaturierendes Agens verwendete Formaldehyd trennt intra- und intermolekulare Basenpaarungen (LEHRACH *et al.* 1977). Für die Herstellung von 100 ml eines 1,2%-igen Formaldehyd-Agarose-Gels werden 1,2 g Agarose in 97 ml 1× MOPS-Puffer aufgekocht, auf ca. 60°C abgekühlt und unter dem Abzug mit 3 ml 37% Formaldehyd, pH>4 versetzt. Die Gellösung wird in eine RNase-freie Gelform gegossen und ein Kamm luftblasenfrei eingesetzt. Zum Probenauftrag werden 5-12 µg Gesamt-RNA mit mindestens 1 Vol RNA-Probenpuffer versetzt und bei 65°C für 10 min denaturiert. Zur Größenbestimmung werden 3µl eines RNA-Längenstandards (G399, Promega) verwendet. Die Elektrophorese erfolgt bei 50-70 V in 1× MOPS-Puffer. Nach der Elektrophorese wird das Gel zusammen mit einem Lineal unter UV-Licht fotografiert. Bei intakter, nicht-degradierter RNA sind die 28S (6,3 kb) und 18S (2,3 kb) ribosomalen RNA-Banden deutlich zu erkennen.

#### **10× MOPS-Puffer**

0,2 M	MOPS
50 mM	NaOAc
10 mM	Na <sub>2</sub> EDTA

#### **RNA-Probenpuffer**

50%	Formamid (deionisiert)
17,5%	Formaldehyd (37%)
1×	MOPS-Puffer
1×	Farbstoffpuffer
10 µg	Ethidiumbromid

<b>10× Farbstoffpuffer</b>	50%	Glyzerin
	1 mM	Na <sub>2</sub> EDTA
	0,4%	Bromphenolblau

### 6.1.4.2 Vakuum-Transfer auf Nylonmembranen

Die RNA wird mit Hilfe der Vakuumblot-Apparatur VacuGene™ (Pharmacia) auf eine Nylonmembran übertragen. Zuvor wird das Gel zur Entfernung des Formamids für 10 min in 20× SSC geschwenkt. Die Nylonmembran wird mit 2× SSC angefeuchtet und unter der Gelmaske platziert. Anschließend wird das Gel luftblasenfrei auf die Membran gelegt. Der Vakuum-Transfer wird für 3-4 h bei -60 mbar durchgeführt. Dabei wird das Gel mit 20× SSC überschichtet. Nach dem Transfer werden unter einer UV-Handlampe die Banden des Längenstandards und die rRNA Banden auf der Membran markiert. Die Filter werden bei -20°C gelagert.

## 6.2 Radioaktive Markierung von DNA

Für den Nachweis komplementärer Sequenzen auf der Nylonmembran, werden die als Hybridisierungsprobe verwendeten DNA-Fragmente mit dem radioaktiven Phosphor-Isotop 32 markiert.

### 6.2.1 Markierung durch *random-priming*

Die als *random-priming* bezeichnete Markierungsmethode basiert auf der Anlagerung von Hexanukleotid-Primern mit beliebiger Sequenz an einzelsträngige DNA-Moleküle (VOGELSTEIN & FEINBERG 1984). Ausgehend von der 3'-OH Gruppe der Primer, synthetisiert das große Fragment der DNA-Polymerase I (Klenow Fragment) unter gleichzeitigem Einbau des Radio-Isotops [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]dCTP, den komplementären DNA-Strang. Dem Klenow-Fragment fehlt die 5'→3'-Exonukleaseaktivität. Dadurch ist es nicht in der Lage, das 5'-Ende der an die Matrizen-DNA gebunden Primern zu entfernen. Das Klenow-Fragment kann daher zur matrizenabhängigen Verlängerung einer partiell doppelsträngigen DNA verwendet werden. 20 bis 50 ng der Matrizen-DNA werden in einem Volumen von 34  $\mu\text{l}$  für 3 min bei 100°C denaturiert und sofort für 5 min auf Eis gestellt. Anschließend gibt man 10  $\mu\text{l}$  5× OLB-Puffer, 20 mg BSA, 4U Klenow-Fragment und 2-3  $\mu\text{l}$  [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]dCTP (3.000 Ci/mmol) zu, mischt und inkubiert bei RT über Nacht oder bei 37°C für 3 h.

<b>5× OLB-Puffer</b>	250 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	25 mM	MgCl <sub>2</sub>
	50 mM	$\beta$ -Mercaptoethanol
	je 96 $\mu\text{M}$	dATP, dGTP, dTTP
	1 M	Hepes, pH 6,6
	50 U (A <sub>260</sub> )	pd(N)6

### 6.2.2 5'-Endmarkierung

Mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase (PNK) werden einzelsträngige Oligonukleotide markiert. Dabei überträgt die PNK die  $\gamma$ -Phosphatgruppe von [ $^{32}\text{P}$ ]dATP auf die freien 5'-Hydroxylgruppen der Oligonukleotide. Dazu werden 15  $\mu\text{M}$  Oligonukleotid mit 17  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O gemischt und 2 min bei 70°C inkubiert. Anschließend werden 2,5  $\mu\text{l}$  10× PNK-Puffer, 3  $\mu\text{l}$  [ $^{32}\text{P}$ ]dATP (Spezifische Aktivität beträgt 3.000 Ci/mmol) und 3 U T4 PNK zugegeben und im Wasserbad bei 37°C für 30 min inkubiert.

<b>10× PNK-Puffer</b>	0,5 M	Tris-HCl, pH 8,0
	0,1 M	MgCl <sub>2</sub>
	50 mM	DTT
	1 mM	Spermidin
	1 mM	Na <sub>2</sub> EDTA

### 6.2.3 Reinigung der Sonden

Die Reinigung der Sonden erfolgt mit Hilfe der Gelfiltrations-Chromatographie. Dadurch ist es möglich, markierte DNA-Sonden von überschüssigen, freien  $^{32}\text{P}$ -markierten Nukleotiden zu trennen. Das hier verwendete Sephadex G-25 (Pharmacia) wird zunächst in TE-Puffer hydratisiert und äquilibriert. Dazu gibt man 4 g Sephadex G-25 in 80 ml TE-Puffer und autoklaviert für 20 min bei 120°C. Zur Herstellung der Chromatographiesäule wird der Boden einer Einmalspritze (1 ml) mit etwas autoklavierter Glaswolle verstopft. Anschließend verdichtet man mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe das Sephadex G-25 in der Spritze bis ca. 1 cm unter den oberen Rand. Zum Entfernen von überschüssigem Wasser zentrifugiert man die Chromatographiesäule in einem 15 ml Harre-Röhrchen (1.900 UpM, 2 min, RT). Die Säule wird zum Auffangen der austretenden Flüssigkeit in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß ohne Deckel gestellt. Danach gibt man zweimal je 100  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O auf das Sephadex und zentrifugiert jeweils in gleicher Weise. Nach jedem Zentrifugationsschritt wird ein neues Reaktionsgefäß eingesetzt. Der Ansatz mit der markierten Sonde wird mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 100  $\mu\text{l}$  aufgefüllt, gemischt, direkt auf die Säule gegeben und wie oben zentrifugiert. Danach misst man mit einem Geiger-Müller-Zählrohr die gereinigte Probe. Diese sollte je nach Anwendung eine Aktivität von mindestens 500 cps haben, um bei der nachfolgenden Hybridisierung ein ausreichend starkes Signal zu ergeben.

### 6.3 Hybridisierung

In Abhängigkeit vom Grad der Übereinstimmung zwischen den hybridisierten Nukleinsäuresträngen können die Hybridisierungsbedingungen variiert werden. Die

Stringenz wird dabei von der Salzkonzentration und der Temperatur während der Hybridisierung und dem anschließenden Waschen bestimmt.

### 6.3.1 Vorbereitung und Hybridisierung der Nylonmembran

Zur Absättigung der Membran wird diese ca. 30 min in Church-Puffer vorhybridisiert. Dazu gibt man die Membran in einen Hybridisierungszylinder und füllt je nach Zylindergröße ca. 10 ml (100 ml Zylinder) oder 25 ml (500 ml Zylinder) Church-Puffer ein. Der Zylinder wird mit einem durchbohrten Silikonstopfen verschlossen und im Hybridisierungssofen bei der jeweiligen, sondenspezifischen Temperatur, ständig rotierend, inkubiert. Unmittelbar vor der Hybridisierung wird die gereinigte Sonde für 3 min bei 94°C denaturiert. Die Hybridisierungstemperatur richtet sich nach der Schmelztemperatur der Probe. Diese ist direkt von deren Länge und Basenzusammensetzung abhängig. DNA-Fragmente > 100 bp werden bei 65°C, Oligonukleotide bei 42°C, hybridisiert. Danach gibt man die Probe direkt in den Zylinder mit der vorhybridisierten Membran. Das Volumen des Church-Puffers sollte so gering gewählt werden, dass die Membran gerade gut bedeckt ist. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht im Hybridisierungssofen.

#### **Church-Puffer**

0,5 M	Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,2
1 mM	Na <sub>2</sub> EDTA, pH 8,0
7%	SDS

### 6.3.2 Waschen der Membran und Autoradiographie

Damit unspezifisch an die Membran gebundene Sondenreste entfernt werden, muß die Membran nach der Hybridisierung gewaschen werden. Dieser Vorgang, für den man einen SSPE/SDS-Puffer verwendet, findet in der Regel bei der jeweiligen Hybridisierungstemperatur statt. Die Konzentration des SSPE-Puffer ist variabel und beträgt 0,1× bis 2×. Die SDS Konzentration beträgt immer 0,1%. Mit sinkender Salzkonzentration steigt die Stringenz des Waschvorgangs. Durch Messung der Membran mit dem Geiger-Müller-Zählrohr kann man das jeweilige Waschergebnis ungefähr abschätzen. Nach dem Waschen werden die Filter leicht getrocknet und zwischen zwei Kunststofffolien eingeschlagen. Die Autoradiographie erfolgt bei -80°C. Das Anbringen von Fluoreszenzmarkern ermöglicht dabei die genaue Lokalisierung der spezifischen Signale.

#### **20× SSPE-Puffer**

3 M	NaCl
200 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
20 mM	Na <sub>2</sub> EDTA

### 6.3.3 Entfernen der Hybridisierungssonde

Für mehrere aufeinanderfolgende Hybridisierungen können spezifisch gebundene Proben entfernt werden (*strippen*). Dazu wird die Membran 10 min in einer kochenden  $0,01 \times \text{SSC}/0,01 \times \text{SDS}$ -Lösung inkubiert.

## 7. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist es möglich, *in vitro*, selektiv einen DNA-Bereich definierter Länge aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen zu amplifizieren (SAIKI *et al.* 1988). Basierend auf der DNA-Replikation, benötigt man neben der DNA-Matrize, zwei Oligonukleotidprimer mit jeweils 15-30 Nukleotiden welche spezifisch an jeweils ein Ende (*forward* und *reverse*) der zu amplifizierenden Sequenz binden, eine Mischung aller vier Desoxynukleotide (dNTPs), Reaktions-Puffer, sowie eine thermostabile DNA-Polymerase. Dieser Reaktionsansatz wird immer wiederkehrenden Temperaturzyklen unterworfen, in denen der Matrizendoppelstrang getrennt ( $94^\circ\text{C}$ ), die Primer angelagert (variable Temperatur, abhängig von den Primersequenzen) und neue DNA Stränge synthetisiert werden ( $72^\circ\text{C}$ ). Eine n-fache Wiederholung dieses Zyklus liefert aus einem einzigen DNA-Molekül theoretisch  $2^n$  doppelsträngige Kopien der zwischen dem Primerpaar liegenden DNA-Sequenz. Durch den Einsatz von thermostabilen DNA-Polymerasen (z.B. *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* oder *Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus*) können die Teilreaktionen in einem Ansatz durchgeführt werden.

### 7.1 Standard-PCR-Reaktion

Die Oligonukleotid-Primer werden mit Hilfe des Computerprogramms OLIGO Version 2.0 konstruiert (RYCHLIK & RHOADS 1989). Hierbei wird auf folgende Punkte besonders geachtet. Um eine spezifische Amplifikation zu gewährleisten, sollten die Primer keine repetitiven Sequenzen enthalten. Darüber hinaus sollten die Dissoziations-Temperaturen ( $T_m$ ) eines Primerpaars etwa gleich sein und die Bildung von Primer-Dimeren durch komplementäre 3'-Enden vermieden werden. Auch sollten die Oligonukleotide nicht zu sich selbst komplementär sein. Basierend auf der  $T_m$  kann die Anlagerungstemperatur ( $T_A$ ) annäherungsweise berechnet werden.

$$T_A = \frac{(T_{m1} + T_{m2})}{2} - 3^\circ\text{C}$$

Die Reaktivität der thermostabilen DNA-Polymerasen wird durch Magnesiumionen beeinflusst. Eine Erhöhung der  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionenkonzentration führt hierbei zu einer

verbesserten Ausbeute an PCR-Produkt bei gleichzeitiger Verringerung der Stringenz. Dies kann zu einer Amplifizierung unspezifischer Produkte führen. Durch Zusatz von 4% Formamid zum Reaktionsansatz wird die Stringenz erhöht. Für jedes Primerpaar müssen die optimalen Reaktionsbedingungen, in einer Reihe von Test-PCRs, empirisch ermittelt werden (Tabelle 3).

<b>10× Reaktions-Puffer (Taq)</b>	200 mM	Tris-HCl, pH 8,4
	500 mM	KCl
<b>10× Reaktions-Puffer (Pfu)</b>	200 mM	Tris-HCl, pH 8,75
	100 mM	KCl
	100 mM	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	20 mM	MgSO <sub>4</sub>
	1%	Triton® X-100
	1mg/ml	BSA

Der PCR-Reaktionsansatz wird in einen Thermocycler gegeben und dort wie folgt inkubiert. Nach einer Vordenaturierung (94°C, 5 min) werden 30-36 Zyklen mit 94°C, 30 sec; T<sub>A</sub>, 30 sec und 72°C, 30-90 sec durchgeführt. Durch abschließendes Erhitzen auf 72°C für 5 min werden unvollständige Doppelstränge aufgefüllt. Die fertigen PCR-Produkte können bis zur Analyse auf einem Agarose-Gel bei 4°C gelagert werden.

**Tab. 3: Reaktionsansätze zur Bestimmung der optimalen PCR-Bedingungen**

Substanz	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3*	Ansatz 4*
10× Reaktions-Puffer	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub> *	1,0 mM	1,0 mM	1,5 mM	1,5 mM
Formamid	4%		4%	
dNTPs	je 0,1 mM	je 0,1 mM	je 0,1 mM	je 0,1 mM
Primer ( <i>forward</i> )	15 pmol	15 pmol	15 pmol	15 pmol
Primer ( <i>reverse</i> )	15 pmol	15 pmol	15 pmol	15 pmol
DNA	100 ng	100 ng	100 ng	100 ng
Taq-Polymerase	0,5 U	0,5 U	0,5 U	0,5 U
ddH <sub>2</sub> O	ad 25 µl	ad 25 µl	ad 25 µl	ad 25 µl

\* wird nur bei Verwendung der Taq-Polymerase benötigt

## 7.2 PCR-Amplifikation langer DNA-Fragmente

Für die Amplifikation sehr langer (> 2,5 kb) DNA-Fragmente wird das Expand Long Template PCR System (Roche) verwendet. Dieses verwendet eine Kombination aus Taq-Polymerase und einer Polymerase mit 5'→3'-Exonuklease-Aktivität. Mit diesem Gemisch verschiedener DNA-Polymerasen ist es möglich bis zu 27 kb große Fragmente aus genomischer DNA zu amplifizieren. Die Reaktionsbedingungen entsprechen im

wesentlichen denen der Standard-PCR-Reaktion, wobei die  $MgCl_2$ -Konzentration etwas höher liegt (1,75 mM bis 2,25 mM) und die Strangsynthese bei 68°C erfolgt.

### 7.3 Klonierung von PCR-Produkten

#### 7.3.1 Klonierung mit dem TA Cloning® Kit

Die Klonierung von PCR-Produkten mit dem TA Cloning® Kit (Invitrogen) nutzt die Eigenschaft der *Taq*-Polymerase, matrizenunabhängig, einzelne Desoxyadenosine an die 3'-Enden des PCR-Produktes anzuhängen. Der im Kit enthaltene linearisierte Vektor pCR™2.1 (vormals: pCR™II) besitzt einen einzelnen überhängenden 3'-Desoxythymidinrest. Dadurch können PCR-Produkte mit hoher Effizienz in den Vektor ligiert werden. pCR™2.1 besitzt sowohl ein Ampicillin- als auch ein Kanamycin-Resistenzgen, sowie das *lacZ*-Gen zur blau/weiß Selektionierung positiver Rekombinanten durch  $\alpha$ -Komplementation. Für die Ligation werden 100 ng (40 fmol) Vektor und 6  $\mu$ l frisches PCR-Produkt eingesetzt. Die Ligationsprodukte werden in One Shot™ (*E. coli* INV $\alpha$ F') kompetente Zellen (Invitrogen) übertragen. Diese haben eine Transformationseffizienz von  $1,0 \times 10^8$  (amp<sup>R</sup>)/pUC18. Die Transformation erfolgt analog zu der unter Abschnitt 5.3.1.2 beschriebenen Vorschrift. Dabei sind einige Unterschiede zu beachten. Pro Transformationsansatz verwendet man 25  $\mu$ l kompetente Zellen. Zu diesen gibt man 2  $\mu$ l 0,5 M  $\beta$ -Mercaptoethanol und max. 2  $\mu$ l Ligationsansatz. Der Hitzeschritt bei 42°C dauert 30 sec. Nach Zugabe von 450  $\mu$ l SOC-Medium, wird der Ansatz für knapp 60 min bei 37°C auf dem Rundschüttler (225 UpM) inkubiert. Zur Selektionierung werden den Agarplatten Ampicillin oder Kanamycin sowie X-Gal zugegeben. IPTG wird nicht benötigt.

#### 7.3.2 Klonierung mit dem pCR-Script™ Amp SK (+) Kit

Das pCR-Script™ Amp SK (+) Kit (Stratagene) ermöglicht die Klonierung von PCR-Produkten ohne einzelne Nukleotidüberhänge. Diese entstehen z.B. bei der Verwendung der thermostabilen *Pfu*-DNA-Polymerase. Diese besitzt, im Gegensatz zur *Taq*-Polymerase, eine 3'→5' Exonuklease Aktivität, welche zu glatten Enden bei den PCR-Produkten führt. Die so amplifizierte *blunt end* PCR-Produkte werden in den Vektor pCRScript™ Amp SK (+) kloniert. Dieser besitzt neben einem Ampicillin-Resistenzgen und einem *lacZ* Promotor auch, flankierend zur multiplen Klonierungsstelle, T3 und T7 RNA-Polymerase Promotoren für eine *in vitro* Transkription. Durch die Zugabe der Restriktionsendonuklease *SrfI*, einem selten schneidenden Enzym mit der Erkennungssequenz 5'-GCCC/GGGC-3', zum Ligationsansatz wird die Effizienz der Ligation erhöht. Während der Ligation verhindert *SrfI* die Selbstligation des Vektors, während durch den Einbau des PCR-Produktes die *SrfI* Erkennungssequenz zerstört wird.

In einem Gesamtvolumen von 10 µl werden 10 ng pCR-Script™ Amp SK (+) Vektor, 1× pCR-Script™ Reaktions-Puffer, 0,5 mM rATP, 4 µl PCR-Produkt (*blunt end*), 5 U *Srf*I und 4 U T4 DNA Ligase zusammen gegeben und vorsichtig gemischt. Die Ligationsreaktion erfolgt bei RT für 1 h. Durch anschließendes Erhitzen auf 65°C für 10 min werden die zugesetzten Enzyme inaktiviert. Dieser Ligationsansatz kann für eine beliebige Transformationsmethode verwendet werden.

#### **7.4. Anwendungen der PCR**

Basierend auf der PCR-Technik werden eine Reihe von verschiedenen Anwendungsmöglichkeiten durchgeführt.

##### **7.4.1 Charakterisierung polymorpher Mikrosatelliten: Kopplungsanalyse**

Unter polymorphen Mikrosatelliten versteht man kurze repetitive Tandemsequenzen variabler Länge, welche in großer Zahl, gleichmäßig über das Genom verteilt sind. Aufgrund ihres meist hohen Informationsgehalts konnten mit Hilfe solcher Mikrosatelliten, Genkarten mit einer durchschnittlichen Auflösung von etwa 1,5 cM erstellt werden (DIB *et al.* 1996; BROMAN *et al.* 1998). Im Rahmen dieser Arbeit werden polymorphe Mikrosatelliten vor allem für Kopplungsanalysen verwendet. Für die Amplifikation polymorpher Mikrosatelliten werden flankierende Oligonukleotid Primer gewählt. Diese werden, zusammen mit 100 ng genomischer DNA der zu untersuchenden Person, in einer PCR-Reaktion eingesetzt, bei der die PCR-Produkte durch Zugabe von je 0,1 µl  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dCTP zum Reaktionsansatz radioaktiv markiert werden. Die PCR-Produkte werden anschließend auf einem denaturierenden 6%-igem PAA-Gel aufgetrennt, welches unter Vakuum getrocknet und über Nacht bei -80°C auf einem Röntgenfilm exponiert wird. Danach kann die relative Allelgröße bestimmt werden. Zur Bestimmung der Allelfrequenzen werden die Allele einer möglichst großen Anzahl repräsentativer Individuen in gleicher Weise untersucht.

Mit Hilfe der Kopplungsanalyse kann ein bestimmtes, monogen vererbtes Merkmal einem bestimmten chromosomalen Abschnitt (Lokus) zugeordnet werden. Dazu muß eine ausreichend große Anzahl betroffener und nicht-betroffener Personen einer dieses Merkmal tragenden Familie untersucht werden. Aufgrund der meiotischen Rekombination steigt mit geringer werdendem Abstand zweier Marker die Wahrscheinlichkeit, dass diese gemeinsam vererbt werden. Durch die Untersuchung einer Reihe benachbarter polymorpher Mikrosatelliten, kann eine typische Allelverteilung (Haplotyp) erstellt werden. Durch meiotische Rekombinationsereignisse werden Marker die sich in größerem Abstand zu einem Lokus befinden von diesem getrennt. Die Erstellung eines gemeinsamen Haplotyps



aller betroffener Individuen bildet die Grundlage für eine statistische Eingrenzung des Merkmals-Lokus.

#### 7.4.1.1 Berechnung von *lod scores*

Die statistische Berechnung der Kopplung zweier Marker basiert auf der sogenannten *maximum likelihood*-Methode (HALDANE & SMITH 1947). Hierbei wird die Beziehung dieser Marker (Kopplung oder Rekombination) als Wahrscheinlichkeit (*likelihood*) wiedergegeben. Als *likelihood*  $L = P(F; \theta)$  wird die Wahrscheinlichkeit für das Eintreten eines definierten Ereignisses unter bestimmten Voraussetzungen bezeichnet. Dabei entspricht  $F$  der Anzahl der beobachteten Phänotypen und  $\theta$  der angenommenen Rekombinationsrate. Somit ist die *likelihood* vom Wert der Rekombinationsrate abhängig. Für eine Kopplungsanalyse wird nicht der absolute Wert für die Wahrscheinlichkeit einer bestimmten Hypothese angegeben sondern das Verhältnis der *likelihoods* zweier Alternativ-Hypothesen berechnet. Dieser als *likelihood ratio* oder *odds ratio* bezeichnete Wert ist der Quotient aus der Wahrscheinlichkeit für die Alternativ-Hypothese  $H_1$  der Kopplung zweier Lozi (mit  $\theta > 0,5$ ) und der Wahrscheinlichkeit für die Nullhypothese  $H_0$  der freien Rekombination (mit  $\theta = 0,5$ ).

$$\text{odds ratio } R = \frac{L(H_1)}{L(H_0)}$$

Die *odds ratio* wird in der Regel als dekadischer Logarithmus angegeben. Dieser wird als *lod score* (*logarithm of the odds*)  $Z$  bezeichnet und ist folgendermaßen definiert:

$$Z(\hat{\theta}) = \log R = \log \left[ \frac{L(\hat{\theta})}{L(0,5)} \right] \quad \text{mit } 0 < \hat{\theta} < 0,5$$

In der Kopplungsanalyse wird für verschiedene Werte von  $\theta$  zwischen 0 und 0,5 eine Reihe solcher *lod scores* berechnet und das Ergebnis in einer Tabelle dargestellt. Ein positiver *lod score* von +3 entspricht einer *odds ratio* von 1.000:1 und gilt als Signifikanzschwelle für die Annahme der Alternativ-Hypothese, d.h. Kopplung zweier Lozi. Dagegen gilt ein negativer *lod score* kleiner -2 als signifikanter Ausschluss einer Kopplung (OTT 1991). Der Wert von  $\theta$  aus dem der Maximalwert der kalkulierten *lod scores* resultiert, gilt als beste Schätzung für die Rekombinationsfraktion und damit für den Abstand zweier Marker. Daraus wurde auch der Begriff der *maximum likelihood*-Methode abgeleitet. Ein Vorteil bei der Berechnung von *lod scores* ergibt sich aus der Möglichkeit die Einzelscores verschiedener Familien zu einem Gesamt-*lod score* zu addieren. Somit können auch durch die Analyse mehrerer kleiner Familien signifikante *lod scores* errechnet werden. Generell werden zwei Arten von *likelihood*-Berechnungen in der Kopplungsanalyse eingesetzt, die

Zwei-Punkt- und die Mehr-Punkt-Kopplungsanalyse. Während bei der Zwei-Punkt-Analyse jeweils zwei Lozi (i.d.R. Krankheitsloкус gegen polymorphen Marker) betrachtet werden, werden bei der Mehr-Punkt-Analyse mehrere Lozi simultan untersucht. Bei einer Zwei-Punkt-Kopplungsanalyse muss die chromosomale Anordnung der untersuchten Lozi bekannt sein. Die Mehr-Punkt-Kopplungsanalyse ermöglicht dagegen die Ermittlung der chromosomalen Anordnung der untersuchten Lozi. Dies erfordert jedoch einen stark erhöhten Rechenaufwand. Da die chromosomale Anordnung der in dieser Arbeit verwendeten Marker bereits bekannt ist, werden nur Zwei-Punkt-Kopplungsanalysen durchgeführt. Die Berechnung der *lod scores* erfolgt mit dem Programm MLINK aus dem LINKAGE Version 5.1 Programmpaket (LATHROP *et al.* 1985).

#### 7.4.1.2 Wahrscheinlichkeitsberechnung für *haplotype sharing*

Mit Hilfe des Theorems von Bayes wird die Wahrscheinlichkeit  $p_c$  eines gemeinsamen krankheitsassoziierten Haplotypen (*haplotype sharing*) der drei analysierten NCMD/CAPED-Familien (Familien L, A und W) ermittelt. Dabei gilt:

$$p_c = \frac{1}{(ab + a + b + 1)}$$

Hierbei steht  $a$  für die Wahrscheinlichkeit eines zufälligen gemeinsamen Haplotypen zwischen Familie L und A und  $b$  für die Wahrscheinlichkeit eines zufälligen gemeinsamen Haplotyps zwischen Familie L und W. Da die Wahrscheinlichkeit eines gemeinsamen Haplotypen von der Häufigkeit dieses Haplotypen in der allgemeinen Bevölkerung abhängt, müssen die Allelfrequenzen der einzelnen Lozi berücksichtigt werden.

#### 7.4.2 Analyse von Einzelstrang-Konformationspolymorphismen (SSCP)

Mit Hilfe der Konformationsanalyse einzelsträngiger DNA (*single-strand conformational polymorphism analysis*, SSCP) können Sequenzveränderungen nachgewiesen werden (ORITA *et al.* 1989). Dabei nutzt man die Tatsache, dass einzelsträngige DNA zur Faltung und Ausbildung komplexer, durch Wasserstoffbrücken stabilisierten, Strukturen neigt. Diese Strukturen werden unter nicht-denaturierenden Bedingungen nur aufgrund ihrer (sequenzabhängigen) Konformation und nicht aufgrund ihrer Länge elektrophoretisch aufgetrennt. Sequenzvarianten zeigen dabei ein verändertes Laufverhalten (*mobility shift*). Das Auflösungsvermögen ist auf maximal 300 bp begrenzt, weshalb größere DNA-Fragmente zuvor mit einem geeigneten Restriktionsenzym gespalten werden müssen. Die Detektionsrate liegt in der Regel bei über 80% (HAYASHI & YANDELL 1993). Für die SSCP-Analyse werden die zu untersuchenden DNA-Abschnitte in einer Standard-PCR-Reaktion unter Zugabe von 0,1  $\mu$ l  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dCTP amplifiziert. PCR-Produkte

< 300 bp werden mit 10 Vol ddH<sub>2</sub>O verdünnt und 1:1 mit Stop-Puffer versetzt. Bei PCR-Produkten > 300 bp werden 5 µl PCR-Produkt in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit dem entsprechenden Restriktionsenzym gespalten und anschließend mit 1 Vol PAA-Puffer versetzt. Zur einfachen Identifikation der Doppelstrangbande wird ein Aliquot einer Probe pro Gel nicht denaturiert. Die Proben werden bei 95°C für 5 min denaturiert und auf Eis gestellt. Die Proben werden in nativen 6% PAA-Gelen aufgetrennt. Zur Erhöhung der Detektionsrate werden die Gele jeweils mit und ohne Zusatz von 5% Glycerin hergestellt. Die Bildung von Glycerin-Borationen-Komplexen führt zu einer Senkung des pH-Wertes, welcher aufgrund einer Unterdrückung der Phosphatreste-Ladung der DNA die Ausbildung von Tertiärstrukturen begünstigen könnte. Die Elektrophorese erfolgt unter beiden Bedingungen in 0,5× TBE-Puffer bei 25 W in einem Kühlraum bei 4°C. Das Gel wird anschließend getrocknet und bei RT exponiert.

### **7.4.3 Isolierung von Sequenzfragmenten durch Inter-Alu-PCR**

Im menschlichen Genom befinden sich eine Vielzahl kurzer repetitiver Sequenzelemente (*short interspersed nuclear elements*; SINEs). Der bekannteste Vertreter dieser Klasse von repetitiven Sequenzen ist die *Alu*-Familie, benannt nach einer Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Alu* I, welche sich etwa in der Mitte dieser etwa 300 bp großen Elemente befindet. Mit einer Kopienzahl von etwa  $7,5 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  sind *Alu*-repeats die häufigste Sequenz im menschlichen Genom (DEININGER 1989). Dieses besteht aus einem tandemförmig wiederholten Dimer von etwa 120 bp, welchem ein kurzer poly(A)-Rest folgt. Aufgrund statistischen Verteilung befindet sich etwa alle 4 kb ein solches *Alu*-Element. Dieser Umstand wird bei der Inter-Alu-PCR genutzt um die nicht-repetitiven Sequenzen zwischen den *Alu*-repeats durch PCR zu amplifizieren. Mit Hilfe der Oligonukleotid-Primer Alu1 und Alu2 wird hierzu eine Standard-PCR-Reaktion durchgeführt (Anhang B und J). Verwendet man als Matrizen-DNA bereits kartierte YAC- oder PAC Klone, so kann man auf diese Art und Weise sequenzmarkierte Stellen (*sequence-tagged sites*; STSs) isolieren. Diese können dann für Kartierungen verwendet werden.

### **7.4.4 Isolierung von YAC-Endfragmenten durch ligationsvermittelte PCR**

Um YAC-Insertionsenden zu isolieren, wird die ligationsvermittelte PCR-Methode nach KERE *et al.* (1992) angewendet. Durch Kopplung eines doppelsträngigen Oligonukleotid-Linkers an zuvor restriktionsverdaute YAC-DNA können in einer anschließenden PCR-Reaktion, mit Hilfe eines vom YAC-Vektor und eines vom Linker abgeleiteten Primers, terminale Insertionsfragmente mit einer Größe von bis zu 2 kb amplifiziert werden.

#### 7.4.4.1 Restriktionsverdau der Hefe-DNA

Für die erfolgreiche Amplifizierung von spezifischen YAC-Enden wird eine glatte Restriktions-Schnittstelle in der Nähe des Insertionsendes benötigt. Dazu werden 12 µg YAC-DNA in einem Volumen von 18 µl jeweils mit den häufig schneidenden Enzymen *Alu I* und *Rsa I* gespalten. Alternativ können auch die Enzyme *Eco RV*, *Hinc II*, *Pvu II* oder *Nru I* verwendet werden.

#### 7.4.4.2 Ligation von doppelsträngigen Linker-Molekülen

Der doppelsträngige Oligonukleotid-Linker wird aus den unphosphorylierten Oligonukleotiden LIS1 und LIS2 hergestellt. Dazu werden jeweils 200 µM der beiden Oligonukleotide mit 60 µl ddH<sub>2</sub>O gemischt und für 5 min auf 80°C erhitzt. Durch Inkubation bei 49°C für 30 min erfolgt die Anlagerung der Oligonukleotide. Die so hergestellten Linker-Moleküle können direkt weiter verwendet oder bei -20°C gelagert werden. Zur Kopplung des Linkers werden 14 µl des obigen Restriktionsansatzes mit 1 µl Linker (2 µM), 4 µl 5× Ligations-Puffer und 1 µl T4 DNA Ligase (1 U/µl) versetzt und bei RT mindestens 1 h inkubiert. Durch Erhitzen des Ansatzes auf 94°C für 15 min wird die Ligase inaktiviert.

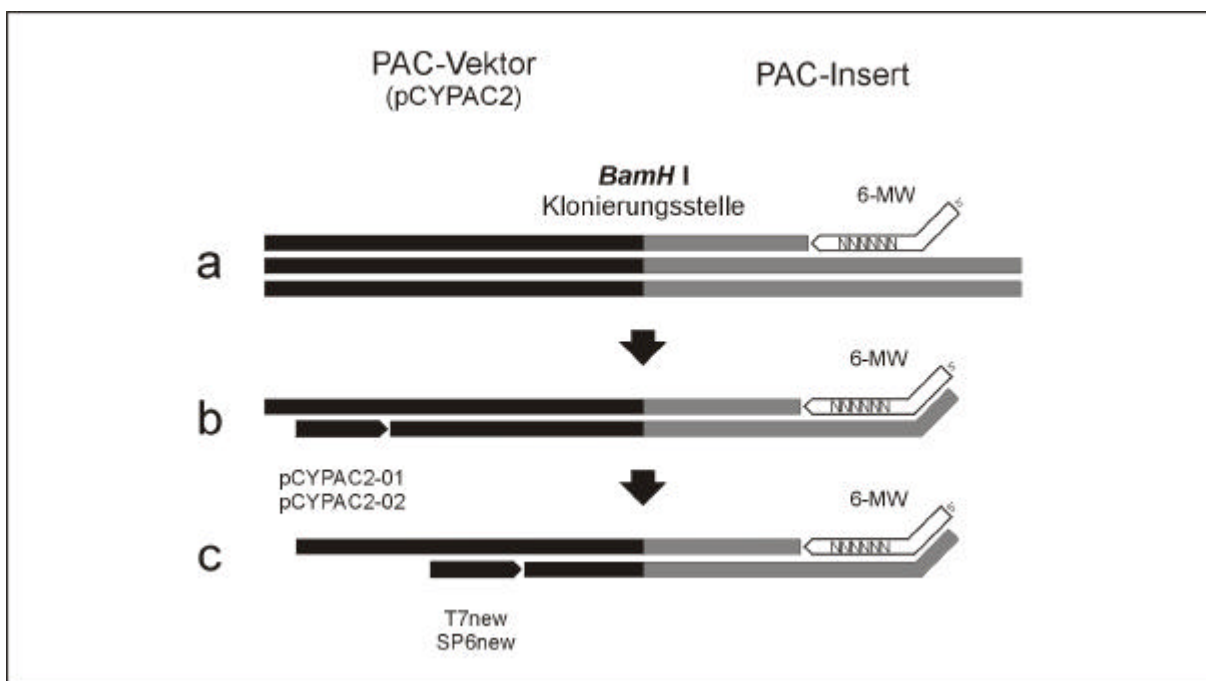
#### 7.4.4.3 PCR-Amplifikation der Insertionsenden

Mit Hilfe zweier unabhängiger PCR-Reaktionen werden 0,5 µl des Ligationsansatzes mit 1 pmol LIS1 und 10 pmol des linken (UL) bzw. rechten (UR) YAC-Vektor-Primers amplifiziert. Die Auffüllreaktion der *Taq*-Polymerase erfolgt bei 72°C für 2 min. Durch eine anschließende verschachtelte PCR wird die Spezifität der Reaktion erhöht. Hierzu wird das erhaltene PCR-Produkt mit 100 Vol ddH<sub>2</sub>O verdünnt, und mit jeweils 5 µM LS2 ( 230 bp) bzw. RA2 ( 112 bp) reamplifiziert. Produkte größer als 150 bp werden isoliert und als STS weiterverwendet.

#### 7.4.5 Isolierung von PAC-Endfragmenten durch DOP-Vektor PCR

Die Verwendung von teilweise degenerierten Oligonukleotid-Primern (*degenerate oligonucleotide primer*", DOP) ermöglicht eine repräsentative PCR-Amplifizierung einer beliebigen Ausgangs-DNA (TELENIUS *et al.* 1992). In Verbindung mit vektorspezifischen Primern können so terminale Sequenzen aus PAC-Klonen isoliert werden (WU *et al.* 1996). Der prinzipielle Reaktionsablauf ist in Abbildung 11 dargestellt. Die Anlagerung des teilweise degenerierten Primers 6MW, die nachfolgende DNA-Synthese und eine erste PCR-Amplifikation mit vektorspezifischen Primern erfolgt in einem

Reaktionsansatz. Dazu wird 1 µl PAC-DNA (100 ng) in 47 µl eines Reaktionsgemisches aus 10 µM 6-MW, 1× PCR-Puffer, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> und 100 µM dNTPs, bei 94°C für 1 min denaturiert und vor Zugabe von 1 U *Taq*-Polymerase auf 85°C abgekühlt. In zwei aufeinanderfolgenden Zyklen bei 30°C für 1 min und 72°C für 2 min kann sich der Primer 6-MW an beliebige Stellen der PAC-DNA anlagern und als Ausgangspunkt für die Synthese von komplementären DNA-Strängen dienen (Abbildung 11a). Bei 72°C werden dann 0,6 µM der PAC-Vektor-Primer pCYPAC2-01 bzw. -02 zugegeben und die Amplifikation in 25 Zyklen bei 94°C, 54°C und 72°C für jeweils 30 sec durchgeführt (Abbildung 11b). Die Spezifität der Reaktion kann durch eine zweite PCR mit den verschachtelten Primern T7new bzw. SP6new erhöht werden. Für diese werden 1 µl des 1:100 verdünnten ersten PCR-Produktes mit je 10 µM 6-MW und T7new bzw. SP6new eingesetzt (Abbildung 11c). Aliquots aus beiden PCR-Reaktionen werden auf einem Agarose-Gel analysiert. Spezifische PCR-Produkte der geschachtelten PCR sind 75 bp (pCYPAC2-01; T7new) bzw. 103 bp (pCYPAC2-02; SP6new) kleiner als die der ersten PCR. Diese werden aus der Agarose isoliert und als STS verwendet.



**Abb. 11: DOP-Vektor PCR zur Isolierung terminaler PAC-Insertionssequenzen**

**a,** Anlagerung des teilweise degenerierten Primers 6-MW und Synthese des komplementären DNA-Strangs. Zur besseren Übersicht ist nur eine Anlagerungsstelle gezeigt. **b,** Erste PCR-Amplifizierung mit 6-MW und den PAC-Vektor-Primern pCYPAC2-01/-02. **c,** Verschachtelte PCR mit den intern gelegenen Vektor-Primern T7new bzw. SP6new.

#### 7.4.6 Reverse Transkriptase (RT)-PCR

Die RT-PCR ermöglicht die Analyse transkribierter Sequenzen. Mit Hilfe der RT-PCR können z.B. RNA-Sequenzabschnitte kloniert, oder deren Expressionsmuster bestimmt werden. Als Matrize bei der RT-PCR dient komplementäre DNA (cDNA).

#### 7.4.6.1 Synthese des cDNA-Erststranges

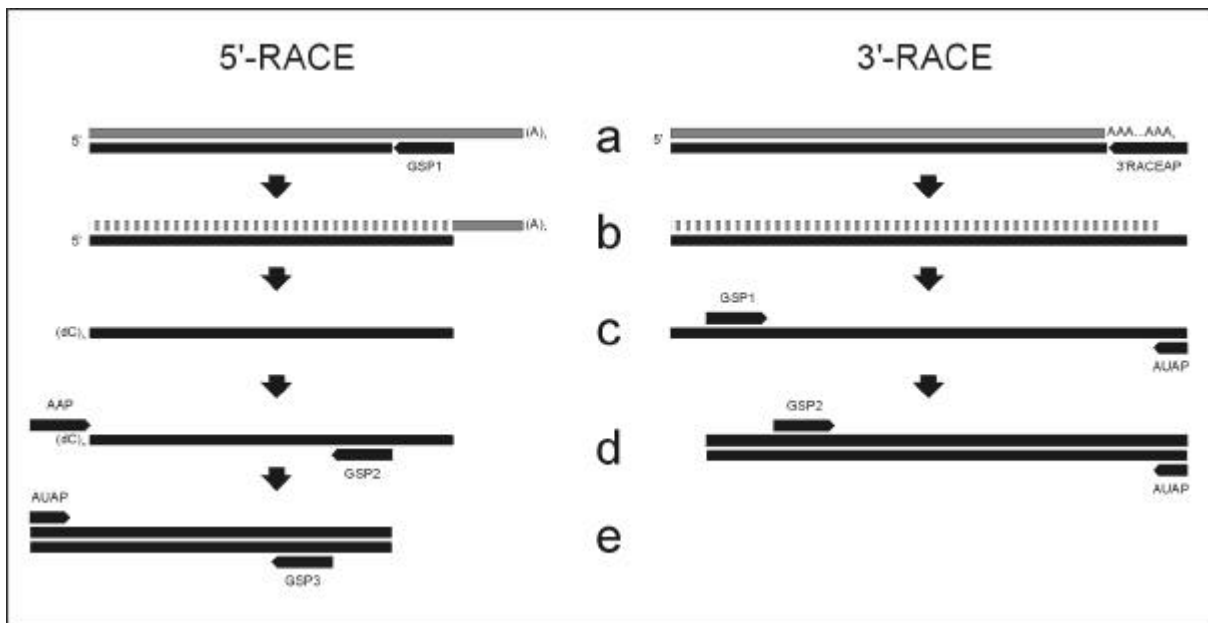
Für die Synthese von erststrängiger cDNA wurde die SUPERSCRIPT™ II RNase H Reverse Transkriptase (Life Technologies) verwendet. Zu 15 µg Gesamt-RNA in 12 µl DEPC-H<sub>2</sub>O wird 1 µl Oligo(dT)<sub>12-15</sub> (0,5 µg/µl) gegeben und vorsichtig gemischt. Um die Anlagerung des Oligo(dT)<sub>12-15</sub>-Primers an das Poly(A)-Ende der zu 1-2% enthaltenen Poly(A)<sup>+</sup>-mRNA zu ermöglichen, wird der Ansatz bei 70°C für 10 min erhitzt und danach 5 min auf Eis gestellt. Anschließend werden 4 µl 5× Erststrang-Puffer, 1 µl 10 mM dNTP-Mix und 2 µl 0,1 M DTT zugegeben und der Ansatz für 5 min auf 42°C temperiert. Nach Zugabe von 1 µl SUPERSCRIPT™ II RNase H Reverse Transkriptase (200 U) wird der Ansatz für 50 min bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Erhitzen auf 70°C für 15 min beendet. Nach der erfolgten Erststrang-Synthese wird die Matrizen-RNA durch Zugabe von 1 µl *E.coli* RNase H (2 U) bei 37°C für 20 min abgebaut. Von der so erhaltenen Erststrang-cDNA werden 0,5-1 µl für eine Standard-PCR-Reaktion eingesetzt.

#### 7.4.6.2 Nachweis intakter cDNA

Zur Überprüfung der Synthesequalität der Erststrang-cDNA wird mit dieser eine PCR, mit den aus Exon 6 und 7 des  $\beta$ -Glucuronidase-Gens (*GUSB*) stammenden Oligonukleotid Primern GUS B6F und GUS B7R, durchgeführt (siehe Anhang B, J).

#### 7.4.7 Schnelle Vervielfältigung von cDNA-Enden (RACE-PCR)

EST-Klone oder Klone aus cDNA-Banken repräsentieren nur selten ein vollständiges Transkript. Ursache hierfür ist die Art und Weise wie solche Klone isoliert werden. Häufig wird für die Strangsynthese ein Oligo(dT)-Primer verwendet, welcher am Poly(A)-Rest der mRNA bindet. Bei relativ großen Transkripten fehlen dann häufig die Sequenzen am 5'-Ende des Klones. Dagegen führt die Verwendung von zufällig bindenden Primern häufig zu einer Unterrepräsentation der 3'-Enden eines Transkriptes. Ausgehend von den bereits bekannten Sequenzen eines Transkriptes können mit Hilfe der RACE-PCR (*rapid amplification of cDNA ends*-PCR) die fehlenden Enden isoliert werden. Je nachdem welches Ende eines Transkript bestimmt werden soll, spricht man von 5'- bzw. 3'-RACE-PCR. Abbildung 12 zeigt die prinzipielle Vorgehensweise.



**Abb. 12: Schematischer Ablauf der 5'- bzw. 3'-RACE**

**5'-RACE:** **a**, Anlagerung des sequenzspezifischen Oligonukleotid-Primers (GSP1) und Synthese des cDNA Erststranges. **b**, Abbau des mRNA Matrizenstranges durch Zugabe von RNase H. **c**, Anhängen des Poly(dC)-Schwanzes. **d**, PCR Amplifikation mit dem an den Poly(dC)-Schwanz bindenden Anker-Primer AAP und einem zweiten, verschachtelten Primer (GSP2). **e**, Erhöhung von Spezifität und Ausbeute durch eine anschließende verschachtelte PCR mit den Primern AUAP und GSP3.

**3'-RACE:** **a**, Anlagerung des Oligonukleotid-Primers 3'RACEAP an das poly(A)-Ende der mRNA. **b**, Abbau des mRNA Matrizenstranges durch Zugabe von RNase H. **c**, PCR Amplifikation mit einem sequenzspezifischen Primer GSP1 und dem an die Restriktionskassette von 3'RACEAP bindenden Primer AUAP. **d**, Erhöhung von Spezifität und Ausbeute durch eine anschließende verschachtelte PCR mit den Primern GSP2 und AUAP.

#### 7.4.7.1 5'-RACE-PCR

Für die Durchführung der 5'-RACE-PCR wurde das 5' RACE System, Version 2.0 (Life Technologies) verwendet. Für die Synthese des cDNA-Erststranges wurde ein sequenzspezifischer Oligonukleotid-Primer (*gene specific primer 1*, GSP1) verwendet. Nach anschließender Reinigung des erhaltenen cDNA-Erststranges mit Hilfe eines Kieselsäure-Gels (siehe Abschnitt 4.3.3) wird am 5'-Ende der cDNA mit Hilfe der Terminalen Transferase (TdT) ein Poly(dC)-Schwanz erzeugt. Hierzu wird 10 µl gereinigte cDNA mit 5 µl 5× Tailing-Puffer, 2,5 µl 2,5 mM dCTP und 6,5 µl ddH<sub>2</sub>O gemischt, 2 min bei 94°C erhitzt und auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 1 µl TdT wird der Ansatz bei 37°C für 10 min im Wasserbad inkubiert und die Reaktion bei 65°C, 10 min gestoppt. Mit 5 µl der so erhaltenen Poly(dC)-cDNA wird eine Standard-PCR-Reaktion mit 20 µM eines verschachtelten Oligonucleotid-Primers GSP2 und 20 µM des an den Poly(dC)-Schwanz bindenden Primers AAP durchgeführt. Zur Erhöhung von Spezifität und Ausbeute wird eine 1:100 Verdünnung der ersten PCR und je 10 µM eines dritten verschachtelten Primers GSP3 und dem an die Restriktionsschnittstellen von AAP bindenden Primers AUAP für eine erneute PCR eingesetzt. Diese wird zusammen mit der ersten PCR auf ein Agarose-Gel

aufgetragen. Spezifische PCR-Produkte werden aus dem Gel extrahiert, in den pCR™2.1-Vektor kloniert und die Sequenz bestimmt.

#### **7.4.7.2 3'-RACE-PCR**

Die 3'-RACE-PCR wurde mit Hilfe des 3'-RACE Systems (Life Technologies) durchgeführt. Die Synthese des cDNA-Erststranges erfolgt mit Hilfe des Primers 3'RACEAP. 2 µl der so erhaltenen cDNA wird in eine Standard-PCR-Reaktion mit einem sequenzspezifischen Primer GSP1 und dem Restriktionskassetten-spezifischen Primer AUAP durchgeführt. Bei Bedarf kann diese PCR mit einer 1:100 Verdünnung der ersten PCR-Reaktion und einem zweiten verschachtelten Primer GSP2 wiederholt werden. Zur Sequenzbestimmung werden spezifische PCR-Produkte aus dem Gel extrahiert und in den pCR™2.1-Vektor kloniert.

### **8. DNA Sequenzanalyse**

Zur Bestimmung der Basenabfolge in DNA-Fragmenten wird die Didesoxy-Methode nach SANGER *et al.* (1977) verwendet. Hierbei erfolgt eine enzymatische Kettenverlängerung von einer definierten Startsequenz aus. Durch Zugabe jeweils eines 2'-3'-Didesoxynukleosid-5'-triphosphats (ddNTP) zu den vier zur DNA-Synthese benötigten Desoxyribonukleotiden (dNTPs), kommt es zu einem Kettenabbruch, sobald ein ddNTP anstelle eines dNTPs eingebaut wird. Den ddNTPs fehlt die 3'-OH-Gruppe, die zur Kettenverlängerung nötig ist. Dies führt dazu, dass man ein Gemisch von DNA-Fragmenten mit identischem 5'-Ende erhält. Diese werden auf einem denaturierenden 6%-igem PAA-Gel aufgetrennt. Nach der Autoradiographie kann man die Sequenz in 5'→3'-Richtung von unten nach oben ablesen. Die radioaktive Markierung der Fragmente kann auf unterschiedliche Art und Weise erfolgen.

#### **8.1 Sequenzanalyse mit [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]-dATP**

Für die Sequenzierung mit [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]-dATP wird das Sequenase™ Version 2.0 DNA Sequencing Kit von USB, Cleveland (USA) verwendet. Für die Bestimmung der Nukleotidabfolge ist es essentiell, dass die DNA als Einzelstrang vorliegt. Darüber hinaus benötigt die verwendete DNA-Polymerase einen Oligonukleotidprimer als Ansatzstelle. Etwa 1-4 µg des zu sequenzierenden DNA-Fragments wird mit 10 µM eines Oligonukleotid-Primers in einem Volumen von 10 µl für 3 min auf 94°C erhitzt und danach sofort auf Eis gestellt. Dabei wird der DNA-Doppelstrang getrennt und der Primer kann sich an die Startstelle anlagern. Pro Sequenzierungsreaktion werden jeweils 2,5 µl der verschiedenen Terminationsgemische (ddG-, ddA, ddT-, ddC-Mix) vorgelegt. Für die Kettenverlängerungsreaktion werden pro



Ansatz 2  $\mu\text{l}$  5 $\times$  Reaktionspuffer, 1  $\mu\text{l}$  0,1 M DTT, 0,4  $\mu\text{l}$  5 $\times$  Markierungs-Mix, 1,6  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O, 0,5  $\mu\text{l}$  [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]dATP und 0,25  $\mu\text{l}$  Sequenase™ (1,6 U/ $\mu\text{l}$ ) zugegeben und bei RT für 5 min inkubiert. Die vorgelegten Terminationsgemische werden ca. 1 min bei 37°C vorgewärmt. Anschließend gibt man je 3,5  $\mu\text{l}$  des Elongationsansatzes dazu und inkubiert 8 min bei 37°C. Durch Zugabe von je 4  $\mu\text{l}$  Stopp-Puffer wird die Reaktion beendet. Jeweils 3-4  $\mu\text{l}$  werden auf einem denaturierenden 6%-igem PAA-Gel aufgetrennt.

## 8.2 Zyklische Sequenzierung mit [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]-ddNTPs

Bei der zyklischen Sequenzierung (*cycle sequencing*) handelt es sich um eine Weiterentwicklung der oben beschriebenen Sequenzierung durch Kettenabbruch. Der Einsatz der thermostabilen Thermo Sequenase™ ermöglicht, in Anlehnung an die PCR-Technik, eine zyklische Wiederholung der Sequenzierreaktion. Dadurch kann auch die Basenabfolge von sehr gering konzentrierter Ausgangs-DNA (ab 50 ng) bestimmt werden. In dieser Arbeit wird hierzu das Thermo Sequenase™ radiolabeled terminator cycle sequencing kit (Amersham, Life Science) verwendet. Für jedes zu sequenzierende DNA-Fragment werden vier Terminationsgemische hergestellt. Diese enthalten jeweils 2  $\mu\text{l}$  Nukleotid-Mix und je 0,5  $\mu\text{l}$  des entsprechenden [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]-ddNTPs. Anschließend werden in einem Volumen von 20  $\mu\text{l}$  auf Eis zu 50-500 ng DNA, 2  $\mu\text{l}$  10 $\times$  Reaktions-Puffer, 2,5  $\mu\text{M}$  Oligonukleotid-Primer und 4 U Thermo Sequenase™ gegeben. Je 4,5  $\mu\text{l}$  des Reaktionsgemisches werden mit je 2,5  $\mu\text{l}$  Terminationsgemisch gemischt und analog zur PCR in einem Thermocycler 30-40 Zyklen bei 95°C, 30 sec, 55°C, 30 sec und 72°C, 60 sec inkubiert. Die Ansätze werden mit je 4  $\mu\text{l}$  Stopp-Puffer versetzt und je 3-4  $\mu\text{l}$  auf ein denaturierendes 6%-iges PAA-Gel aufgetragen.

## 8.3 Sequenzierung von PCR-Produkten

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden ebenso wie bei der Sequenzierreaktion dNTPs, sowie Oligonukleotid-Primer eingesetzt. Da diese auch nach der PCR noch reichlich im Reaktionsansatz vorhanden sind, müssen sie vor einer Sequenzierung entfernt werden. Dazu kann das zu sequenzierende PCR-Produkt mit Hilfe eines Kieselsäure-Gels gereinigt werden. Alternativ kann die Reinigung auch enzymatisch erfolgen. Die alkalische Phosphatase aus der Garnele (*shrimp alkaline phosphatase*, SAP) entfernt die überschüssigen dNTPs durch Abspaltung der 5'-Phosphatreste, und die Exonuklease I spaltet einzelsträngige DNA, wie die in der Lösung verbliebenen freien Oligonukleotid-Primer. Da diese beiden Enzyme im PCR-Puffer aktiv sind, kann man den PCR-Reaktionsansatz direkt für die folgende Reaktion verwenden. Zu 5  $\mu\text{l}$  PCR-Ansatz gibt man 0,5  $\mu\text{l}$  Exonuklease I (1 U/ $\mu\text{l}$ ) und 0,5  $\mu\text{l}$  SAP (1 U/ $\mu\text{l}$ ) und inkubiert für 15 min bei 37°C. Zur Inaktivierung der

beiden Enzyme erhitzt man für 15 min auf 80°C. Die DNA kann nun direkt für die Sequenzierreaktion eingesetzt werden.

#### **8.4 Sequenzierung von Plasmid-DNA**

Bei der Sequenzierung von Plasmid-DNA gibt man zu 3-7 µg DNA, 2 µl 2M NaOH, sowie 10 µM Primer, zu einem Volumen von 10 µl und denaturiert 10 min bei 65°C. Nach Zugabe von 3 µl 3M KOAc, pH 5 und 8 µl ddH<sub>2</sub>O präzipitiert man die DNA durch Ethanol-fällung und wäscht nochmals in 70% EtOH. Das getrocknete Pellet wird in 10 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und direkt in die Sequenzierreaktion eingesetzt.

### **9. Identifikation spezifischer DNA-Fragmente aus DNA-Banken**

#### **9.1 Ausplattieren einer retinalen λ-Phagen-cDNA-Bank**

Im Rahmen dieser Arbeit wird die bereits amplifizierte, retinale λ-Phagen-cDNA-Bank λgt10 HRET (hergestellt von J. Nathans, Johns Hopkins University, Baltimore, USA) verwendet. Die angegebene Komplexität beträgt  $5 \times 10^{10}$  pfu/ml. Für die Isolierung einzelner cDNA-Klone wird die Bank ausplattiert und auf Nylonmembranen übertragen, welche mit spezifischen DNA-Proben hybridisiert werden können. Um eine optimale Verteilungsdichte der Phagenklone zu ermitteln, wird eine Verdünnungsreihe ( $10^{-2}$  bis  $10^{-7}$ ) ausplattiert. Dazu wird mit einem einzelnen *E. coli* Y1090r<sup>-</sup>-Klon 25 ml LB-Medium (+ 0,2% Maltose, 10 mM MgSO<sub>4</sub>) beimpft und über Nacht bei 37°C auf einem Rundschüttler inkubiert. Die durch Zentrifugation (3.000 UpM, 10 min, RT) sedimentierten Zellen werden in 20 ml SM-Puffer resuspendiert und können bei 4°C mehrere Tage aufbewahrt werden. Zu je 600 µl der Bakteriensuspension werden je 10 µl der in SM-Puffer verdünnten Phagenlysate gegeben und bei 37°C für 15 min im Wasserbad inkubiert. Anschließend werden 10 ml temperierter (ca. 50°C) Topagar zugegeben, vorsichtig gemischt und gleichmäßig auf eine LB-Agarplatte gegossen. Nachdem der Topagar ausgehärtet ist werden die Platten bei 37°C über Nacht inkubiert. Für die Bestimmung des Phagentiters wird die Anzahl der vorhandenen Plaques ermittelt. Um auch die Repräsentanz von relativ seltenen Transkripten zu gewährleisten, werden etwa  $10^6$  Klone ausplattiert. Dazu werden auf sieben Bio-Assay Dishes (Nunc) jeweils 165.000-180.000 Klone ausplattiert. Diese werden auf jeweils zwei Nylonmembranen übertragen (siehe Abschnitt 6.1.3). Durch Hybridisierung identifizierte Klone werden ausgeschnitten, in SM-Puffer gegeben und mindestens 1 h bei 4°C inkubiert. Der Phagenüberstand wird anschließend so verdünnt, dass je 250-300 Klone pro Ansatz auf einer Petrischale (Ø 135 mm) ausplattiert werden. Die Klone werden auf eine Nylonmembran übertragen, welche mit der ursprünglichen Hybridisierungsprobe erneut

hybridisiert wird. Positive Klone werden als einzelnes Plaque isoliert und die DNA wie beschrieben isoliert.

## **9.2 CEPH YAC-Bank**

Die CEPH YAC-Bank enthält das 7-fache Äquivalent des humanen haploiden Genoms (ALBERTSEN *et al.* 1990). Die durchschnittliche Größe der 50.000 Klone dieser Bank beträgt etwa 430 kb. Diese sind auf 96-Loch-Mikrotiterplatten verteilt. Die Bezeichnung eines einzelnen YAC-Klons erfolgt über die jeweilige Plattennummer und die entsprechende Koordinate in dieser Platte (z.B. 806\_C\_12). Durch diese einheitliche Bezeichnung aller Klone ist eine eindeutige Identifizierung eines bestimmten Klons möglich. YACs aus der CEPH YAC-Bank können vom RZPD (Ressourcen Zentrum/Primär Datenbank)<sup>2</sup>, Berlin als Stichagarkultur bezogen werden.

## **9.3 RPCI-humane PAC-Bank**

Die RPCI-humane PAC-Bank besteht aus vier Segmenten (RPCI-1, 3-5) von denen jedes drei bis sechs Äquivalente des menschlichen Genoms umfasst. Die Ausgangs-DNA wurde aus humanen Lymphozyten gewonnen. Die durchschnittliche Größe der klonierten DNA beträgt etwa 110-120 kb. Als Klonierungsvektor dient pCYPAC2, welcher eine Kanamycinresistenz besitzt. Die Identifikation positiver Klone erfolgt über *high-density*-Hybridisierungsfilter mit jeweils ca. 18.000 doppelt gestempelten Klonen. Ähnlich wie bei den CEPH-YAC-Klonen werden die RPCI-PAC-Klone mit Hilfe ihrer Plattennummer und den XY-Koordinaten eindeutig bezeichnet. Eine Kopie der RPCI-1-Bank steht am Institut für Humangenetik, Würzburg in Form von Glycerinstocks in 384-Loch-Mikrotiterplatten (Plattennummer 1 bis 321) zur direkten Isolierung der PAC-Klone zur Verfügung. Darüber hinaus können Klone der Segmente RPCI-3 und RPCI-4 (Plattennummern 322-816) mit Hilfe von Hybridisierungsfiltern identifiziert werden und über das RZPD, Berlin erhalten werden.

## **9.4 LLNLP humane Chromosom 2 spezifische PAC-Bank**

Die LLNLP humane Chromosom 2 spezifische PAC-Bank besteht aus 5.800 Klonen im Vektor pCYPAC2. Die klonierte DNA stammt aus der Mensch-Hamster Hybrid-Zelllinie GM10826 (GINGRICH *et al.* 1996). Der Vorteil dieser Bank besteht in der Chromosomen Spezifität der darin enthaltenen Klone. Allerdings sind in den allgemeinen Datenbanken, im Gegensatz zu den RPCI-PACs, keine Informationen zu diesen Klonen vorhanden. Klone die

---

<sup>2</sup> <http://www.rzpd.de/>

über Filterhybridisierungen als positiv identifiziert werden, können über das RZPD, Berlin bezogen werden.

## 10. RNA *in situ*-Hybridisierung an Paraffinschnitten

Die RNA *in situ*-Hybridisierung eignet sich zur Analyse der räumlichen Verteilung eines Transkriptes in einem bestimmten Gewebe. Dazu wird einzelsträngige, zur zellulären mRNA komplementäre (*antisense*) RNA markiert und als Hybridisierungssonde verwendet. Eine dazu komplementäre RNA (*sense*) dient als Negativkontrolle. Die Markierung erfolgt hierbei über den Einbau von Digoxigenin-markiertem UTP bei einer *in vitro*-Transkription, welches durch Alkalische-Phosphatase-gekoppelte Antikörper in einer Farbreaktion nachgewiesen werden kann. Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in situ*-Hybridisierungen wurden an fixierten und in Paraffin eingebetteten Schnitten von Mäuseaugen durchgeführt.

### 10.1 Herstellung von Gewebeschnitten

Als Ausgangsmaterial dienen Augen von verschiedenen Mauslinien (Charles River Laboratories). Die Tiere werden durch CO<sub>2</sub>-Asphyxiation und anschließende cervikale Dislokation getötet, die Augäpfel entnommen und über Nacht in 4%PFA/PBS bei 4°C fixiert. Das so fixierte Gewebe wird zweimal für 10 min in 1× PBS und einmal für 10 min in 0,9% NaCl gewaschen. Anschließend wird es in einer ansteigenden Isopropanolreihe (30%, 50%, 70%, 85%, 95%, zweimal 100%) für je 2 h dehydriert und über ein äquimolares Isopropanol-Chloroform-Gemisch in Chloroform als Zwischenmedium überführt. Danach werden die Augäpfel bei 60°C in Chloroform:Paraffin gegeben und in einem offenen Falconröhrchen über Nacht inkubiert. Anschließend wird das Gewebe dreimal für je 2 h in flüssiges Paraffinwachs gegeben und schließlich mit Hilfe einer Gießform in einen Paraffinblock eingebettet und bei 4°C gelagert. Mit Hilfe eines Mikrotoms werden 7 µm dicke Schnitte hergestellt. Diese werden auf Polylysin-beschichtete Objektträger aufgezogen, über Nacht bei 42°C getrocknet und bei 4°C gelagert.

<b>10× PBS</b>	1,37 M	NaCl
	27 mM	KCl
	81 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	17,6 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

### 10.2 Herstellung und Markierung der RNA-Sonde

Für die Herstellung von RNA-Sonden müssen die zu analysierenden Sequenzen bzw. Gene in Plasmidvektoren mit RNA-Polymerase Bindungsstellen (T3,- T7- oder SP6-Promotoren)

kloniert werden. Durch die Sequenzierung der Klonierungsstellen wird die Orientierung der klonierten DNA bestimmt. Die Synthese der Hybridisierungssonde (*antisense*) und der komplementären (*sense*) Negativkontrolle erfolgt von den entgegengesetzt angeordneten RNA-Polymerase Bindungsstellen.

### 10.2.1 Linearisierung der Plasmid-DNA

Damit die anschließende *in vitro*-Transkription auf die klonierte Sequenz beschränkt bleibt (*run-off*-Transkript), wird die Plasmid-DNA unmittelbar neben der Klonierungsstelle linearisiert. Dazu werden je 1 µg Plasmid-DNA in einem Volumen von 100 µl mit dem entsprechenden Restriktionsenzym geschnitten und der Reaktionsansatz anschließend durch PCI-Extraktion gereinigt. Zum Fällern werden 3 Vol EtOH und 0,1 Vol 2 M NH<sub>4</sub>OAc zugegeben und bei 13.000 UpM, 25 min, RT zentrifugiert. Danach wird die gefällte DNA in 70% EtOH gewaschen, kurz unter Vakuum getrocknet und in 16 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen. Zur Kontrolle der erfolgreichen Linearisierung werden 3 µl auf einem Agarose-Gel aufgetrennt.

### 10.2.2 Markierung der RNA-Sonde durch *in vitro*-Transkription

Die Markierung der RNA-Sonde erfolgt durch den Einbau von Digoxigenin (DIG)-markiertem dUTP während einer *in vitro*-Transkription. Dazu wurde der DIG RNA Labeling Mix (Roche) verwendet. Zu jeweils 13 µl vollständig linearisierter Plasmid-DNA gibt man 2 µl 10× Transkriptionspuffer, 2 µl DIG RNA Markierungs-Mix, 1 µl RNase-Inhibitor und 2 µl der entsprechenden RNA Polymerase (T3, T7 oder SP6). Nach Inkubation für 2h bei 37°C werden 2 µl DNaseI (RNase-frei) zugegeben und nochmals für 25 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die RNA-Sonde für 30 min bei -80°C mit 2 µl 2 M Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8,0; 2,4 µl 4 M LiCl und 75 µl EtOH gefällt und abzentrifugiert (13.000 UpM, 15 min, 4°C). Die RNA wird in 70% EtOH gewaschen und nach dem Trocknen in 95 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst. 5 µl davon werden anschließend auf ein Formaldehyd-Agarose-Gel aufgetragen, um die Integrität der RNA-Probe zu überprüfen. Der restliche Ansatz wird mit 10 Vol Hybridisierungslösung versetzt und bei -20°C gelagert.

<b>Hybridisierungslösung</b>	50%	Formamid (deionisiert)
	1,3×	SSC
	5 mM	Na <sub>2</sub> EDTA
	0,5%	CHAPS
	100 µg/ml	Heparin
	0,2%	Tween®20



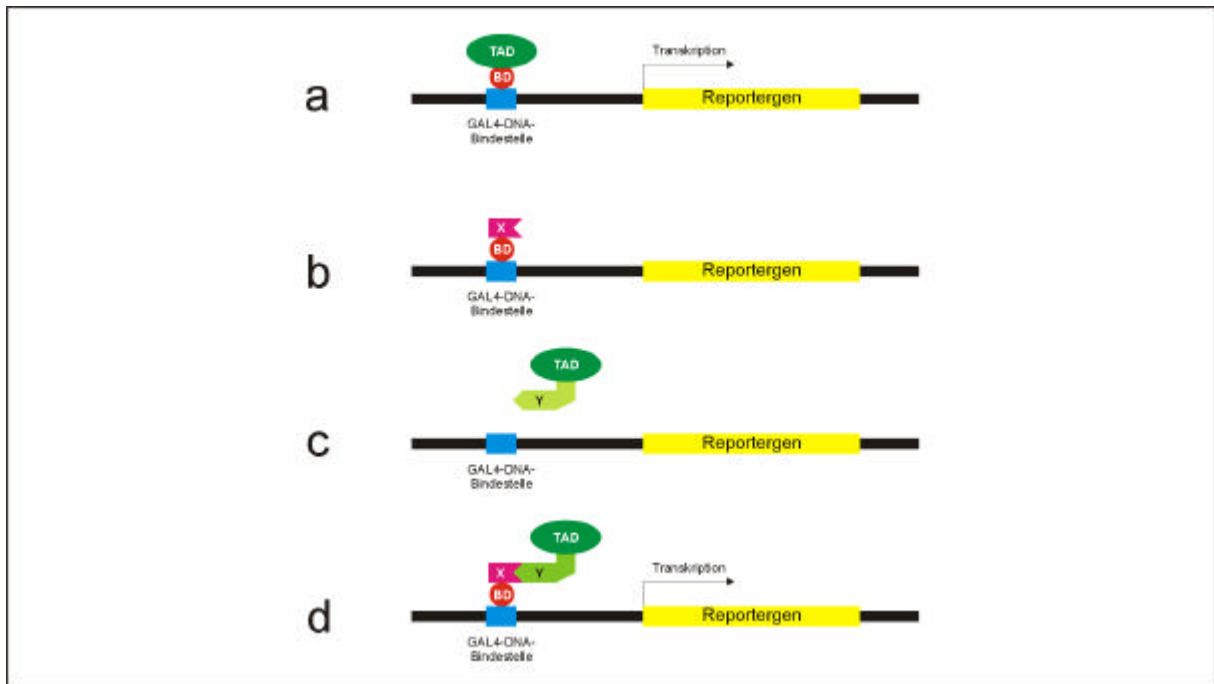
## 10.4 Histologische Doppelfärbung mit Hämalaun und Eosin

Zur besseren lichtmikroskopischen Darstellung der zellulären Strukturen des geschnittenen Gewebes wird dieses histologisch angefärbt.

Die Doppelfärbung mit Hämalaun und Eosin Y (*yellow*) dient als relativ einfache und schnelle Übersichtsfärbung. Dabei werden Zellkerne blau und alles Übrige in verschiedenen Rottönen dargestellt. Die zu färbenden Gewebeschnitte werden entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe bewässert. Anschließend werden die Objektträger 3-8 min in eine 0,1% Mayers-Hämalaun-Lösung (Sigma) gestellt und danach kurz mit 0,1% HCl gespült. Zur Entfernung von überschüssigem Farbstoff, sowie zur Ausbildung des charakteristischen blauen Farbtönen (bläuen) des Hämalauns werden die Schnitte für 10 min in fließendes Leitungswasser eingestellt. Die nachfolgende Färbung mit 0,1% Eosin Y (Sigma) erfolgt für 10-15 min. Zum Auswaschen werden die Objektträger für 1-5 min in H<sub>2</sub>O gegeben. Nach kurzem Differenzieren in 80% EtOH werden die Schnitte zweimal für 2 min in 100% EtOH entwässert und nach 3-5 min in dem Xylol-Ersatzstoff Roticlear<sup>®</sup> (Roth) in Entellean<sup>®</sup> (Merck) eindeckt.

## 11. Das Hefe Zwei-Hybrid System

Das Hefe Zwei-Hybrid System (*yeast two-hybrid system*) stellt ein sehr sensitives *in vivo*-System zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen dar (FIELDS & SONG 1989). Das hier verwendete MATCHMAKER Two-Hybrid System 3 (Clontech) basiert auf dem GAL4-Protein, einem Transkriptionsfaktor der Gene des Galaktose-Metabolismus der Hefe *S. cerevisiae*. Das GAL4-Protein besteht aus zwei funktionellen Einheiten, einer DNA-Bindungsdomäne und einer Transaktivierungsdomäne, welche beide für die erfolgreiche Transkription der assoziierten Gene benötigt werden. Die beiden Domänen werden getrennt und jeweils an die zu untersuchenden Proteine gekoppelt. Eine Interaktion zwischen diesen beiden „Test-Proteinen“ ermöglicht die Rekonstitution eines funktionellen GAL4-Proteins aus den beiden Untereinheiten, was über die Transkription mehrerer Reportergene nachgewiesen werden kann. Abbildung 13 zeigt das Funktionsprinzip des Zwei-Hybrid-Systems.



**Abb. 13: Funktionsweise des Hefe Zwei-Hybrid-Systems.**

**a.** Der native Transkriptionsfaktor GAL4 induziert mit DNA-Bindedomäne (BD) (rot) und Transaktivierungsdomäne (TAD) (grün) die Transkription des Reportergens (gelb). **b.** Sowohl das Hybrid aus BD und Protein X (magenta), das an die Bindestelle des Reportergens bindet, als auch das Hybrid aus TAD und Protein Y (hellgrün) (**c**), können das Reportergen nicht aktivieren. **d.** Die Protein-Protein-Interaktion zwischen X und Y bringt die Aktivierungsdomäne (TAD) in räumliche Nähe zur DNA-Bindedomäne (BD), wodurch der Transkriptionsfaktor rekonstituiert wird. Damit wird die Induktion der Transkription des Reportergens ausgelöst.

Der in dieser Arbeit verwendete Hefestamm AH109 besitzt zur Reduzierung falsch positiver Klone die drei verschiedenen Reportergene *ADE2*, *HIS3* und *lacZ*. Die beiden Nährstoff-Marker *ADE2* und *HIS3* erlauben die Selektion erfolgreich transformierter Zellen auf Nährmedien ohne Adenin und Histidin. Durch den Zusatz von 2,5 mM 3-AT kann eine gelegentlich auftretende Hintergrund-Expression (*leaky expression*) des *HIS3*-Proteins unterdrückt werden (FIELDS 1993, DURFEE *et al.* 1993). Mit Hilfe des *lacZ*-Reportergens kann der Anteil falsch positiver Klone weiter reduziert werden. Darüber hinaus fehlen AH109 die Gene für die beiden Aminosäuren Tryptophan (*TRP1*) und Histidin (*HIS2*). Dadurch kann AH109 erst auf SD (-Trp-Leu)-Minimalmedium wachsen, wenn funktionelle *TRP1* und *LEU2* Gene durch Vektoren eingebracht wurden. Die im MATCHMAKER Two-Hybrid System 3 verwendeten Fusionsvektoren pGBKT7 und pGADT7 besitzen jeweils eines der beiden Gene. Der für die DNA-Bindungsdomäne kodierende Vektor pGBKT7 besitzt neben dem *TRP1*-Gen eine Kanamycinresistenz zur Selektion der Wirtsbakterien. Der Vektor pGADT7 beinhaltet neben der Transaktivierungsdomäne auch das *LEU2*-Gen und besitzt eine Ampicillinresistenz. Die untersuchten Gene werden jeweils im passenden Leseraster (*in-frame*) in beide Fusionsvektoren kloniert. Die Transformation der Hefe erfolgt nach der LiOAc-Methode bei



der die Transformationseffizienz bei etwa  $10^5$  Transformaten pro  $\mu\text{g}$  DNA liegt (ITO *et al.* 1983, HILL *et al.* 1991, GIETZ *et al.* 1992).

### 11.1 Herstellung spezifischer Fusionsklone

Alle in dieser Arbeit verwendeten Klone werden in beide Fusionsvektoren (pGBKT7 und pGADT7) kloniert und anschließend zur Überprüfung der Integrität der Sequenz vollständig sequenziert.

EFEMP1 wird aus boviner Retina cDNA, mittels PCR mit den Oligonukleotid-Primern EFEMP1\_TH\_EcoRI-F und EFEMP1\_TH\_XhoI-R amplifiziert (siehe Anhang B und J) und nach dem Abspalten der *Eco* RI- bzw. *Xho* I-Adapter in die *Eco* RI/*Xho* I bzw. *Eco* RI/*Sal* I behandelte multiple Klonierungsstelle von pGADT7 bzw. pGBKT7 kloniert. Die so erhaltenen Klone enthalten den vollständigen ORF von *EFEMP1* ohne die für das Signalpeptid codierenden Nukleotide, sowie 31 bp der 3'-UTR (Nukleotidpositionen + 52 bis + 1527).

Die R345W Mutation wird mit Hilfe des Oligonukleotidprimers EFEMP1\_TH\_Mut/BsaI-F eingeführt. Die PCR-Amplifikation mit dem Primer EFEMP1\_TH\_SalI-R ergibt ein 516 bp großes Fragment. Dieses wird mit den Restriktionsenzymen *Bsa* I und *Sal* I geschnitten. Der 5'-Bereich von EFEMP1 wird als 1312 bp großes, überlappendes Fragment durch PCR mit den Primern EFEMP1\_TH\_EcoRI-F und EFEMP1\_Mut\_DrdI-R amplifiziert (siehe Anhang B und J). Nach einem Restriktionsverdau mit den Enzymen *Bsa* I und *Eco* RI wird dieses Fragment zusammen mit dem *Bsa* I/*Sal* I geschnittenen, mutagenisiertem Fragment in die Fusionsvektoren kloniert.

Für die Klonierung des bovinen Orthologs der EFEMP1 bindenden Domäne von DA41 wird mit Hilfe der flankierenden Primer DA41\_TH\_EcoRI F und DA41\_TH\_XhoI-R ein 299 bp großes PCR-Fragment aus boviner Retina Gesamt-RNA amplifiziert (siehe Anhang B und J) und dieses kloniert.

Als Positivkontrolle bei allen Transformationen fungieren die im MATCHMAKER Two-Hybrid System 3 enthaltenen Fusionsplasmide mit dem murinen p53 in pGBKT7 und dem großen T-Antigen aus SV40 (LI & FIELDS 1993; IWABUCHI *et al.* 1993).

### 11.2 Herstellung kompetenter Hefen

Mit einer sterilen Impföse werden von einer YPDA-Agarplatte mehrere AH109-Kolonien in 50 ml YPDA-Medium überimpft und auf einem Rundschtüttler inkubiert (250 UpM, 16-18 h, 30°C). Von dieser Vorkultur werden soviel zum 300 ml YPDA-Medium gegeben, dass die optische Dichte ( $A_{600}$ ) 0,2 bis 0,3 beträgt. Diese Hauptkultur wird bis zu einer optischen Dichte ( $A_{600}$ ) von 0,5 ( $\pm 0,1$ ) bei 30°C auf dem Rundschtüttler bei 250 UpM inkubiert. Die Zellen werden durch Zentrifugation sedimentiert (2.500 UpM, 5 min, RT), in 1 Vol ddH<sub>2</sub>O

resuspendiert und erneut zentrifugiert (2.500 UpM, 5 min, RT). Anschließend werden die Zellen in 1,5 ml frisch angesetzter sterilen TE/LiOAc-Lösung aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei RT aufbewahrt.

<b>TE/LiOAc-Lösung</b>	100 mM	LiOAc
	10 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	1 mM	Na <sub>2</sub> EDTA

### 11.3 Transformation

Für die Transformation der Hefen werden je 0,1 µg Fusionsvektor zu 0,1 mg denaturierter Heringssperma-DNA und 0,1 ml kompetenter Hefe-Zellen gegeben und kräftig gemischt. Nach der Zugabe von 0,6 ml PEG/LiOAc-Lösung wird der Ansatz auf einem Rundschüttler inkubiert (200 UpM, 30 min, 30°C). Danach werden 70 µl DMSO zugegeben, vorsichtig gemischt und die Zellen für 15 min bei 42°C im Wasserbad inkubiert. Nachdem die Zellen für 1-2 min auf Eis abgekühlt wurden, werden sie kurz abzentrifugiert (14.000 UpM, 5 sec, RT) und in 500 µl TE-Puffer gelöst. Jeweils 100 µl der so erhaltenen Zellsuspension werden auf Agar-Platten mit SD-Selektionsmedium (-Leu,-Trp) ausplattiert und 2-5 Tage bei 30°C inkubiert. Dabei können nur solche Hefeklonen wachsen, welche beide Fusionsvektoren (pGBKT7 und pGADT7) aufgenommen haben.

<b>PEG/LiOAc-Lösung</b>	40%	PEG 3350
	100 mM	LiOAc
	10 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	1 mM	Na <sub>2</sub> EDTA

### 11.4 Nachweis von Protein-Protein Interaktionen

Zum Nachweis von Protein-Protein Interaktionen werden einzelne Hefeklonen von den SD (-Leu,-Trp)-Agarplatten isoliert und in 10 µl sterilem ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Die Hefesuspension wird in einer Verdünnungsreihe 1:10, 1:50, 1:100, 1:500 und 1:1000 in sterilem ddH<sub>2</sub>O verdünnt und jeweils 2 µl dieser Lösung auf SD (-His,-Ade,-Leu,-Trp)-Agarplatten (+ 2,5 mM 3-AT) und SD (-Leu,-Trp)-Agarplatten aufgetropft und 3-5 Tage bei 30°C inkubiert.

## 12. Computergestützte Analyse von Sequenzdaten

### 12.1 Lokale Software

Für eine grundlegende Bearbeitung von Sequenzdaten werden die beiden auf lokalen Plattformen installierten Programme Mac Vector™ (Version 4.1.4) von Eastman Kodak und

GeneRunner (Version 3.0) von Hastings Software verwendet. Die Funktionen dieser beiden Programme erlauben unter anderem die Identifikation von Restriktionsschnittstellen und offenen Leserastern, sowie die Translation einer DNA-Sequenz in das entsprechende Protein. Sequenzähnlichkeiten können sehr einfach durch den Vergleich zweier Sequenzen (*alignment*) ermittelt werden. Wesentlich ausführlichere und detailliertere Analysen sind mit Softwarepaketen möglich, welche eine Vielzahl von verschiedenen Anwendungen unter einer Oberfläche zusammenfassen. Hierzu zählen z.B. das GCG9 Wisconsin Softwarepaket (Genetics Computer Group, Wisconsin 1996) oder die Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources (HUSAR)<sup>3</sup> am DKFZ, Heidelberg.

## 12.2 Molekularbiologische Ressourcen im *World Wide Web*

### 12.2.1 Datenbanken

In den über das *World Wide Web* (WWW) zugänglichen Datenbanken sind alle bekannten Sequenzinformationen gespeichert. Eine der wichtigsten Sequenzdatenbank ist GenBank™<sup>4</sup> am *US National Center for Biotechnology Information* (NCBI)<sup>5</sup>, Bethesda, USA. Diese steht in enger Kooperation mit der europäischen EMBL Datenbank am *European Bioinformatics Institute* (EBI)<sup>6</sup> in Cambridge, England, sowie der japanischen DNA-Datenbank (DDBJ)<sup>7</sup> in Mishima (RICE & CAMERON 1994, BENSON *et al.* 2000). Die Zahl der in diesen Datenbanken gespeicherten Sequenzinformationen ist aufgrund der internationalen Anstrengungen des Humanen Genomprojektes innerhalb sehr kurzer Zeit explosionsartig angestiegen. In ihrer aktuellen Version 121.0 vom 15. Dezember 2000 enthält GenBank™ Einträge von 10.095.711 verschiedenen Lozi. Jeder Datenbankeintrag erhält eine spezifische Zugangsnummer (*accession number*, Acc. No.), unter der dieser Eintrag abgerufen werden kann. Ein Teilbereich von GenBank™ ist die EST-Datenbank dbEST<sup>8</sup>. Sie besteht aus einer Sammlung von Teilsequenzen aus cDNA-Klonen (ESTs). Häufig finden sich überlappende EST-Sequenzen, diese sind in der UniGene<sup>9</sup> Datenbank am NCBI zu Gruppen (*EST-cluster*) zusammengefasst und die subchromosomalen Teilbereiche und genetischen Intervalle denen sie zugeordnet werden können, sind angegeben (SCHULER *et al.* 1996). Gruppierte, überlappende EST-Klone findet man auch im Human Gene Index<sup>10</sup> am *Institute for Genomic Research*, Rockville, USA. Neben den Sequenzdatenbanken gibt es solche, in denen genetische und physikalische Kartierungsdaten abgerufen werden können. Dazu zählen das

<sup>3</sup> <http://genome.dkfz-heidelberg.de/>

<sup>4</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/index.html>

<sup>5</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<sup>6</sup> <http://www.ebi.ac.uk/embl/index.html>

<sup>7</sup> <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>

<sup>8</sup> [http://www2.ncbi.nlm.nih.gov/dbST/dbest\\_query.html](http://www2.ncbi.nlm.nih.gov/dbST/dbest_query.html)

<sup>9</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/index.html>

<sup>10</sup> <http://www.tigr.org/tdb/hgi/index.html>

*Center for Medical Genetics*<sup>11</sup>, Marshfield, USA das *Whitehead Institute for Biomedical Research*<sup>12</sup> in Cambridge, Massachusetts, USA sowie das *GÉNÉTHON Human Genome Research Centre*<sup>13</sup> in Evry, Frankreich. Eine Sammelstelle dieser Datenbanken ist die *Genome Data Base (GDB)*<sup>14</sup> am *Hospital for Sick Children*, Toronto, Kanada. Viele große Genomzentren, z.B. das *Sanger Centre*<sup>15</sup> in Cambridge, England oder das *Genome Sequencing Centre*<sup>16</sup>, St. Louis, USA haben eigene Datenbanken eingerichtet und ermöglichen so den Zugriff auf deren aktuellste Ergebnisse. Weitere Datenbanken bieten umfassende Informationen zu verschiedenen genetisch bedingten Erkrankungen oder zu bereits kartierten oder klonierten Genen. Die wichtigste Datenbank dieser Art ist *Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM™)*<sup>17</sup> am NCBI. Am *Weizman Institute of Science*<sup>18</sup>, Rehovot, Israel, befindet sich mit *GeneCards*<sup>19</sup> eine Datenbank menschlicher Gene und ihrer Beteiligung an Erkrankungen. Spezielle Informationen zu retinalen Genen und Erkrankungen bietet das *Retinal Information Network (RetNet™)*<sup>20</sup> am *University Texas Health Science Center*<sup>21</sup>, Houston, Texas, USA.

### 12.2.2 Sequenzvergleiche durch BLAST-Algorithmen

Neben der Suche nach bestimmten Sequenzen durch Eingabe einer Zugangsnummer gibt es die Möglichkeit eine DNA- oder Protein-Sequenz direkt mit den Einträgen aller Sequenzdatenbanken zu vergleichen. Man erhält so sehr schnell und einfach Informationen über Ähnlichkeiten einer bestimmten Sequenz, mit bereits bekannten Sequenzen und kann dadurch evtl. erste Hinweise über die Funktion der unbekannt Sequenz gewinnen. Der *basic local alignment search tool (BLAST)* Algorithmus ermöglicht die Identifikation selbst von relativ schwachen aber biologisch signifikanten Sequenzübereinstimmungen (ALTSCHUL *et al.* 1990). Beim Vergleich der vollständigen Nukleotid- bzw. Aminosäuresabfolge zweier Sequenzen besteht die Gefahr, dass teilweise bestehende Sequenzähnlichkeiten nicht erkannt werden. Daher werden beim BLAST nur relativ konservierte Subsequenzen (Segmente) miteinander verglichen. Durch die Ermittlung des *maximal segment pairs (MSP) scores*, erhält man ein Maß für die lokale Übereinstimmung jedes beliebigen Sequenzpaares. Dazu addiert man für identische Basen je +5 und für jede Base die nicht übereinstimmt -4. Ein Segmentpaar ist lokal maximal, wenn der *score* weder durch Verlängerung noch durch Verkürzung eines Segmentpaares erhöht werden kann.

<sup>11</sup> <http://research.marshfieldclinic.org/genetics/>

<sup>12</sup> <http://www-genome.wi.mit.edu/>

<sup>13</sup> [http://www.genethon.fr/genethon\\_en.html](http://www.genethon.fr/genethon_en.html)

<sup>14</sup> <http://gdbwww.gdb.org/>

<sup>15</sup> <http://www.sanger.ac.uk/>

<sup>16</sup> <http://genome.wustl.edu/gsc/>

<sup>17</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/>

<sup>18</sup> <http://bioinfo.weizmann.ac.il/>

<sup>19</sup> <http://bioinfo.weizmann.ac.il/cards/>

<sup>20</sup> <http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/>

<sup>21</sup> <http://www.uth.tmc.edu/>

BLAST sucht nach allen lokalen MSP scores, die über einem bestimmten Wert liegen. Die direkte Anzeige des homologen Sequenzpaares, sowie statistische Angaben zur Homologie ermöglichen eine sehr gute Einschätzung der gefundenen Sequenz. Mittlerweile bieten eine Vielzahl von verschiedenen Genomzentren die Möglichkeit einer BLAST Suche an. Der BCM Search Launcher<sup>22</sup> am *Baylor College of Medicine*, Houston, Texas, USA, bietet neben dem direkten Sequenzvergleich von DNA- und Protein-Sequenzen auch die Möglichkeit, mit Hilfe des BLASTX-Programmes eine DNA-Sequenz in alle Leseraster zu translatieren und diese mit Protein-Datenbanken zu vergleichen (SMITH *et al.* 1996). Durch das RepeatMasker-Programm werden repetitive Elemente vor dem Sequenzvergleich herausgefiltert und maskiert. Aufgrund des enormen Rechenaufwandes ist die Länge der zu analysierenden Sequenz bei fast allen BLAST Diensten auf etwa 7.000 Nukleotide beschränkt. Damit ist z.B. die Analyse von teilweise über 100 kb großen PAC-Sequenzen nur bedingt möglich. Eine sehr umfassende BLAST-Analyse von Sequenzen beliebiger Länge ermöglicht z.B. das NIX-Interface am *UK Human Genome Mapping Project Resource Centre*<sup>23</sup>. Dabei werden parallel alle relevanten Sequenzdatenbanken abgefragt. Basierend auf dem BLAST Algorithmus bietet die *Protein Domain Database (ProDom)*<sup>24</sup> am *Institut Nationale de la Recherche Acronomique (INRA)*, Toulouse, Frankreich die Möglichkeit zur Identifikation von ähnlichen Proteindomänen einer untersuchten Proteinsequenz. Gefundene Übereinstimmungen werden anschließend mit Hilfe der *Multiple Sequence Alignment Software (MultAlin)*<sup>25</sup> (CORPET 1988) als *alignment* dargestellt. Der Import eines solchen Sequenz-alignments in BOXSHADE 3.21<sup>26</sup> ermöglicht die Schattierung konservierter Aminosäuren und vereinfacht so die Darstellung konservierter Bereiche eines Proteins.

### 12.3 Berechnung des *splice site discrimination score* zur Identifikation von Spleißstellen

Die Gene eukaroytischer Organismen bestehen aus codierenden Bereichen (Exonen) welche i.d.R. durch nicht codierende Sequenzen (Introne) unterbrochen sind. Diese Introne werden bei der Transkription des Gens entfernt. Damit dieser sog. Spleißvorgang zuverlässig stattfinden kann, befinden sich an den Exon/Intron-Grenzen hochkonservierte Sequenzen (BREATHNACH *et al.* 1978). Am Übergang von exonischer zu intronischer Sequenz, der sog. 5'-Donor-Spleißstelle besteht die Konsensussequenz aus den neun Nukleotiden CAGgtragt. Die Spaltung erfolgt dabei immer vor dem Dinukleotid GT welches den Beginn der intronischen Sequenz markiert. Die Nahtstelle zwischen einem Intron und einem Exon wird auch als 3'-Akzeptor-Spleißstelle bezeichnet. Ihre Konsensussequenz besteht aus fünf Nukleotiden die strangaufwärts von einer aus 12

<sup>22</sup> <http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/index.html>

<sup>23</sup> <http://www.hgmp.mrc.ac.uk/Registered/Webapp/nix/>

<sup>24</sup> <http://protein.toulouse.inra.fr/prodom.html>

<sup>25</sup> <http://www.toulouse.inra.fr/multalin.html>

<sup>26</sup> [http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)

Nukleotiden bestehenden pyrimidinreichen Region flankiert wird (yyytnttttyyyyncagG). Die Spaltung findet hier nach dem Dinukleotid AG statt, welches das Ende des Introns markiert. Durch den Vergleich einer großen Anzahl von Spleißstellen in humanen Genen konnte die Häufigkeit mit der ein bestimmtes Nukleotid  $n$  an einer festgelegten Position  $l$  der Spleißstelle vorkommt bestimmt werden (PENOTTI 1991; Tabelle 4, 5). Als statistisches Maß für die Signalstärke einer Spleißstelle kann deren *discrimination score* berechnet werden. Dieser ergibt sich aus der Summe der *discrimination energies* ( $\varepsilon_{lB}$ ) jedes Nukleotides an jeder Stelle der Spleißstelle (BERG & VON HIPPEL 1987; BERG & VON HIPPEL 1988). Die Berechnung von  $\varepsilon_{lB}$  erfolgt nach folgender Formel:

$$\hat{a}_{lB} = \ln \left[ \frac{(n_{l0} + 0,5)}{(n_{lB} + 0,5)} \right]$$

Dabei entspricht  $n_{l0}$  der Frequenz des häufigsten Nukleotides an der Position  $l$  und  $n_{lB}$  der Frequenz des jeweiligen Nukleotides der zu untersuchenden Sequenz an der Position  $l$ . Der Wertebereich der 5'-Donor-Spleißstelle reicht von 0, für perfekte Übereinstimmung mit der Konsensussequenz, bis 30,1 für keinerlei Übereinstimmung. Bei den 764 untersuchten realen 5'-Donor-Spleißstellen wurden *discrimination scores* von 0 bis 11 gefunden, wobei nur eine Spleißstelle einen Wert von 14,3 aufwies (PENOTTI 1991). Bei der 3'-Akzeptor-Spleißstelle reicht die Skala von 0 bis 42,5, wobei die Werte der realen Spleißstellen zwischen 0 und 20 lagen, von denen wiederum nur fünf größer 14 waren (PENOTTI 1991).

**Tab. 4: Häufigkeit der einzelnen Nukleotide an der Position  $l$  bei 764 untersuchten 5'-Donor-Spleißstellen (nach PENOTTI 1991)**

Position $l$	-3	-2	-1	1	2	3	4	5	6
$n_{lA}$	246	442	74	0	0	380	548	54	121
$n_{lC}$	307	105	29	0	3	13	81	38	138
$n_{lG}$	129	117	598	764	1	351	82	637	156
$n_{lT}$	82	100	63	0	760	20	53	35	349
<b>Konsensus</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>T</b>

**Tab. 5: Häufigkeit der einzelnen Nukleotide an der Position  $l$  bei 764 untersuchten 3'-Akzeptor-Spleißstellen (nach PENOTTI 1991)**

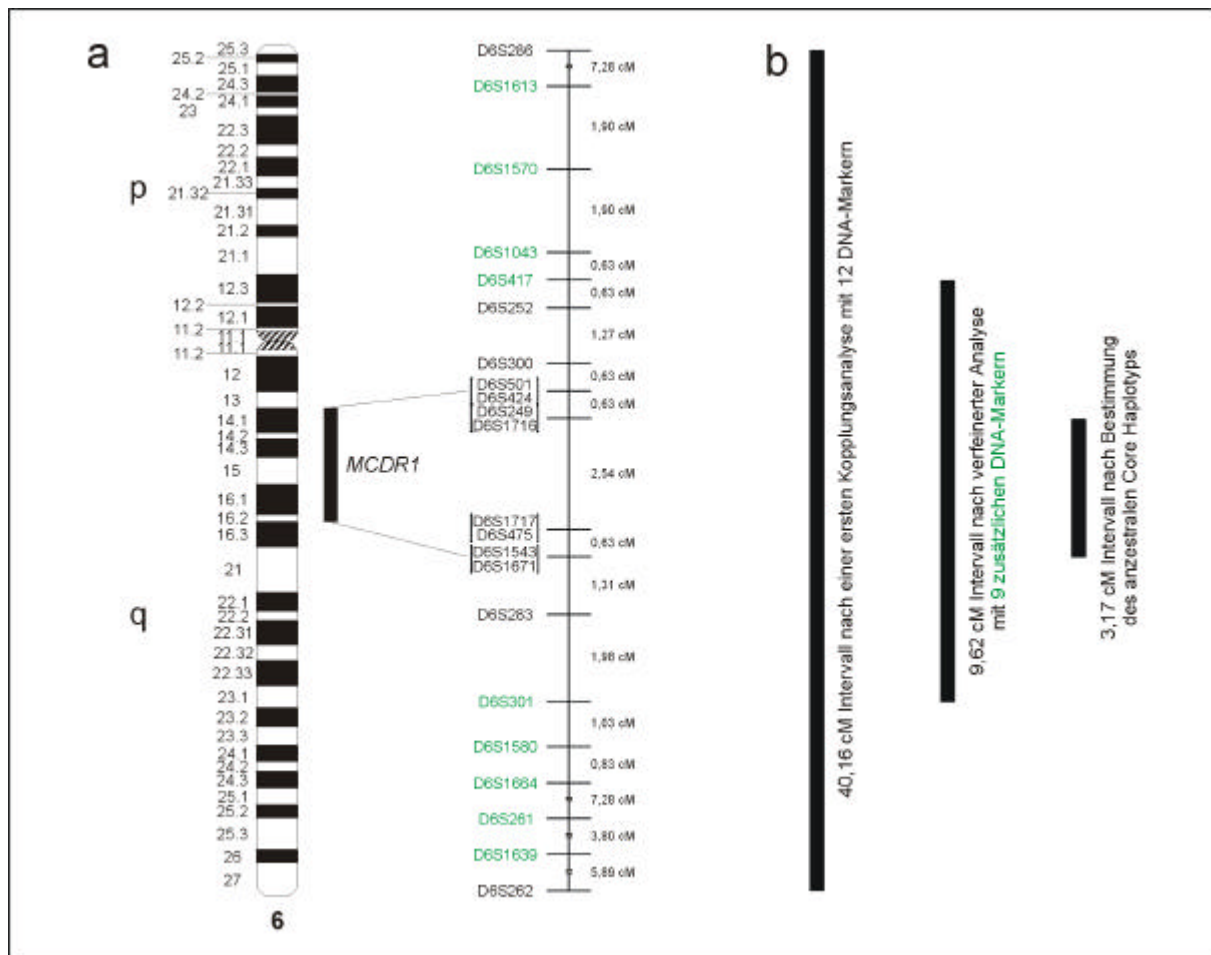
Position $l$	-16	-15	-14	-13	-12	-11	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	1
$n_{lA}$	108	84	83	67	49	44	50	54	71	76	52	46	185	24	764	0	185
$n_{lC}$	264	264	276	260	278	243	283	274	293	295	334	325	233	587	0	1	97
$n_{lG}$	113	103	111	97	84	89	70	85	96	80	44	49	173	1	0	763	402
$n_{lT}$	279	313	294	340	353	388	361	351	304	313	334	344	173	152	0	0	80
<b>Konsensus</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>	<b>N</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>G</b>

## IV. Ergebnisse

### 1. Kopplungsanalyse bei der North Carolina Makuladystrophie

#### 1.1 Genotypisierung

Die genomische DNA von insgesamt 26 betroffenen und 14 nicht-betroffenen Mitgliedern der drei Familien L, A, und W wurde mit den 12 polymorphen DNA-Markern D6S249, D6S252, D6S262, D6S283, D6S286, D6S300, D6S475, D6S501, D6S1543, D6S1671, D6S1716 und D6S1717 analysiert (siehe Anhang B und J). Diese DNA-Marker liegen im chromosomalen Bereich 6q14-q16.2 (Abbildung 14a).



**Abb. 14: Chromosomale Lage des MCDR1-Lokus auf Chromosom 6q14-q16.2 und genetische Karte der verwendeten Marker Lozi.**

**a.** Die Reihenfolge der Marker und ihre jeweiligen Abstände wurden vom *Center for Medical Genetics*<sup>27</sup>, Marshfield, USA übernommen. Die 12 DNA-Marker der ersten Kopplungsanalyse sind schwarz dargestellt. Die neun grün abgebildeten Marker wurden für die verfeinerte Analyse verwendet (siehe Abschnitt 1.3). **b.** Verfeinerung der Kandidatengenregion durch die verschiedenen durchgeführten Analysen.

<sup>27</sup> <http://research.marshfieldclinic.org/genetics/>

Für jede Familie wurde ein krankheitsassoziierter Haplotyp erstellt (Abbildung 15). Mehrere Rekombinationsereignisse konnten bei dem am äußersten distal gelegenen Marker D6S286 und dem am äußersten proximal gelegenen Marker D6S262 beobachtet werden. Auf der Basis neuerer genetischer Karten flankieren diese beiden Marker den MCDR1-Lokus mit einem genetischen Abstand von etwa 12 cM bzw. 21 cM (Abbildung 14a). Die übrigen 10 Marker umfassen zusammen einen Bereich von 7 cM.

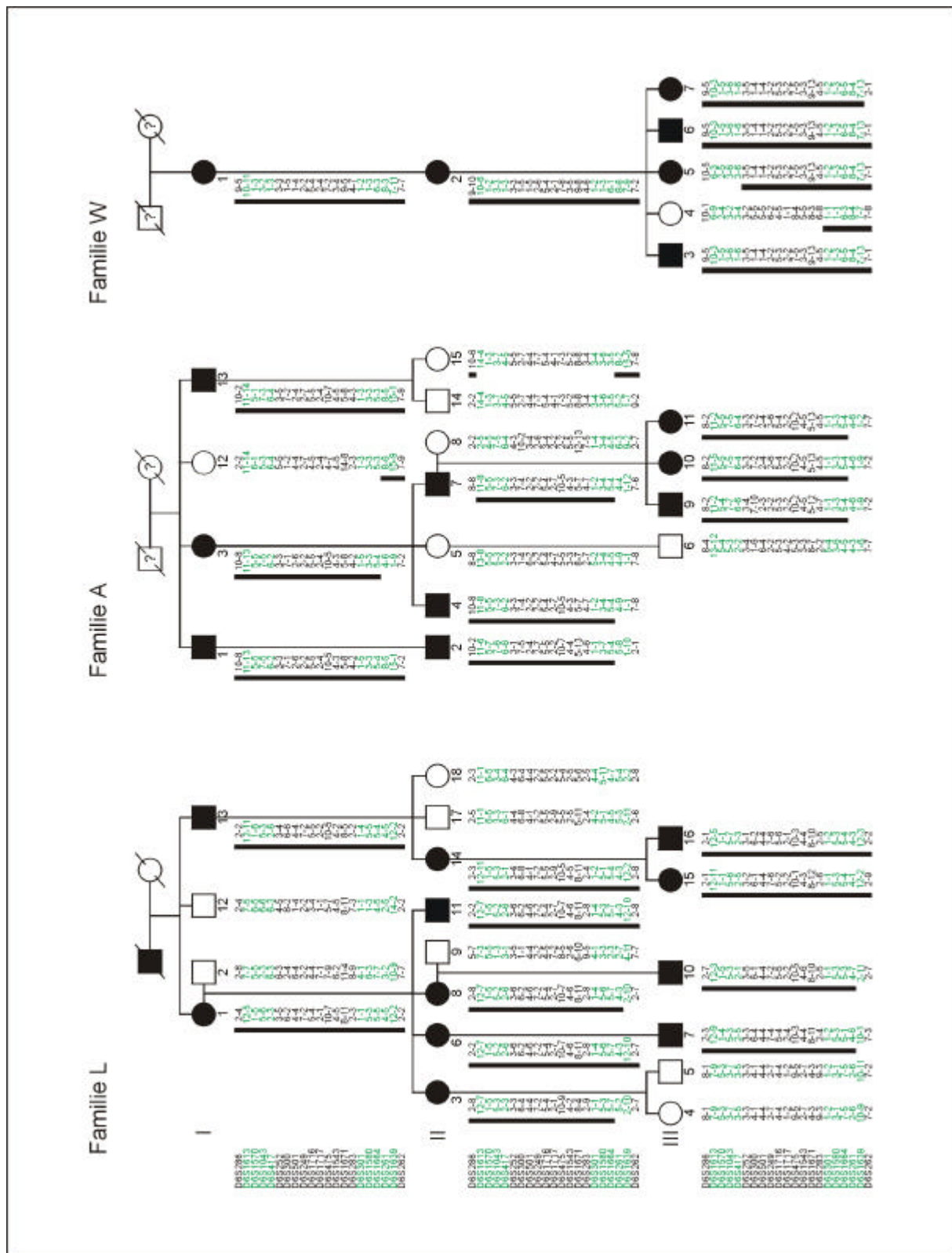
## 1.2 Zwei-Punkt Kopplungsanalyse

Basierend auf den zuvor gewonnenen Genotypisierungsdaten (Abbildung 15), wurden die Zwei-Punkt *lod scores* bei Rekombinationsraten ( $\theta$ ) von 0%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30% und 40%, für NCMD gegen die 12 Mikrosatellitenmarker aus dem Bereich 6q14-q16.2 berechnet (Tabelle 6). Die Personen III/3 und III/6 der Familie W wurden dabei nicht in die Berechnungen mit einbezogen. Die Kombination der *lod scores* aller drei NCMD/CAPED Familien ergab eine signifikante Kopplung zwischen dem MCDR1-Lokus und 10 der 12 untersuchten Marker. Eine Ausnahme bildeten die beiden rekombinanten Marker D6S286 und D6S262. Während D6S286 einen kombinierten, maximalen *lod score*  $z_{\max}$  von 1,76 bei einer Rekombinationsrate von  $\theta=0,15$  aufwies, ergab sich für den Marker D6S262 ein  $z_{\max}$  von 0,37 bei  $\theta=0,34$ . Der höchste kombinierte *lod score* mit  $z_{\max}=8,42$  bei einer Rekombinationsrate von 0% wurde für den Lokus D6S475 berechnet.

## 1.3 Verfeinerung der minimalen Kandidatenregion

Die mit Hilfe der Zwei-Punktkopplungsanalyse ermittelte Kandidatenregion umfasste einen genetischen Bereich von über 40 cM (Abbildung 14b). Um diesen Bereich weiter einzuengen, wurden neun zusätzliche polymorphe DNA-Marker untersucht (Abbildung 14a). Vier dieser Marker, D6S1613, D6S1570, D6S1043 und D6S417 liegen auf der distalen Seite der Kandidatenregion, zwischen den Markern D6S252 und dem rekombinanten Marker D6S286. Die restlichen fünf Marker, D6S301, D6S1580, D6S1664, D6S447, D6S1647, D6S261 und D6S1639 flankieren die Kandidatenregion proximal und liegen zwischen den Markern D6S283 und D6S262. Die Erstellung der krankheitsassozierten Haplotypen ermöglichte die Identifizierung weiterer Rekombinationsereignisse (Abbildung 15). Während in Familie L bei den distal gelegenen Markern keine Rekombination beobachtet werden konnte, waren auf der proximalen Seite bei der Person II/3 die Marker D6S262, D6S1639 und D6S261 rekombinant. Auch bei Familie A konnte der distale Bereich nicht weiter eingengt werden. Auf der proximalen Seite wurden bei mehreren Personen (z.B. I/3, I/12 und II/15) Rekombinationen der Marker D6S262, D6S1639 und D6S261 beobachtet.





**Abb. 15: Stammbäume der NCMD/CAPED Familien L, A und W.**

Die analysierten Marker sind von oben nach unten in der Reihenfolge 6qcen nach 6qter angegeben. Die 12 DNA-Marker der ersten Kopplungsanalyse sind schwarz dargestellt. Die neun grün abgebildeten Marker wurden für die verfeinerte Analyse verwendet (siehe Abschnitt 1.3). Der krankheitsassoziierte Haplotyp jeder Familie ist durch einen senkrechten schwarzen Strich dargestellt.

**Tab. 6: Kopplungsanalyse zwischen NCMD/CAPED und 12 DNA-Markern von 6q14-q16.2**

Lokus	Z bei einem $\alpha$ von							$\alpha_{max}$	Z <sub>max</sub>
	0	0.01	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4		
<b>D6S286</b>									
Familie L	2.08	2.06	1.96	1.82	1.45	0.99	0.48	<b>0.15</b>	<b>1.76</b>
Familie A	-	-1.65	-0.40	0.02	0.23	0.16	0.05		
Familie W	-	-1.11	-0.44	-0.19	0.01	0.07	0.06		
<b>Gesamt</b>	-	<b>-0.70</b>	<b>1.12</b>	<b>1.65</b>	<b>1.69</b>	<b>1.22</b>	<b>0.59</b>		
<b>D6S252</b>									
Familie L	2.45	2.41	2.22	1.98	1.43	0.86	0.35	<b>0</b>	<b>3.65</b>
Familie A	1.20	1.18	1.07	0.93	0.63	0.33	0.08		
Familie W	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
<b>Gesamt</b>	<b>3.65</b>	<b>3.59</b>	<b>3,29</b>	<b>2.91</b>	<b>2.06</b>	<b>1.19</b>	<b>0.43</b>		
<b>D6S300</b>									
Familie L	3.31	3.25	3.02	2.72	2.06	1.34	0.61	<b>0</b>	<b>6.32</b>
Familie A	2.17	2.12	1.94	1.71	1.25	0.78	0.33		
Familie W	0.84	0.82	0.77	0.70	0.55	0.38	0.19		
<b>Gesamt</b>	<b>6.32</b>	<b>6.19</b>	<b>5.73</b>	<b>5.13</b>	<b>3.86</b>	<b>2.50</b>	<b>1.13</b>		
<b>D6S501</b>									
Familie L	1.55	1.52	1.41	1.27	0.97	0.66	0.34	<b>0</b>	<b>4.81</b>
Familie A	2.36	2.32	2.14	1.91	1.41	0.85	0.29		
Familie W	0.90	0.89	0.84	0.77	0.61	0.44	0.24		
<b>Gesamt</b>	<b>4.81</b>	<b>4.73</b>	<b>4.39</b>	<b>3.95</b>	<b>2.99</b>	<b>1.95</b>	<b>0.87</b>		
<b>D6S249</b>									
Familie L	3.09	3.02	2.77	2.46	1.83	1.18	0.49	<b>0</b>	<b>4.32</b>
Familie A	0.33	0.32	0.28	0.23	0.14	0.07	0.02		
Familie W	0.90	0.89	0.83	0.76	0.61	0.44	0.24		
<b>Gesamt</b>	<b>4.32</b>	<b>4.23</b>	<b>3.88</b>	<b>3.45</b>	<b>2.58</b>	<b>1.69</b>	<b>0.75</b>		
<b>D6S1716</b>									
Familie L	2.51	2.46	2.28	2.03	1.51	0.94	0.39	<b>0</b>	<b>4.32</b>
Familie A	1.54	1.51	1.40	1.25	0.94	0.61	0.29		
Familie W	0.27	0.26	0.24	0.21	0.16	0.10	0.05		
<b>Gesamt</b>	<b>4.32</b>	<b>4.23</b>	<b>3.92</b>	<b>3.49</b>	<b>2.61</b>	<b>1.65</b>	<b>0.73</b>		
<b>D6S1717</b>									
Familie L	2.82	2.76	2.55	2.26	1.66	1.03	0.43	<b>0</b>	<b>6.02</b>
Familie A	2.30	2.27	2.14	1.95	1.52	1.01	0.44		
Familie W	0.90	0.89	0.84	0.77	0.61	0.44	0.24		
<b>Gesamt</b>	<b>6.02</b>	<b>5.92</b>	<b>5.53</b>	<b>4.98</b>	<b>3,79</b>	<b>2.48</b>	<b>1.11</b>		
<b>D6S475</b>									
Familie L	4.21	4.14	3.86	3.48	2.67	1.77	0.80	<b>0</b>	<b>8.42</b>
Familie A	3.31	3.25	3.02	2.72	2.05	1.31	0.54		
Familie W	0.90	0.89	0.84	0.77	0.61	0.44	0.24		
<b>Gesamt</b>	<b>8.42</b>	<b>8.28</b>	<b>7.72</b>	<b>6.97</b>	<b>5.33</b>	<b>3.52</b>	<b>1.58</b>		
<b>D6S1543</b>									
Familie L	3.29	3.25	3.07	2.81	2.22	1.52	0.72	<b>0</b>	<b>6.25</b>
Familie A	2.06	2.03	1.92	1.75	1.34	0.85	0.34		
Familie W	0.90	0.89	0.84	0.77	0.61	0.44	0.24		
<b>Gesamt</b>	<b>6.25</b>	<b>6.17</b>	<b>5.83</b>	<b>5.33</b>	<b>4.17</b>	<b>2.81</b>	<b>1.30</b>		
<b>D6S1671</b>									
Familie L	2.79	2.76	2.63	2.43	1.94	1.33	0.62	<b>0</b>	<b>7.00</b>
Familie A	3.31	3.25	3.02	2.72	2.05	1.31	0.54		
Familie W	0.90	0.89	0.84	0.77	0.61	0.44	0.24		
<b>Gesamt</b>	<b>7.00</b>	<b>6.90</b>	<b>6.49</b>	<b>5.92</b>	<b>4.60</b>	<b>3.08</b>	<b>1.40</b>		
<b>D6S283</b>									
Familie L	3.31	3.25	3.02	2.72	2.06	1.34	0.61	<b>0</b>	<b>6.95</b>
Familie A	2.74	2.69	2.47	2.19	1.60	0.98	0.39		
Familie W	0.90	0.89	0.84	0.77	0.61	0.44	0.24		
<b>Gesamt</b>	<b>6.95</b>	<b>6.83</b>	<b>6.33</b>	<b>5.68</b>	<b>4.27</b>	<b>2.76</b>	<b>1.24</b>		
<b>D6S262</b>									
Familie L	-	-1.03	-0.30	0.00	0.20	0.22	0.14	<b>0.34</b>	<b>0.37</b>
Familie A	-	-3.87	-1.64	-0.73	-0.02	0.20	0.18		
Familie W	-	-1.40	-0.72	-0.44	-0.19	-0.08	-0.02		
<b>Gesamt</b>	-	<b>-6.30</b>	<b>-2.66</b>	<b>-1.17</b>	<b>-0.01</b>	<b>0.34</b>	<b>0.30</b>		

In der Familie W waren bei der Person III/5 alle Marker distal zu D6S252, bei der Person III/4 alle Marker proximal zu D6S283, rekombinant. Mit Hilfe dieser beiden Personen konnte die minimale Kandidatenregion um über 30 cM, von 40 cM auf knapp 10 cM verfeinert werden (Abbildung 14b).

### 1.4 Analyse eines gemeinsamen krankheitsassoziierten Haplotypen

Nach der verfeinerten Analyse mit insgesamt 21 polymorphen DNA-Markern umfasste die minimale Kandidatenregion fast 10 cM. Bei der genaueren Betrachtung der krankheitsspezifischen Allele, ergaben sich Hinweise auf einen gemeinsamen Haplotypen der betroffenen Personen aller drei Familien, für die fünf Marker Lozi D6S249, D6S1716, D6S1717, D6S475 und D6S1543 (Tabelle 7).

**Tab. 7: Mit NCMD/CAPED segregierende krankheitsassoziierte Haplotypen.**

Gemeinsame Haplotypen sind grau, der ancestrale *core*-Haplotyp ist dunkelgrau hervorgehoben.

Lokus	krankheitsassoziierte Haplotypen		
	Familie L	Familie A	Familie W
D6S286	2	10	9
D6S1613	12	11	10
D6S1570	1	5	1
D6S1043	5	7	3
D6S417	2	6	1
D6S252	3	3	3
D6S300	6	7	1
D6S501	4	2	1
D6S249	7	2	2
D6S1716	5	5	5
D6S1717	2	2	2
D6S475	10	10	7
D6S1543	4	4	3
D6S1671	8	5	9
D6S283	2	4	4
D6S301	1	1	1
D6S1580	5	3	1
S6S1664	5	5	6
D6S261	4	8	8
D6S1639	12	15	7
D6S262	2	7	7

Die absoluten Allelgrößen der fünf Lozi und deren Frequenz wurde in nicht-verwandten deutschstämmigen Kontrollpersonen bestimmt und mit den NCMD assoziierten Allelen verglichen (Tabelle 8). Am Lokus D6S249 war der Krankheitsphänotyp mit den häufigen Allelen 2 (66,7% bei Betroffenen zu 68,0% bei Kontrollen) und 7 (33,3% zu 10,0%) verknüpft. Im Gegensatz dazu besaßen die betroffenen Individuen aller drei Familien am Lokus D6S1716 das Allel 5, während dies bei nur 23,0% der Kontrollen auftrat. Ein ähnliches Bild ergab sich für das Allel 2 am 2,54 cM proximal dazu liegenden Lokus D6S1717, das alle NCMD-Chromosomen aber nur 29,2% der Kontroll-Chromosomen besaßen. Bemerkenswerterweise konnte das Allel 10 am Lokus D6S475 in zwei Familien (L und A), aber nicht in 80 untersuchten Kontrollchromosomen gefunden werden. Auch am Lokus D6D1543 besaßen die Familien L und A das gemeinsame Allel 4. Dieses fand sich auch in 23% der untersuchten Kontrollen.

Der krankheitsassoziierte Haplotyp 5-2-10-4 (für die Lozi D6S1716, D6S1717, D6S475 und D6S1543) fand sich bei den beiden Familien L und A. Dagegen hatten die Familien A und W den krankheitsassoziierten Haplotypen 2-5-2 (für die Lozi D6S249, D6S1716 und D6S1717) gemeinsam. Damit war der Haplotyp 5-2 (für die Lozi D6S1716 und D6S1717) den betroffenen Mitgliedern aller drei Familien gemeinsam (Abbildung 15, Tabelle 7).

**Tab. 8: Allelfrequenzen der fünf core DNA-Marker in normalen und NCMD/CAPED Chromosomen.**

Lokus	Allel Nr.									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>D6S249</b>										
Größe (bp)	146	148	152	156	158	160	162	164	-	-
Frequenz (%)										
Kontrollen <sup>a)</sup>	2,0	68,0	1,0	15,0	1,0	2,0	10,0	1,0	-	-
Betroffene	0	66,7	0	0	0	0	33,3	0	-	-
<b>D6S1716</b>										
Größe (bp)	199	201	203	205	207	209	211	-	-	-
Frequenz (%)										
Kontrollen (n=62) <sup>b)</sup>	3,3	3,3	26,2	34,3	23,0	3,3	1,6	-	-	-
Betroffene	0	0	0	0	100	0	0	-	-	-
<b>D6S1717</b>										
Größe (bp)	112	114	116	118	120	122	124	126	128	132
Frequenz (%)										
Kontrollen (n=96) <sup>b)</sup>	38,6	29,2	2,1	8,3	1,0	3,1	11,5	3,1	2,1	1,0
Betroffene	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>D6S475</b>										
Größe (bp)	144	148	152	156	160	163	164	168	172	180
Frequenz (%)										
Kontrollen (n=80) <sup>b)</sup>	2,6	9,2	9,2	15,8	27,7	2,6	15,8	10,5	6,6	0
Betroffene	0	0	0	0	0	0	33,3	0	0	66,7
<b>D6S1543</b>										
Größe (bp)	101	111	113	115	117	119	121	123	125	-
Frequenz (%)										
Kontrollen (n=52) <sup>b)</sup>	0	11,5	17,3	23,0	30,9	11,5	5,8	0	0	-
Betroffene	0	0	33,3	66,7	0	0	0	0	0	-

<sup>a)</sup> Allelfrequenzen wurden vom *Cooperative Human Linkage Center (CHLC)*<sup>28</sup> übernommen.

<sup>b)</sup> Allelfrequenzen wurden von *n* nicht-betroffenen, unabhängigen Chromosomen bestimmt.

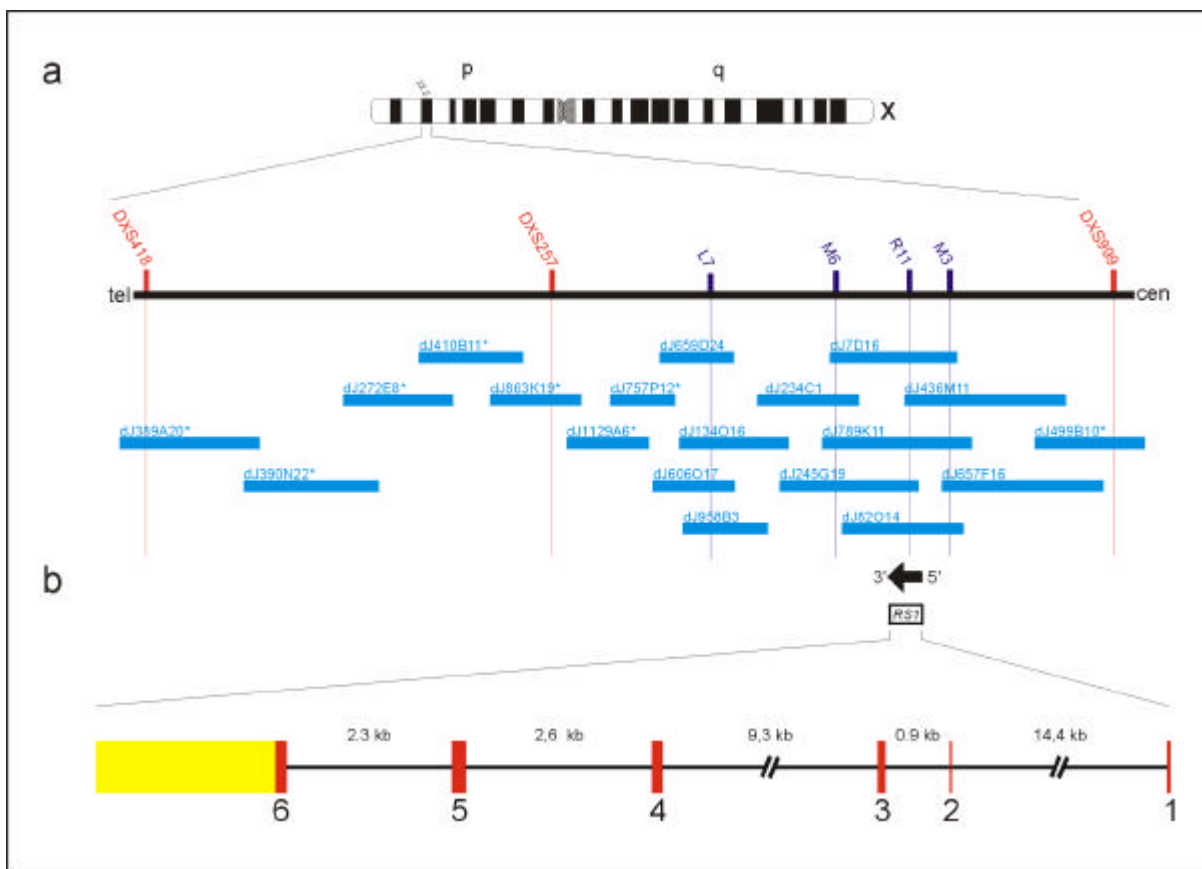
Unter der Voraussetzung eines Kopplungsgleichgewichtes, d.h. zufälliger Kombination der Allele an den gekoppelten Lozi und den in Tabelle 7 angegeben Allelfrequenzen, ergab sich für das Auftreten des Haplotypen 5-2-10-4 in der allgemeinen Bevölkerung, eine Wahrscheinlichkeit von  $0,230 \times 0,292 \times 0,001 \times 0,230 = 1,5 \times 10^{-4}$ . Analog dazu betrug die Wahrscheinlichkeit des Haplotypen 25-2 in der Normalbevölkerung  $4,6 \times 10^{-2}$ . Mit Hilfe des Theorems von Bayes ergab sich aus dem Haplotyp 5-2-10-4 der Familien L und A die Wahrscheinlichkeit für eine gemeinsame Abstammung von 99,9%. Aus dem Haplotyp 25-2, der den Familien A und W gemeinsam ist, ergab sich eine Wahrscheinlichkeit von 91,5%. Die Wahrscheinlichkeit, dass alle drei Familien den überlappenden Haplotypen 5-2 an den Lozi D6S1716 und D6S1717 aufgrund gemeinsamer Abstammung teilen, betrug 95,5%. Somit konnte mit Hilfe dieses ancestralen *core*-Haplotyps die kritische Kandidatengenregion zwischen die DNA-Marker D6S249 und D6S475 und damit um weitere 6,5 cM auf 3,2 cM eingengt werden (Abbildung 14b).

<sup>28</sup> <http://pgp.nci.nih.gov/CHLC/>

## 2. Analyse der Kandidatenregion für die X-gebundene Retinoschisis auf Chromosom Xp22.2

### 2.1 Erstellung eines PAC-contigs

Als Ausgangspunkt für die Klonierung eines PAC-contigs der Kandidatenregion für die X-gebundene Retinoschisis standen YAC-Klone aus dieser Region zur Verfügung (WARNEKE-WITTSTOCK *et al.* 1998). Mit Hilfe von Inter-Alu-PCRs wurden aus dem YAC-Klon 931\_E\_8 die Hybridisierungssonden L7, M3, M6 und R11 gewonnen (Abbildung 16a).



**Abb. 16: Physikalische Kartierung und genomischer Aufbau des RS1-Gens.**

**a.** Die Kandidatenregion für das RS1-Gen wurde zwischen die Marker DXS418 und DXS999 kartiert (HUOPANIEMI *et al.* 1997). Polymorphe DNA-Marker werden von roten, Inter-Alu Klone von dunkelblauen senkrechten Strichen repräsentiert. Überlappende PAC-Klone sind als hellblaue horizontale Balken angegeben. \*Die Anordnung der PAC-Klone dJ389A20, dJ390N22, dJ272E8, dJ410B11, dJ863K19, dJ1129A6, dJ757P12 und dJ499B10 wurde vom Sanger Centre<sup>29</sup> übernommen.

**b.** Genomische Organisation des RS1-Gens. Die Transkriptionsrichtung wird durch einen Pfeil angezeigt. Exone sind als rote Vierecke, die 3'-UTR als gelbe Fläche dargestellt. Intronische Sequenzen sind durch schwarze horizontale Linien repräsentiert. Die Anordnung und Größe der Exon-Intron-Struktur ist jeweils maßstabsgetreu angegeben.

Mit diesen Sonden wurden die PAC-Klone dJ7D16, dJ82O14, dJ134O16, dJ234C1 und dJ245G19 isoliert. Ihre Anordnung wurde mit Hilfe der isolierten Enden dieser PAC-Klone bestimmt. Die

<sup>29</sup> <http://www.sanger.ac.uk>

Endklone der PACs dJ134O16 und dJ82O14 dienten zur Isolierung der weiteren überlappenden PAC Klone dJ606O17, dJ657F16, dJ659D24, dJ789K11 und dJ958B3. Diese wurden aus den, zum damaligen Zeitpunkt in unserem Labor nicht verfügbaren, Segmenten RCPI3-5 der humanen RPCI-PAC-Bank, durch das Labor von P. Cooper in Buffalo, USA isoliert. Die zu dieser Zeit ebenfalls beginnende Sequenzierung einzelner PAC-Klone am *Sanger Centre*<sup>29</sup> ermöglichte die Vervollständigung des Klon-*contigs* mit den PAC-Klonen dJ272E8, dJ389A20, dJ390N22, dJ410B11, dJ499B10, dJ757P12, dJ863K19 und dJ1129A6. Mit Hilfe isolierter PAC-Endfragmente, sowie der DNA-Marker DXS418, DXS257 und DXS999 wurde die Anordnung dieser PAC-Klone bestätigt.

## **2.2 Analyse des Kandidatengens TU12**

### **2.2.1 Isolierung und Klonierung der TU12-cDNA**

Durch die Analyse von EST-Datenbanken konnte in der Kandidatengenregion eine EST-Sequenz identifiziert werden, welche durch vier unabhängige EST-Klone (ys86e07, ys67h08, ze40e12 und ze65b05) repräsentiert wurde. Alle diese EST-Klone entstammten der Soares Retina cDNA Bank. Der Vergleich der vorhandenen 5'- und 3'-Sequenzen dieser EST-Klone ermöglichte, unter Zuhilfenahme der durch das *Sanger Centre*<sup>29</sup> bereits publizierten Teilsequenzen des PAC-Klons dJ245G19, das Zusammensetzen einer etwa 1,8 kb großen zusammenhängenden Sequenz. Diese enthielt einen fast 1,5 kb großen LINE/L1 *repeat* am 3'-Ende (Abbildung 17). Um die Sequenz der cDNA weiter in 5'-Richtung zu verlängern, wurden die ersten *repeat*-freien 216 bp des EST-Klons ys86e07.r1 mit Hilfe der Oligonukleotidprimer ys86-f und ys86-r amplifiziert (siehe Anhang B und J). Mit dem erhaltenen PCR-Fragment wurde die  $\lambda$ gt10-HRET cDNA-Bank durchsucht. Dabei konnten mehrere positive Klone identifiziert werden. Die Sequenzierung des Klons 12/9, der mit einem Insert von 2,5 kb der größte dieser Klone war, ermöglichte die Identifizierung eines 426 bp großen offenen Leserahmens (ORF). Mit einem 200 bp großen *Eco* RI/*Cla* I-Fragment, das dem 5'-Ende von 12/9 entspricht, wurde die  $\lambda$ gt10-HRET cDNA-Bank erneut durchsucht. Dabei wurden 30 Klone identifiziert, von denen sechs isoliert wurden. Der mit 1,1 kb größte dieser Klone 6/4 enthielt weitere 261 bp ORF. Mit Hilfe von 5'-RACE Experimenten konnte die vorhandene Sequenz um weitere 28 bp in 5'-Richtung erweitert werden. Dabei wurden die Oligonukleotidprimer rsc6R für die Erststrang cDNA-Synthese, rsc5R für die erste und rshm4r-Sal/Spe für die zweite PCR verwendet. Somit konnten nochmals 5 bp ORF hinzugewonnen werden. Im Leseraster wurde 33 bp strangaufwärts vom ersten ATG-Startcodon ein Stoppcodon, TAA, gefunden.

-43	TTGAGTTCAGTAAGGTAGAGCTTTGGCCGAGGACGAGGGGAAGATGTCACGCAAGATAGAAGGCTTTTTGTTTACTTCTCTTTGGCTATGAAGCCACATTGGGATTATCGTCT	24
	<u>M S R K I E G F L L L L L F G Y E A T L G L S S</u>	
73	ACCGAGGATGAAGGCGAGGACCCCTGGTACCAAAAAGCATGCAAGTGCAGTTCGCAAGGAGGACCAATGCTCTGTGGTCTGCAGGTGCCACCTCCTGGACTGTATACCAGAAT	62
	T E D E G E D P W Y Q K A C K C D C Q G G P N A L W S A G A T S L D C I P E	
	C40X	
188	GCCATATACAAGCCTCTGGGTTTCGAGTCAGGGGAGGTACACCGGACAGATCACCTGCTCTAACCCGGAGCAGTATGTGGGCTGGTATTCTTCGTGGACTGCAAAAAGGC	101
	C P Y H K P L G F E S G E V T P D Q I T C S N P E Q Y V G W Y S S W T A N K A	
	W96R	
303	CCGGCTCAACAGTCAAGGCTTTGGGCTGTCCTCAAGTTCAGGACAGTAGCCAGTGGTTACAGATAGATCTGAAGGAGATCAAAGTGATTTCAGGGATCCTCACCCAG	139
	<u>R L N S Q G F G C A W L S K F Q D S S Q W L Q I D L K E I K V I S G I L T Q</u>	
	R102W G109R	
418	GGCGCTGTGACATCGATGAGTGGATGACCAAGTACAGCGTGCAGTACAGGACCGATGAGCGCTGAATGGATTACTACAAGGACCAGACTGGAAACAACCGGCTCTCTATG	177
	<u>G R C D I D E W M T K Y S V Q Y R T D E R L N W I Y Y K D Q T G N N R V F Y</u>	
	Ex6	
533	GCAACTCGGACCGACCTCCACGGTTCAGAACCTGCTGCGGCCCCCATCATCTCCGCTTCATCCGCCTCATCCGCTGGGCTGGCAGTCCGCATTGCCATCCGGATGGAGCT	216
	<u>G N S D R T S T V Q N L L R P P I I S R F I R L I P L G W H V R I A I R M E L</u>	
	P192S P193L R209H	
648	GCTGGAGTGCCTCAGCAACTGTGCCTGATGCCTGCCTCAGCTCGCGCCTGCCAGGGGTGACTGGCACAGAGCGGGCCGTAGGGGACCCCTCACACACCACCGAGATGGACAG	224
	L E C V S N C A *	
763	GGCTATATTCGCAAAAGCAATTGTAAGTGCAGTGTGGGTAGATAATTTTTTTTTTTAAGATATAGCTTCTGATTCAATGAATAATAAATGAACATTATCCCACTCAGGG	
878	CCAGAGAAAGTCAAGCAAAAGAAAATGTCCCGAAACGAATTTCTTACAAAAGCCTAAGTAGCAGGGGTAATTTCTGCTCATTTTTCTCAGTGATACTGTGAAAGGTGCA	
993	GTCTCAGGGGAACACAAAGCAGCCCTGATAATTTGAAAATTCATTTGCTTTACCACATTCAAGATAGAAAACATACAGTTTCTAAAGCCTGGCTTTGAATGCGAAGGGAGCAGC	
1108	TCCTCTAGTTAAGTTTCCACTAAATCATCGCCAAAGAGGACTTCACAGCCCTGGGAGGCAGCTGAGGGTCTCAAGGGTACTGGGTGGCAGCGATGAGTCCGGTGGTGAGAA	
1223	TCCCGTGCCTGAGAGGCTATACGTGACAAATGACAAAAGCCCAACGTTAGGGAGTTCCTCTGCTCACAGTCTTACCTTCAAGCGGATCTGGGCTTCCACCTCATGAAC	
1338	ACAGGGATTGGGAGGACACAGGCGCCCAATACACACAGTCCATTATGCAATCCATTCCAGCAAATTCCTGCTGTGTGGTCCACATTTAGGTGATACACAGGACGGCTG	
1453	CACATCTCAGTATATGTAGGACCCAAATGACCAACACAGTACAATTCGCTTTACCTAGGGTACCATTTCCTAGCAAACCAACATAGTTCGAGAACAGCTGGCCAGGA	
1568	GCTACCAGTGGCTACTCAGAGGAGCTCATTAGCTGGTACATGCTTCGAGGAAGTGGGAAGGACTCACATCAAAAAGGACCATGTAGCTTTTTCCCTGAAAGCTTCTCACC	
1683	CTCCACCTCTGCCTTGAATACGCAAACTGCGCTGCTCTGAAAAGCTCTCTGGGAAGGAATGGGCTGGCTTCCGTTCTGGAGCGCGCCCTTAGATTGGGAGGCGCTCAT	
1798	TGGCACTTAGAGCGCAGCTGAGTTTCCAGGCCCTTCTGGGAGAGGCTGTTAACACGGGGAGGGGAGGAGAGGATATGGAGAGCAGGTGTGAATCAGAGGACGAGGCT	
1913	GCDTAAAGACTGTTCTGGCCGACAGCAGGGTAGTCTTTGCTAGCAGCTATTCCGAGTACTTTTTCATTTTCAAATGCCAAGCAAGTACTAGACTCGCGTAATACAGT	
2028	GCTGGACAACACATTACCTTTTCTGTGAACAGGAGCCTTCTAAAAGCCCAACATCTTCTGTATGCTTTGGGGCTCAATTAATTTTATATCAACCCAGCATCTTTCTAGT	
2143	CCCTATGCTGTATGCTTGAAGTTCGGAAAATGCTTTTCCCGCCCAATCTCTCTCAAATAAACAACATCACACAGGGTGTGGGGTGGGGGGGGGGGGGGGACTTATC	
2258	CCTGGCCTTAGGACACAGGACAAATCTATTTGGATAGAAATGCTGTAACAGAGCCCTTATTTGAAAAGTGAATTAACCTTGGTCAAGCATGGACTGTGACAAAATGGCA	
2373	GTATCCTAAGAGTTAAGGCATCAAAACACAGGAGTGCAGAGATGCAGTTCAGGAAAAAGGAGAGGAGAAACAGTGAGGAGGAGAAAAGGCTTCCAAAATAAGAGTTCATG	
2488	TTGAAACTtttgcacggctttattgagattaagttcacatacaatttgatccattaaagtgtacaatttgatgacttttggtatattcagagttgtgcaaccattatcact	
2603	agatcaattttagaagtttatcacccaaagagaatcctgcacccatcagccaactcccaaccatcgccaccceagccctctgcaaccacgaatcgactgtctctgt	
2718	agattggcctcttgagctttcacataaatgaaatcatatagtagtggtatttctgactggcttcttcaacttagcatagtgtttaagttcatcacggtataaacatggt	
2833	atcactatgctcattgtcactccttttattgctgaacatcattgttcagatcatgtcaagagcaccattgttatttatccattcatcattgatggatatttgggtttcactc	
2948	tttagctattatgaataatgctgctatgaacatttgggtataagttttgctggatgtgttttcatattatcttgggtatatacttaggagtaaaactgctgggacacagat	
3063	cactctgtttaaactcttggggaactattatcccaagtgctgcatcttttacattccaccagcaatgtaggaggttccactttctccacatctcagcaactgtgttac	
3178	tgtccatcttgactatacccaatagtgtaggtgcatctcaactgtggttttgatttgcaattccctagtgactaatgatgtgagcatctttcatgtgtttactggccat	
3293	ttgtacatcttggataaaggcttttcagatcctctgccatttttaaacggcttacaactactgagtttaagaattctttgatattctaattcccttattggatgattttg	
3408	caaatattttcccaattctgtggatcttttaaccctctcgatagagtcctcttaagcacaataatttaaatattttgatgaagtcgaattttttctcttctgtgctt	
3523	tggtgtcatatcagaacaaccactgccaatccaaggtcatgaagattaccctatgttttctctatgagtttatagttctacctctacagtagatctttgttccatttt	
3638	gagttaattttgtataggtgtgaaataggagtcacaactcattctttgcatggatccagttgtccaccactatttggtaaaagactattcttccccattgaaatg	
3753	atcttggcaccctgtcaaaaaaacttgaccataaatgtgagagggtttattctggactccaaattctattacctcatttcttattttagcttctgtagcttctgtagtaagtttga	
3868	aatggggcatgtgagtcctccaactcctcctcgggattgtttggctattctgggttcttgaatttccatagaaataactaacctgtccatcattgcaaaagaagcag	
3983	ctgggatttCACATTGAAACTGCTCAATCTCAGAATTTAATAAACACTAAGATATACGATTCAAGACA	

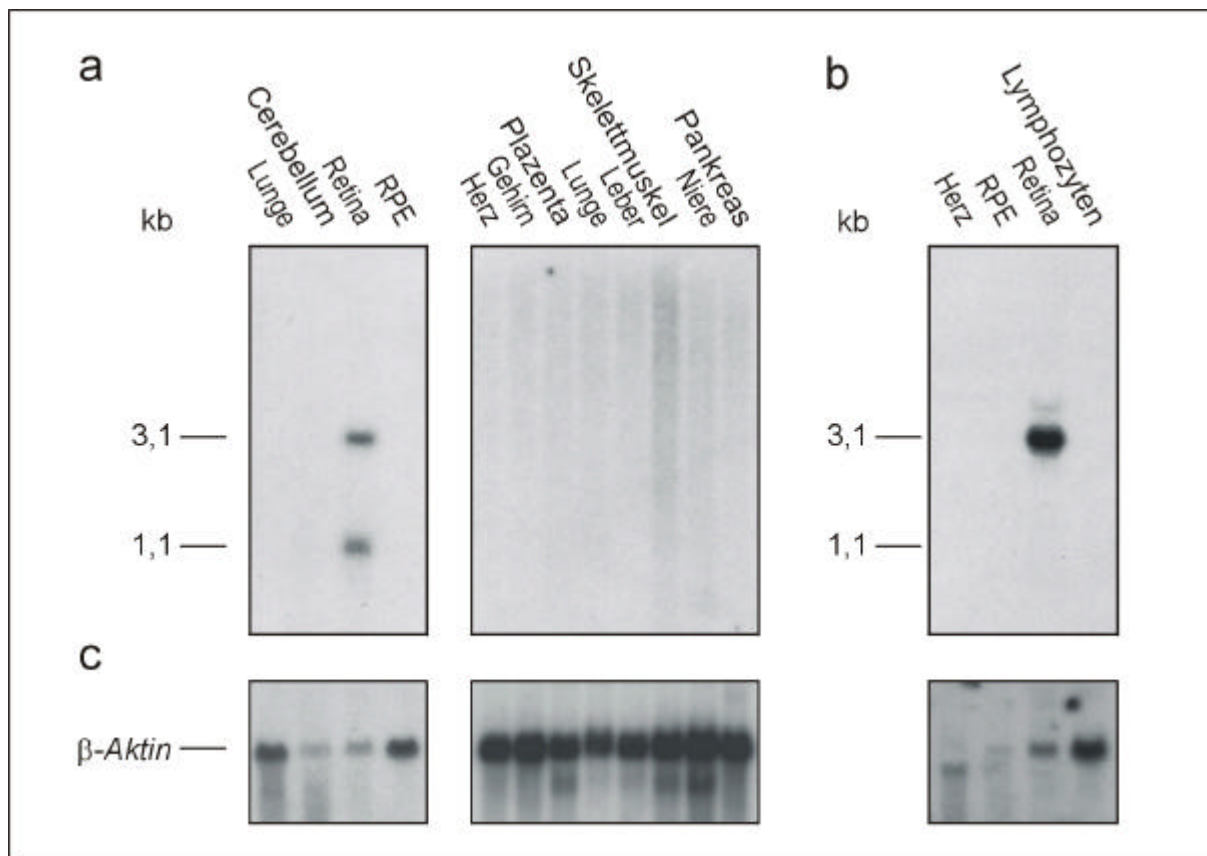
**Abb. 17: cDNA-Sequenz von TU12.**

Die Proteinsequenz ist unterhalb der Nukleotidsequenz der TU12-cDNA angegeben. Die Zahlen auf der linken Seite bezeichnen Nukleotid-, die Zahlen auf der rechten Seite Aminosäurepositionen. Die Lage der Exon/Intron Grenzen wird durch senkrechte Striche gekennzeichnet (siehe 2.2.3). Der 1,5 kb große LINE/L1-repeat innerhalb der 3'-UTR ist in Kleinbuchstaben dargestellt. Die in den RS-Patienten gefundenen *missense* und *nonsense* Mutationen sind unterhalb der Proteinsequenz dargestellt (siehe 2.2.5). Aminosäurereste, die mit der Konsensus-Sequenz des Discoidin Motivs übereinstimmen, sind einfach unterstrichen (siehe 2.2.4). Die 23 Aminosäurereste der vermeintlichen Leadersequenz sind doppelt unterstrichen. Vorhergesagte poly(A)-Signalsequenzen sind umrahmt.

Insgesamt konnten somit 4055 bp cDNA-Sequenz isoliert werden. Diese enthielt einen ORF von 692 bp mit einem ersten Startcodon, ATG, dreißig Nukleotide strangabwärts. Zwei potentielle poly(A)-Signalsequenzen wurden an den Nukleotidpositionen + 848 bis + 853 und + 4024 bis + 4029 vorhergesagt (Abbildung 17).

### 2.2.2 Expressionsanalyse

Das Expressionsprofil von TU12 wurde durch Northern Blot Analysen bestimmt. Dazu wurden mehrere RNA-Filter mit zwei unterschiedlichen DNA-Proben hybridisiert. Die RNA-Filter enthielten jeweils etwa 12 µg Gesamt-RNA von verschiedenen menschlichen Geweben wie Lunge, Cerebellum, Retina, RPE, Herz und peripheren Blutlymphozyten. (Abbildung 18). Zusätzlich wurde ein *multiple tissue northern blot* (MTN) (Clontech) verwendet. Dieser besteht aus polyA<sup>+</sup>RNA, die aus humanem Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere und Pankreas isoliert wurde (Abbildung 18a).



**Abb. 18: Northern Blot Analyse von TU12.**

**a**, Zwei Transkripte mit einer Größe von 1,1 kb und 3,1 kb wurden mit der Hybridisierungsprobe 6/4 in der Gesamt-RNA der Retina gefunden. In allen anderen Geweben wurden keine positiven Hybridisierungssignale gefunden. **b**, Das 216 bp PCR-Fragment aus der 3'-UTR (Nukleotidposition + 2288 bis + 2503) von *TU12* identifizierte lediglich das 3,1 kb Transkript. **c**, Um die gleichmäßige Beladung des Gels und die Integrität der RNA zu überprüfen, wurden die Northern Blots mit einer humanen  $\beta$ -Aktin Probe hybridisiert.



Als Hybridisierungsprobe wurde das Insert von Klon 6/4 verwendet. Dieses beinhaltet neben dem vollständigen codierenden Bereich von TU12 noch 15 bp der 5'-UTR, sowie 253 bp der 3'-UTR. Für eine zweite Hybridisierungsprobe wurde mit Hilfe des Primerpaars ys86-f/ys86-r ein 216 bp großes PCR-Produkt aus dem EST Klon ys86e07 amplifiziert (siehe Anhang B und J). Dieses repräsentiert die Nukleotidpositionen +2288 bis +2503 der 3'-UTR von TU12. Signale konnten mit beiden Hybridisierungsproben ausschließlich in der Gesamt-RNA von humaner Retina nachgewiesen werden (Abbildung 18a, b). Während mit Klon 6/4 zwei Transkripte mit einer Größe von 1,1 kb und 3,1 kb detektiert wurden, ergab die Hybridisierung mit dem 216 bp PCR-Fragment nur das größere 3,1 kb Transkript. Zur Kontrolle einer gleichmäßigen RNA-Konzentration, sowie der Integrität der RNA wurde anschließend eine Hybridisierung der RNA-Fiter mit einer humanen  $\beta$ -Aktin cDNA-Probe (Clontech) durchgeführt (Abbildung 18c).

### 2.2.3 Genomische Organisation

Für die Bestimmung des genomischen Aufbaus von TU12 wurde die cDNA Sequenz mit den beim *Sanger Centre*<sup>30</sup> vorliegenden genomischen PAC-Sequenzen abgeglichen. Mit Hilfe von BLAST-Analysen konnten so fünf Exon-Intron Grenzen bestimmt werden (Tabelle 9, Abbildung 16b). Dabei waren fünf (1-3, 5 und 6) der sechs Exone in der zum damaligen Zeitpunkt noch unvollständigen Sequenz von PAC-Klon dJ245G19 enthalten. Da Exon 1 noch zusätzlich in PAC-Klon dJ436M11 vorhanden war, ergab sich aufgrund der Anordnung des PAC-*contigs* eine Transkriptionsrichtung für TU12 vom Zentromer zum Telomer (Abbildung 16b). Die genomische Struktur von Exon 4 (Nukleotidposition +185 bis +326 der cDNA-Sequenz) wurde mit Hilfe eines 3,4 kb großen *Pst* I-Fragments aus PAC-Klon dJ245G19 bestimmt. Dazu wurde dieses in den Vektor pBluescript® II KS (+) subkloniert und die Exon-Intron Grenzen durch Sequenzierung mit den Primern 9orf1-rev und rsc4F bestimmt. Die Bestimmung der Introngrößen erfolgte entweder direkt anhand der vorhandenen PAC-Sequenzen, oder durch PCR-Analyse.

**Tab. 9: Genomische Struktur von TU12.**

Exon	Größe (bp)	3'-Akzeptor	Spleißstelle <sup>a</sup>	5'-Donor	Spleißstelle <sup>a</sup>	Genbank Acc. No.	Introngröße (kb <sup>b</sup> /kb <sup>c</sup> )
1	52			...TATGAAG	gtatgtg...	AF018958	>7 / 14,4
2	26	...gctttag	CCACATT...	...TACCGAG	gtatgta...	AF018959	0,9
3	106	...gctgcag	GATGAAG...	...ATACCAG	gtgagta...	AF018960	1,6 / 9,3
4	142	...ttccag	AATGCC...	...GCTTTGG	gtaagca...	AF018961	1,9 / 2,6
5	196	...tcggcag	GTGTGCC...	...CAACCGG	gtaagtt...	AF018962	2,2 / 2,3
6	153	...tctctag	GTCTTCT...			AF018963	

<sup>a</sup> Exonische Sequenzen sind als Großbuchstaben, intronische Sequenzen als Kleinbuchstaben dargestellt.

<sup>b</sup> Introngröße geschätzt anhand amplifizierter PCR-Produkte.

<sup>c</sup> Introngröße ermittelt durch Sequenzierung von PAC-Klonen durch das *Sanger Centre*<sup>30</sup>.

<sup>30</sup> <http://www.sanger.ac.uk>

## 2.2.4 Analyse der vorhergesagten Proteinsequenz

Die Nukleotidsequenz ggggaagATGT umgab das erste ATG-Startcodon der TU12-cDNA und stimmte gut mit der Kozak Konsensussequenz für einen effizienten Translationsstartpunkt überein (KOZAK 1987). Ein *in-frame* TAA-Stoppcodon wurde 33 bp strangaufwärts vom Startcodon gefunden. Die ersten 23 Aminosäurereste wurden als Signalpeptid für den Proteinexport vorhergesagt. Sie enthielten mit der Domäne (Gly-Phe-Leu-Leu-Leu-Leu-Phe-Gly-Tyr-Glu) die am stärksten hydrophobe Region des gesamten Proteins. Hinzu kamen zwei positiv geladene Aminosäurereste Arg und Lys, welche der hydrophoben Domäne vorausgehen. Schließlich war mit Gly21-Xaa-Ser23 eine potentielle Spaltstelle für eine Peptidase vorhanden. Diese erfüllte die „-1, -3 Regel“ für die Erkennungssequenz der Signalpeptidase (GIERASCH 1989; Abbildung 17). Das aus dem vorhandenen ORF der TU12-cDNA vorhergesagte reife Protein bestand damit aus 201 Aminosäureresten mit einem Molekulargewicht von 23 kDa. Der theoretische isoelektrische Punkt lag bei pH 5,5. Eine N-gebundene Myristylierungsstelle wurde für die Positionen Gly44-Gly45-Pro46-Asn47-Ala48-Leu49 vorhergesagt. N-gebundene Glykosilierungsstellen wurden nicht vorhergesagt. Zehn Cysteinreste im reifen Protein könnten an der Ausbildung von Disulfidbrücken beteiligt sein.

Der Vergleich der vorhergesagten Proteinsequenz mit der ProDom-Datenbank<sup>31</sup> ergab eine starke Sequenzähnlichkeit (Codons 101 bis 203) zur Discoidin-Domäne, welche als erstes im Protein Discoidin I des Schleimpilzes *Dictyostelium discoideum* gefunden wurde (Abbildung 19). Diese in der Evolution hochkonservierte Domäne findet sich auch in etlichen anderen Proteinen, wie z.B. den Koagulationsfaktoren V und VIII, dem globulären Milchfett-Membranprotein, dem neuronalen Zelloberflächenprotein Neuropilin, der Zelladhäsions-Rezeptor Tyrosinkinase und Haemocytin, einem humoralen Lectin bei Insekten. Die Discoidin-Domäne ist an der Bindung von Phospholipiden und der Ausbildung von Zell-Zell-Interaktionen beteiligt.

---

<sup>31</sup> <http://protein.toulouse.inra.fr/prodom.html>

P02886-DISA (D. discoideum) [85-136]	NYKN.NGNTIDGSEAWGSSSI...VDTNQYTVAGCEVPTFIC:ALDG...RGDADQWVTSYKRYSLDNLSEFRNGP...AVTGVTDNTVNHFFDTPRAPSSTARIP
P02887-DISC (D. discoideum) [85-136]	NYKN.KGNTIDGSEAWGSSSI...VDTNQYVAGCEVPTFIC:ALDG...RGDHDQVTSYKRYSLDNLSEFRNGA...AITGVTDNTVNHFFDTPRAPSSTARIP
P02888-DISD (D. discoideum) [85-136]	NYKN.KGNTIDGSEAWGSSSI...VDTNQYVAGCEVPTFIC:ALDG...RGDHDQVTSYKRYSLDNLSEFRNGA...AITGVTDNTVNHFFDTPRAPSSTARIP
P42530-DIS2 (D. discoideum) [98-138]	NFSNSKDSARFDGSES:SSSV...LDKNCVAGSDSVHFAV:STGG...RGDHDQVTSYKRYSLDNLSEFRNGE...IINAKNSVITINFPPKARSTARIP
Q08431-MFGM (H. sapiens) [85-202]	..PSYRLDKGKFNANWAGS...YGNQDWQVDLSS:EVG:ITOGA...NFSGVQVTSYKRYSLDNLSEFRNGE...IINAKNSVITINFPPKARSTARIP
P79385-MFGM (S. scrofa) [124-231]	..PELRLHAGLVNWTASN...YDRNPMQVLLRRIRV:G:VTOGA...SRAGSAEYKTEKAYSIDGRK:FOIGAEESGKI:FGNLDNSGKWNLEVP:EVQ:VLR:VLP
P79385-MFGM (S. scrofa) [285-393]	..YPFYRLDNCGFVANWTAQS...NSASEMQLDLSQ:RV:G:VTOGA...DFGHIOYAAVKAYSIDGRK:FOIGAEESGKI:FGNLDNSGKWNLEVP:EVQ:VLR:VLP
Q95114-MFGM (B. taurus) [142-248]	..PELRLHAGLVNWTASN...YDRNPMQVLLRRIRV:G:VTOGA...SRAGSAEYKTEKAYSIDGRK:FOIGAEESGKI:FGNLDNSGKWNLEVP:EVQ:VLR:VLP
P21956-MFGM (M. musculus) [180-287]	..FPYRLDNCGFVANWTAQS...NSASEMQLDLSQ:RV:G:VTOGA...DFGHIOYAAVKAYSIDGRK:FOIGAEESGKI:FGNLDNSGKWNLEVP:EVQ:VLR:VLP
P21956-MFGM (M. musculus) [341-447]	..PELRLHAGLVNWTASN...YDRNPMQVLLRRIRV:G:VTOGA...SRAGSAEYKTEKAYSIDGRK:FOIGAEESGKI:FGNLDNSGKWNLEVP:EVQ:VLR:VLP
P70490-MFGM (R. norvegicus) [143-251]	..YPHLRLDNCGFVANWTAQS...NSASEMQLDLSQ:RV:G:VTOGA...DFGHIOYAAVKAYSIDGRK:FOIGAEESGKI:FGNLDNSGKWNLEVP:EVQ:VLR:VLP
P70490-MFGM (R. norvegicus) [305-411]	..PELRLHAGLVNWTASN...YDRNPMQVLLRRIRV:G:VTOGA...SRAGSAEYKTEKAYSIDGRK:FOIGAEESGKI:FGNLDNSGKWNLEVP:EVQ:VLR:VLP
P12259-FA5 (H. sapiens) [1933-2045]	..EPFLRLDNCGFVANWTAQS...NSASEMQLDLSQ:RV:G:VTOGA...DFGHIOYAAVKAYSIDGRK:FOIGAEESGKI:FGNLDNSGKWNLEVP:EVQ:VLR:VLP
Q28107-FA5 (B. taurus) [1920-2032]	..EPFLRLDNCGFVANWTAQS...NSASEMQLDLSQ:RV:G:VTOGA...DFGHIOYAAVKAYSIDGRK:FOIGAEESGKI:FGNLDNSGKWNLEVP:EVQ:VLR:VLP
P00451-FA8 (H. sapiens) [2086-2172]	..EPFLRLDNCGFVANWTAQS...NSASEMQLDLSQ:RV:G:VTOGA...DFGHIOYAAVKAYSIDGRK:FOIGAEESGKI:FGNLDNSGKWNLEVP:EVQ:VLR:VLP
P00451-FA8 (H. sapiens) [2223-2329]	..EPFLRLDNCGFVANWTAQS...NSASEMQLDLSQ:RV:G:VTOGA...DFGHIOYAAVKAYSIDGRK:FOIGAEESGKI:FGNLDNSGKWNLEVP:EVQ:VLR:VLP
Q06194-FA8 (M. musculus) [2034-2143]	..EPFLRLDNCGFVANWTAQS...NSASEMQLDLSQ:RV:G:VTOGA...DFGHIOYAAVKAYSIDGRK:FOIGAEESGKI:FGNLDNSGKWNLEVP:EVQ:VLR:VLP
Q06194-FA8 (M. musculus) [2191-2297]	..EPFLRLDNCGFVANWTAQS...NSASEMQLDLSQ:RV:G:VTOGA...DFGHIOYAAVKAYSIDGRK:FOIGAEESGKI:FGNLDNSGKWNLEVP:EVQ:VLR:VLP
P79795-NRP (G. gallus) [300-406]	..SSESRRLNYPENWTPGE...DSVREMQVDLGLL:V:SG:GTOGATS...SLTSMF:KEI:ISSQDGH:HTOILYKGNP...K:FGNQDSS:PMNSLDP:LLTR:VLR:VLP
P79795-NRP (G. gallus) [456-546]	..SSESRRLNYPENWTPGE...DSVREMQVDLGLL:V:SG:GTOGATS...SLTSMF:KEI:ISSQDGH:HTOILYKGNP...K:FGNQDSS:PMNSLDP:LLTR:VLR:VLP
BAA08789-NRP (M. musculus) [302-408]	..SSESRRLNYPENWTPGE...DSVREMQVDLGLL:V:SG:GTOGATS...SLTSMF:KEI:ISSQDGH:HTOILYKGNP...K:FGNQDSS:PMNSLDP:LLTR:VLR:VLP
BAA08789-NRP (M. musculus) [458-548]	..SSESRRLNYPENWTPGE...DSVREMQVDLGLL:V:SG:GTOGATS...SLTSMF:KEI:ISSQDGH:HTOILYKGNP...K:FGNQDSS:PMNSLDP:LLTR:VLR:VLP
P28824-NRP (X. laevis) [302-408]	..SSESRRLNYPENWTPGE...DSVREMQVDLGLL:V:SG:GTOGATS...SLTSMF:KEI:ISSQDGH:HTOILYKGNP...K:FGNQDSS:PMNSLDP:LLTR:VLR:VLP
P98092-HMCT (B. mori) [874-1079]	..SSESRRLNYPENWTPGE...DSVREMQVDLGLL:V:SG:GTOGATS...SLTSMF:KEI:ISSQDGH:HTOILYKGNP...K:FGNQDSS:PMNSLDP:LLTR:VLR:VLP
Q08345-CAK (H. sapiens) [84-168]	..SSESRRLNYPENWTPGE...DSVREMQVDLGLL:V:SG:GTOGATS...SLTSMF:KEI:ISSQDGH:HTOILYKGNP...K:FGNQDSS:PMNSLDP:LLTR:VLR:VLP
Q16832-TRK3 (H. sapiens) [84-168]	..SSESRRLNYPENWTPGE...DSVREMQVDLGLL:V:SG:GTOGATS...SLTSMF:KEI:ISSQDGH:HTOILYKGNP...K:FGNQDSS:PMNSLDP:LLTR:VLR:VLP
Q62371-TRK3 (M. musculus) [84-168]	..SSESRRLNYPENWTPGE...DSVREMQVDLGLL:V:SG:GTOGATS...SLTSMF:KEI:ISSQDGH:HTOILYKGNP...K:FGNQDSS:PMNSLDP:LLTR:VLR:VLP
KONSENSUS	..SSESRRLNYPENWTPGE...DSVREMQVDLGLL:V:SG:GTOGATS...SLTSMF:KEI:ISSQDGH:HTOILYKGNP...K:FGNQDSS:PMNSLDP:LLTR:VLR:VLP
TU12 (H. sapiens) [101-203]	..SSESRRLNYPENWTPGE...DSVREMQVDLGLL:V:SG:GTOGATS...SLTSMF:KEI:ISSQDGH:HTOILYKGNP...K:FGNQDSS:PMNSLDP:LLTR:VLR:VLP

Abb 19: Vergleich der TU12-Proteinsequenz mit den Discoidin-Domänen verschiedener Proteine bei unterschiedlichen Spezies.

Hochkonservierte Aminosäurereste sind schwarz, ähnliche Aminosäurereste sind grau, unterlegt. Die Swiss-Prot Zugangsnummer ist für jede Sequenz angegeben. Die jeweilige Position der Domäne im Gesamtprotein steht in eckigen Klammern.

DISA, Discoidin I, Unterinheit C (SPRINGER *et al.* 1984); DISC, Discoidin I, Unterinheit C (SPRINGER *et al.* 1984); DISD, Discoidin I, Unterinheit D (SPRINGER *et al.* 1984); DIS2, Discoidin II (FUKUZAWA & OCHIAI 1996); MFGM, milk-fat globule membrane protein (LAROCCA *et al.* 1991; HVARREGAARD *et al.* 1996; OGURA *et al.* 1996); FA5, Faktor V (CRIPE *et al.* 1992); FA8, Faktor VIII (STUBBS *et al.* 1990; ELDER *et al.* 1993; TRUETT *et al.* 1985); NRP, Neuropilin (TAGAKI *et al.* 1995; KAWAKAMI *et al.* 1995; TAGAKI *et al.* 1991); HMCT, Haemocytin (KOTANI *et al.* 1995); CAK, Zelladhäsions-Kinase (SANCHEZ *et al.* 1994; PEREZ *et al.* 1994); TRK3, Receptor Tyrosin Kinase 3 (KARN *et al.* 1993).



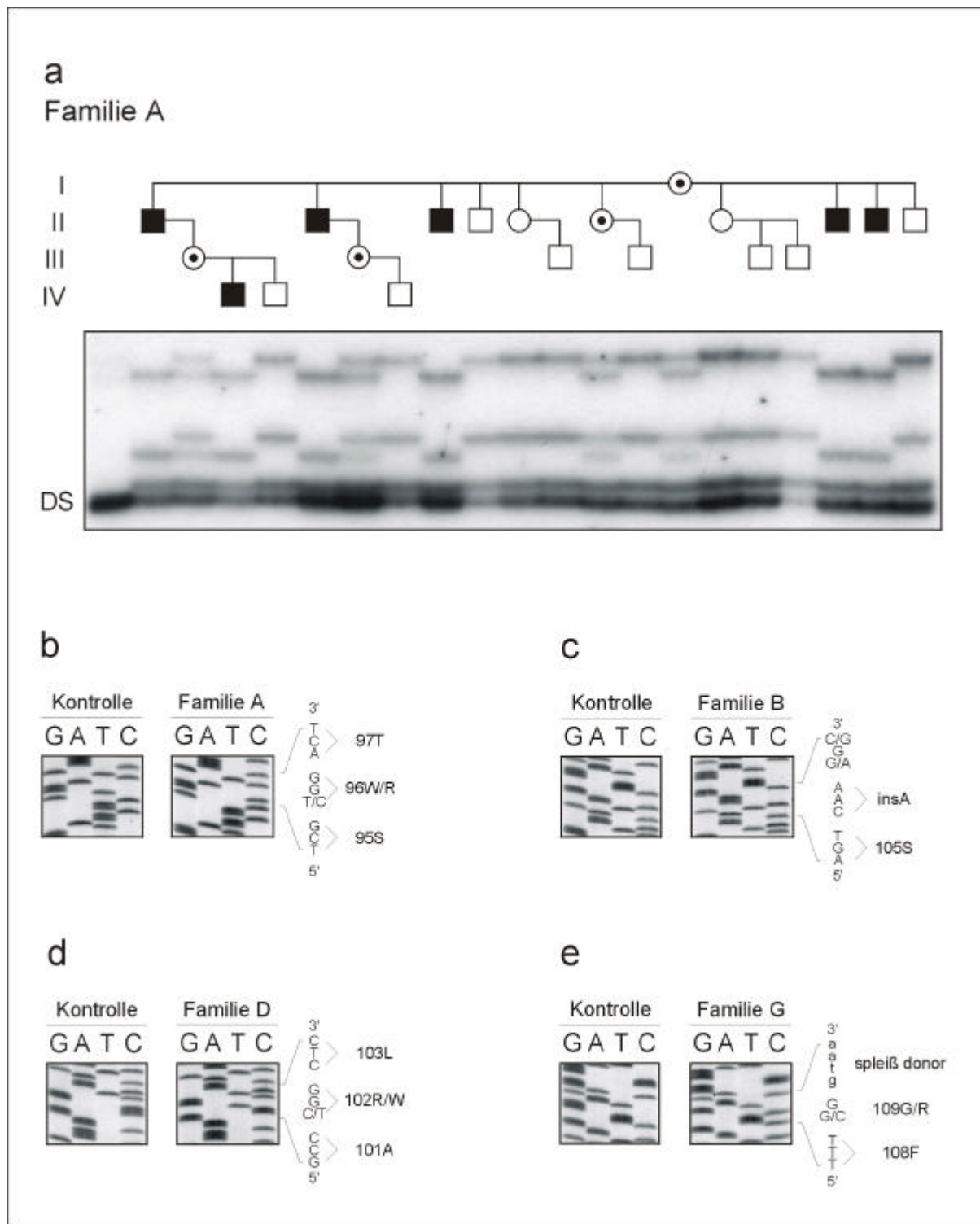
### 2.2.5 Mutationsanalyse in Retinoschisis Patienten

Für die Mutationsanalyse stand die genomische DNA von betroffenen Personen aus neun, nicht miteinander verwandten, RS-Familien zur Verfügung. Mit Hilfe von SSCP-Analysen und direkten Sequenzierungsreaktionen, wurde pro Familie jeweils ein Erkrankter auf Veränderungen in den sechs Exonen von TU12 untersucht. Dazu wurden Exon-flankierende Oligonukleotidprimer generiert (siehe Anhang B und J). Bei dieser von A. Gehrig durchgeführten Analyse konnten in allen neun Individuen Mutationen gefunden werden (Abbildung 20, Tabelle 10). Damit konnte gezeigt werden, dass Mutationen in TU12 mit dem Krankheitsbild der X-gebundenen juvenilen Retinoschisis assoziiert sind. Daher wurde für TU12 die offizielle Bezeichnung *RS1* (Alias: *XLR1*) gewählt.

Der Austausch eines Adenin- nach Guaninrestes im Intron 2, an der Position -2 der 3'-Spleißstelle (IVS2-2A>G) sollte zu einer Spleißvariante strangabwärts von Exon 2 führen. Eine *nonsense*-Mutation im Codon 40 (C40X), führte zu einem vorzeitigen Terminationssignal und damit zu einem erheblich verkürzten Genprodukt. Die Insertion eines Adeninrestes an der Nukleotidposition + 316 (316insA) führte durch die Verschiebung des Leserasters ebenfalls zu einem verfrühten Stoppsignal (Abbildung 20c). Das resultierende 119 Aminosäuren lange Polypeptid besaß zusätzlich einen um 13 Aminosäuren modifizierten C-Terminus. Bei den restlichen sechs gefundenen Veränderungen (W96R, R102W, G109R, P192S, P193L und R209H) handelte es sich um *missense*-Mutationen (Abbildung 20, Tabelle 10). Vier dieser Varianten lagen innerhalb der phylogenetisch konservierten Discoidin-Domäne, welche die Codons 101 bis 203 umfasst (Abbildung 19), wobei drei Veränderungen (R102W, P192S und P193L) direkt hochkonservierte Positionen der Konsensus-Sequenz betrafen (Abbildung 17). Die zwei Varianten (W96R und R209H) lagen in unmittelbarer Umgebung zur Discoidin-Domäne. Während im Codon 96 die Transition eines Thymidin- nach Cytosinrestes ein unpolares Tryptophan gegen ein positiv geladenes Arginin ersetzte (Abbildung 20a, b), wurde aufgrund eines G nach A Austausches im Codon 209, ein positiv geladenes Arginin gegen ein ebenfalls positiv geladenes Histidin ersetzt.

**Tab. 10: Gefundene Sequenzveränderungen in TU12.**

Aminosäureveränderung	Familie	Nukleotidveränderung	Exon
3'-Spleißstelle	F	IVS2-2A>G	IVS2
C40X	E	120C>T	3
W96R	A	286T>C	4
R102W	D	304C>T	4
<i>frameshift</i>	B	316insA	4
G109R	G	325G>C	4
P192S	26	574C>T	6
P193L	Gr	578C>T	6
R209H	10	626G>A	6



**Abb. 20: Mutationsanalyse des RSI-Gens in RS Patienten.**

**a.** Kosegregation von RS mit einer T nach C Transition in Codon 96 von TU12 in einem Zweig der Familie A. **b.** Identifizierung der T nach C Transition in Codon 96 (Familie A). **c.** Identifizierung der Insertion eines Adeninrestes an der Nukleotidposition 316 in Familie B. **d.** In Familie D verändert der Austausch eines C nach T im Codon 102 ein hochkonserviertes Arginin in ein Tryptophan. **e.** missense-Mutation im Codon 109 bei Familie G.

Für alle gefundenen Sequenzveränderungen, mit Ausnahme von P192S und R209H, konnte gezeigt werden, dass sie mit der Krankheit segregieren (Abbildung 20a und nicht gezeigte

Daten). Die Familien 26 (P192S) und 10 (R209H) waren zu klein um eine Segregationsanalyse durchzuführen. Da alle *missense*-Mutationen in den Exonen 4 und 6 gefunden worden waren, wurden diese zusätzlich in 90 Chromosomen einer SSCP-Analyse unterzogen. Unter Bedingungen, in denen die Mutationen leicht zu erkennen gewesen wären, konnten keinerlei *mobility shifts* nachgewiesen werden.

## **2.3 Untersuchungen zur Funktion des *RS1*-Gens in der Retina**

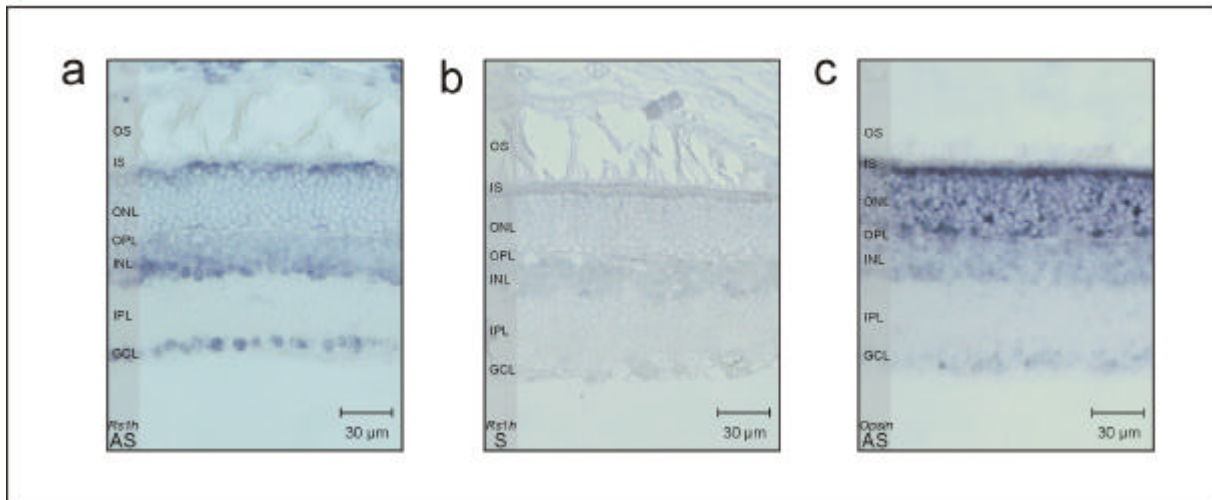
### **2.3.1 Klonierung des orthologen Mausgens *Rs1h***

Die Grundlage für alle weiteren Untersuchungen zur Funktion von RS1 war die Klonierung des orthologen Mausgens *Rs1h* (Retinoschisis 1 homolog) (GEHRIG *et al.* 1999; REID *et al.* 1999). Dazu wurde basierend auf der Sequenz des humanen *RS1*-Gens, mit Hilfe der RT-PCR Technik ein 658 bp großes Fragment aus muriner Augen-RNA isoliert und damit eine genomische Maus-DNA Phagen Bank durchsucht (GEHRIG *et al.* 1999). Das isolierte murine Ortholog *Rs1h* bestand, wie das humane *RS1*-Gen, aus sechs Exonen und besaß zu diesem eine Aminosäureidentität von 96%.

### **2.3.2 Analyse der räumlichen Expression von *Rs1h***

#### **2.3.2.1 RNA *in situ*-Hybridisierung an Paraffinschnitten**

Ein 436 bp großes Fragment aus *Rs1h*, welches die Exone 3 bis 6 der cDNA umfasst, wurde mit Hilfe der Primer rsm3F und rsm6R aus der RNA von Mausaugen amplifiziert und kloniert. Durch *in vitro*-Transkription des Klons wurden DIG-markierte *sense* und *antisense* Sonden gewonnen. Mit diesen wurden die Paraffinschnitte von Augen einer adulten, über 60 Tage alten, CD-1<sup>®</sup>-Maus hybridisiert (Abbildung 21). Die Hybridisierung mit der *Rs1h antisense*-Sonde ergab Hybridisierungssignale an der Grenze zwischen äußerer Körnerschicht (ONL) und den inneren Segmenten der Photorezeptoren (IS), sowie am inneren Rand der inneren Körnerschicht (INL) und in der Ganglienzellschicht (GCL) (Abbildung 21a). Kein signifikantes Hybridisierungssignal konnte bei der Hybridisierung der *Rs1h sense*-Probe (Negativkontrolle) gefunden werden (Abbildung 21b). Eine als Positivkontrolle verwendete Opsin *antisense*-Sonde hybridisierte zu den inneren Segmenten der Photorezeptoren und der äußeren Körnerschicht (BRANN & YOUNG 1986; Abbildung 21c).



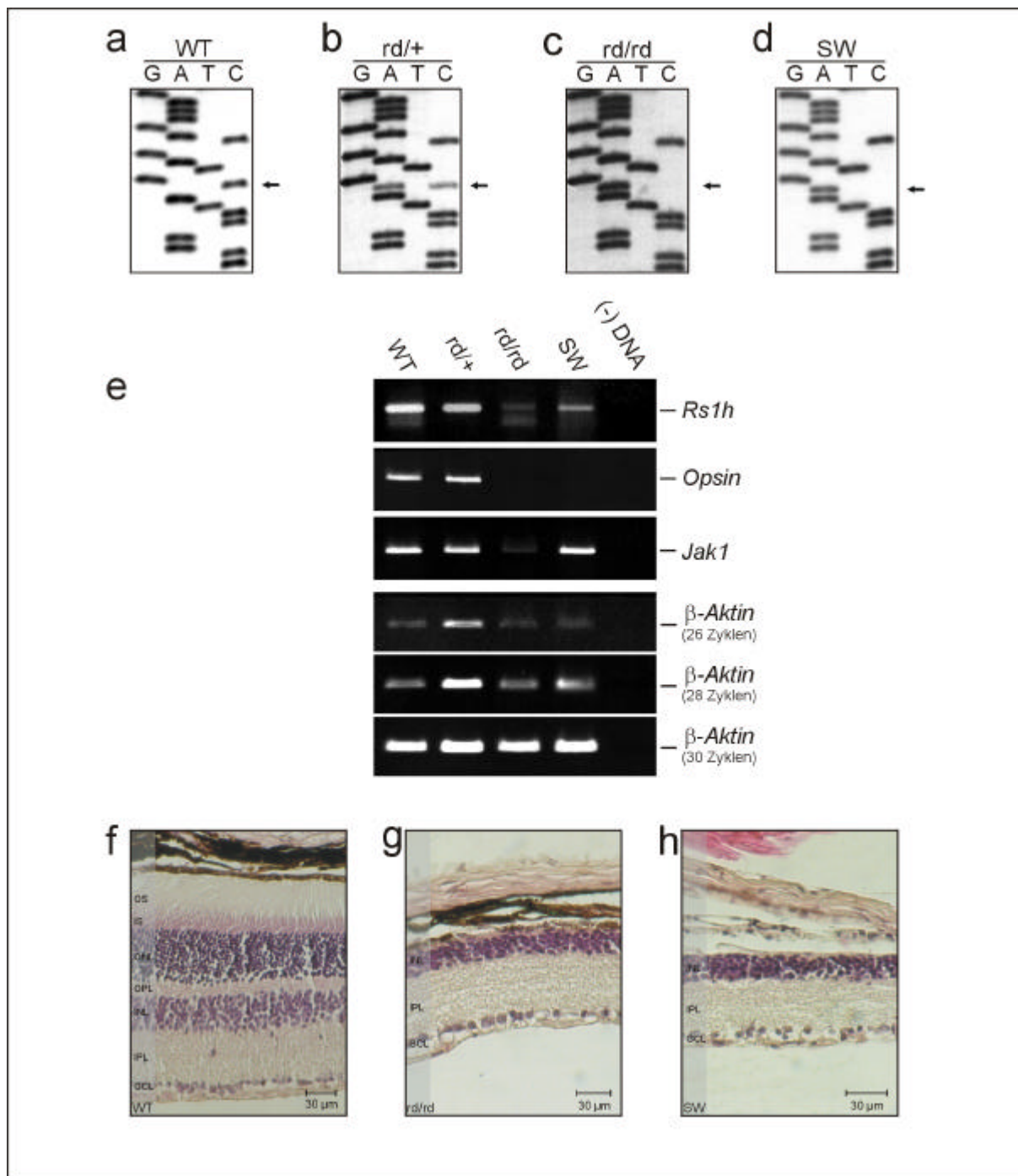
**Abb. 21: RNA *in situ*-Hybridisierung von *Rs1h*.**

**a**, RNA *in situ*-Hybridisierung einer 436bp großen, DIG-markierten RNA *antisense*-Sonde aus *Rs1h*.

**b**, Hybridisierung mit der *Rs1h* *sense*-Probe (Negativkontrolle). **c**, Hybridisierung mit einer Opsin *antisense*-Sonde (Positivkontrolle). Abkürzungen: AS, *antisense* Sonde; S, *sense* Sonde; äußere (OS) und innere (IS) Segmente der Photorezeptoren; ONL, äußere Körnerschicht; OPL, äußere plexiforme Schicht; INL, innere Körnerschicht; IPL, innere plexiforme Schicht; GCL, Ganglienzellschicht.

**2.3.2.2 RT-PCR von *Rs1h* in verschiedenen Mauslinien**

Für die RT-PCR Analyse wurde die RNA aus den Augen verschiedener Mauslinien isoliert. Als Wildtyplinie (WT) wurde NMRI verwendet (Abbildung 22a). Die anderen Linien trugen eine Sequenzveränderung in der  $\beta$ -Untereinheit der stäbchenspezifischen cGMP Phosphodiesterase (*Pdeb*, Genbank Acc. No.: X55968) (Abbildung 22b-d). Bei dieser Veränderung handelte es sich um eine *nonsense* Mutation (Y347X) im siebten von 22 Exonen des *Pdeb*-Gens (PITTLER & BAEHR 1991). Diese wurde durch die Amplifizierung und anschließende Sequenzierung eines 215 bp großen PCR-Fragmentes nachgewiesen, das mit Hilfe der Primer *Pdeb*(genom)-F und *Pdeb*(genom)-R (siehe Anhang B und J) aus genomischer DNA gewonnen wurde. Mäuse die heterozygote Träger dieser Mutation sind zeigen auf histologischer Ebene keine phänotypischen Auffälligkeiten. Liegt die Mutation jedoch homozygot vor, so kommt es zur Ausbildung des als *rd* (*retinal degeneration*) bezeichneten Erscheinungsbildes. Während die Stäbchen von *rd* Mäusen bis zum 35. postnatalen Tag vollständig verschwinden (CALEY *et al.* 1972; LA VAIL & MULLEN 1976), können die Zapfen, welche nur 3% aller Photorezeptoren der Maus ausmachen, noch länger vorhanden sein (CARTER-DAWSON *et al.* 1978). Andere retinale Zellen bleiben intakt, können jedoch leicht reduziert sein (BLANKS & BOK 1977; GRAFSTEIN *et al.* 1972). Als homozygote *rd*-Linien (*rd/rd*) wurden C3H/HeJ (Abbildung 22c) und Swiss-Webster-CFW<sup>®</sup> (SW) (Abbildung 22d) verwendet. Die heterozygote *rd*-Maus (*rd/+*) stammte aus der Kreuzung einer Wildtypmaus mit der *rd*-Mauslinie C57BL/6J-*rd* le Gus -s\*h (Abbildung 22b). Alle Tiere waren zum Zeitpunkt der Analyse mindestens 44 Tage alt.



**Abb. 22: Analyse der räumlichen Expression von *Rs1h* im Mausauge.**

**a-d**, Sequenzanalyse von Exon 7 des *Pdeb*-Gens. **a**, WT Maus. **b**, rd/+ Maus mit heterozygoter Sequenzveränderung. **c**, rd/rd Maus mit homozygoter Mutation. **d**, SW-Maus mit homozygoter Veränderung. **e**, RT-PCR eines 463 bp großen Fragmentes aus dem *Rs1h*-Gen mit Gesamt-RNA aus Augen verschiedener Mauslinien. WT, Wildtypmaus (NMRI) (**a, f**), rd/+, heterozygote rd Maus (C57BL/6J-rd le Gus -s\*h) (**b**), rd/rd, homozygote rd Maus (C3H/HeJ) (**c, g**), Swiss-Webster (SW)-Maus (CFW®) mit homozygoter rd Mutation (**d, h**). **f-g**, Schnitte durch die Netzhaut einer WT (**f**), rd/rd (**g**) und SW (**h**) Maus. Abkürzungen: äußere (OS) und innere (IS) Segmente der Photorezeptoren; ONL, äußere Körnerschicht; OPL, äußere plexiforme Schicht; INL, innere Körnerschicht; IPL, innere plexiforme Schicht; GCL, Ganglienzellschicht.



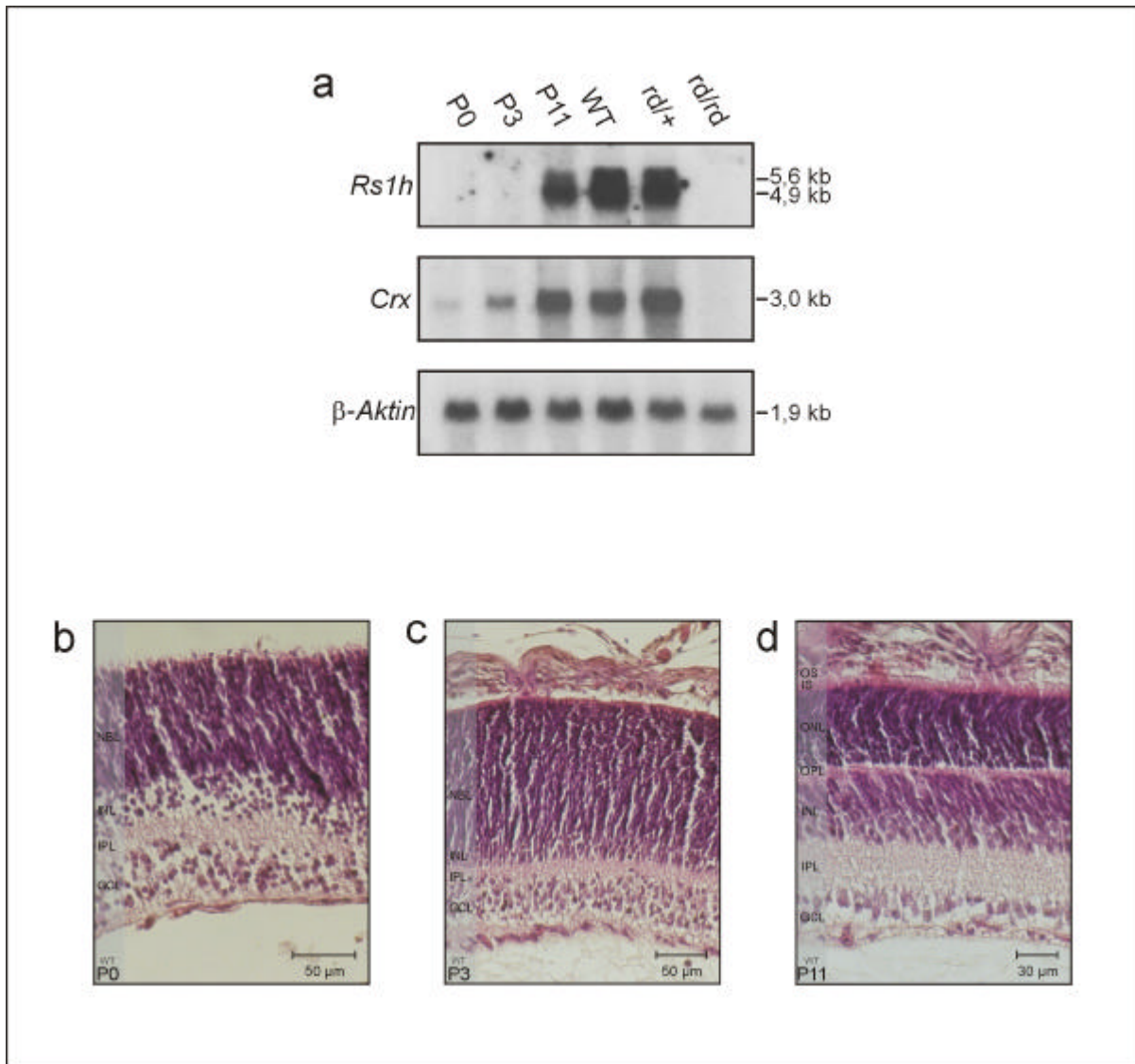
Die Amplifizierung eines 436 bp großen Fragmentes aus *Rs1h* erfolgte mit den Primern rsm3F und rsm6R (siehe Anhang B und J). Ein 992 bp großes PCR-Fragment des murinen photorezeptorspezifischen *Opsin* Gens wurde mit den Primern opsin-F und opsin-R gewonnen (AL-UBAIDI *et al.* 1990). Mit *Jak1* (Janus Kinase 1) wurde eine Protein Tyrosinkinase amplifiziert, welche in der Ganglienzellschicht und in den amakrinen Zellen exprimiert ist (YANG *et al.* 1993). Dazu wurde mit Hilfe der Oligonukleotidprimer Jak1-F und Jak1-R ein 496 bp großes PCR-Fragment gewonnen. Zur Abschätzung der eingesetzten Erststrang-cDNA Mengen wurde in einer semi-quantitativen Analyse mit Hilfe der Primer XAHR20 und XAHR17 ein 289 bp großes Fragment aus dem ubiquitär exprimierten  $\beta$ -Aktin-Gen der Maus amplifiziert (ALONSO *et al.* 1986).

Dabei zeigte sich, dass im Vergleich zu den Mauslinien WT, rd/rd und SW, die cDNA in der rd/+ Probe eine höhere Ausgangskonzentration besaß (Abbildung 22e). Dagegen ist die Menge an Ziel DNA bei der WT, der rd/rd und der SW Maus in etwa vergleichbar. Unter Berücksichtigung der  $\beta$ -Aktin Expression konnten somit folgende Expressionsmuster beobachtet werden (Abbildung 22e). *Opsin* war bei der WT und der rd/+ Maus in etwa gleich exprimiert. Bei der rd/rd und der SW Maus konnte kein Transkript nachgewiesen werden. Die Expression von *Jak1* war mit der von *Rs1h* vergleichbar. Jedoch schien sie in der SW Maus in *Jak1* in Vergleich zu *Rs1h* etwas erhöht und in etwa mit der *Jak1* Expression in der WT Maus vergleichbar. Die Expression von *Rs1h* schien in der rd/+ Maus minimal, in der rd/rd Maus, im Vergleich zur WT Maus, jedoch sehr stark reduziert zu sein. In der SW Maus war die *Rs1h* Expression höher als in der rd/rd Maus, jedoch im Vergleich zur *Jak1* Expression deutlich verringert.

### **2.3.3 Analyse der zeitlichen Expression von *Rs1h***

Für die Untersuchung der zeitlichen Expression von *Rs1h* in der Retina, wurden Northern Blot Analysen durchgeführt. Der Northern Blot enthielt Gesamt RNA der Augen von P0 (postnataler Tag 0), P3, P11 und adulten CD-1<sup>®</sup>-Mäusen (WT), sowie heterozygoten adulten (51 Tage alten) rd/+ (C57BL/6J-rd le Gus -s\*h) und homozygoten adulten (44-58 Tage alten) rd/rd (C3H/HeJ) Mäusen. Als Hybridisierungssonde diente das 436 bp große PCR-Fragment, welches mit den Oligonukleotidprimern rsm3F und rsm6R gewonnen wurde. Damit konnten bei den P11, WT und rd/+ Mäusen zwei unterschiedliche Transkripte mit einer Größe von 4,9 kb und 5,6 kb identifiziert werden (Abbildung 23a). In den Stadien P0 und P3, sowie in der homozygoten rd/rd Maus konnte auch nach mehrwöchiger Exponierung des Filters kein Signal nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Eine nachfolgende Hybridisierung mit einem 625 bp großen PCR-Fragment, welches mit Hilfe der Primer Crx-F und Crx-R gewonnen wurde (siehe Anhang B und J), identifizierte ein 3,0 kb großes Transkript des retinalen Transkriptionsfaktors *Crx* (FURUKAWA *et al.* 1997). Das spezifische Hybridisierungssignal war

bereits im Stadium P0 vorhanden und nahm bis zum Adultstadium an Intensität zu. Auch bei der rd/+ Maus war es im gleichen Maße wie bei der WT Maus vorhanden. Bei der rd/rd Maus dagegen fehlte es völlig. Zur Kontrolle einer gleichmäßigen RNA-Konzentration, sowie der Integrität der RNA wurde schließlich ein 289 bp großes PCR-Fragment, mit den Primern XAHR20 und XAHR17 aus dem murinen  $\beta$ -Aktin Gen amplifiziert (siehe Anhang B und J) und dieses für die Hybridisierung verwendet.



**Abb. 23: Analyse der zeitlichen Expression von *Rs1h***

**a**, Northern Blot Analyse von *Rs1h* in verschiedenen Stadien der postnatalen Augenentwicklung der Maus. Die Hybridisierung mit der *Rs1h*-Sonde identifizierte zwei unterschiedliche Transkripte mit einer Größe von 4,9 kb bzw. 5,6 kb. Die nachfolgende Hybridisierung mit einer murinen *Crx*-Probe, identifizierte ein Transkript von 3,0 kb Größe. Zur Überprüfung der gleichmäßigen Beladung des Gels und der Integrität der RNA, wurde der Northern Blot anschließend mit einer  $\beta$ -Aktin-Sonde hybridisiert. **b-d**, Transversale Schnitte durch die Netzhaut von CD-1<sup>®</sup>-Mäusen am postnatalen Tag 0 (P0) (**b**), 3 (P3) (**c**) und 11 (P11) (**d**). Abkürzungen: äußere (OS) und innere (IS) Segmente der Photorezeptoren; ONL, äußere Körnerschicht; OPL, äußere plexiforme Schicht; INL, innere Körnerschicht; IPL, innere plexiforme Schicht; GCL, Ganglienzellschicht; NBL, Neuroblastenschicht.

Schnitte durch die Netzhaut von CD-1<sup>®</sup>-Mäusen in den Entwicklungsstadien P0, P3 und P11 zeigten, dass die Differenzierung der einzelnen retinalen Zellschichten erst postnatal erfolgt (Abbildung 23b, c, d). Diese Entwicklung ist etwa zwischen den postnatalen Tagen P13 und P14 abgeschlossen, wenn die Maus auch zum ersten Mal die Augen öffnet (WETZEL *et al.* 1999). Am Tag P0 besteht die Retina aus der Ganglienzellschicht (GCL), der inneren plexiformen Schicht (IPL), der inneren Körnerschicht (INL), deren innere Hälfte von amakrinen Zellen gebildet wird und einer relativ dicken Neuroblastenschicht (NBL), deren äußeres Drittel bereits einige undifferenzierte Photorezeptorzellen enthält (WETZEL *et al.* 1999). Die Differenzierung der Stäbchen und Zapfen findet zwischen den postnatalen Tagen P5 und P13 statt (MORROW *et al.* 1998).

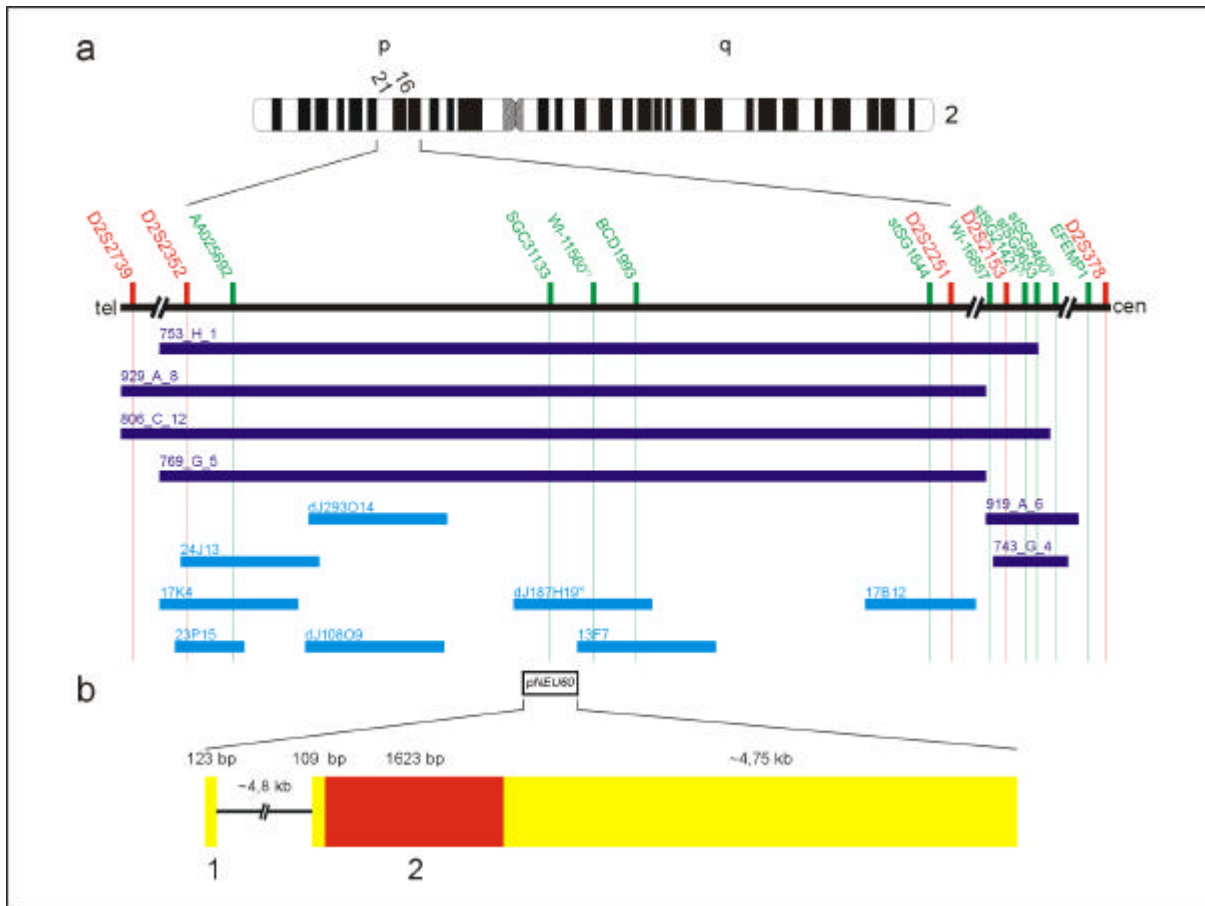
### **3. Analyse der Kandidatenregion für radiäre Drusen auf Chromosom 2p16-21**

#### **3.1 Erstellung eines YAC-, PAC-contigs**

Zur Klonierung der Kandidatengenregion für die radiären Drusen, standen mehrere YAC-contigs zur Verfügung (KERMANI *et al.* 1999; *Whitehead Institute for Biomedical Research*<sup>32</sup>). Da diese in der Reihenfolge der Marker, sowie in der Anordnung der YAC-Klone voneinander abwichen, wurde zunächst die genaue Anordnung der YAC-Klone bestimmt (Abbildung 24a). Es standen die YAC-Klone 743\_G\_4, 753\_H\_1, 769\_G\_5, 806\_C\_12, 919\_A\_6 und 929\_A\_8 zur Verfügung. Zunächst wurden unter Zuhilfenahme von EST-Sequenzen aus der GeneMap'98<sup>33</sup>, einer auf Basis der RH (*radiation hybrid*)-Kartierung erstellten Klon-Karte, STS-Marker generiert (Abbildung 24a; Anhang B und J). Diese erlaubten die Kartierung der YAC-Klone innerhalb der Kandidatenregion. Anschließend wurden mit Hilfe des ligationsvermittelten PCR-Ansatzes, die Enden der einzelnen YAC-Klone isoliert und als Hybridisierungssonden verwendet. Dadurch konnte die Anordnung der YAC-Klone untereinander bestimmt werden. Mit den flankierenden polymorphen DNA-Markern D2S2352 und D2S2251, konnten die PAC Klone 17B12, 17K4, 23P15 und 24J13 aus der LLNLP humanen Chromosom 2 spezifischen PAC-Bank isoliert werden. Mit Hilfe der durch DOP-PCR isolierten Endfragmente dieser Klone wurden die PAC-Klone dJ108O9 und dJ293O14 aus der RPCI-humanen PAC-Bank identifiziert. Aus dieser PAC-Bank wurden auch die Klone dJ135O20, dJ187H19, dJ190G15, dJ219G3, dJ302H14 und dJ315C2 isoliert, wobei als Hybridisierungssonde ein STS-Marker aus der EST-Sequenz SGC31133diente. Der Klon 13F7 wurde mit dem Marker BCD1993 aus der LLNLP humanen Chromosom 2 spezifischen PAC-Bank isoliert.

<sup>32</sup> <http://www-genome.wi.mit.edu>

<sup>33</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap98/>



**Abb. 24: Physikalische Kartierung und genomischer Aufbau von *pNEU60*.**

**a**, Die Kandidatengenregion für die radiären Drüsen wurde zwischen die Marker D2S2352 und D2S2251 kartiert (KERMANI *et al.* 1999). Polymorphe DNA-Marker werden von roten, STS-Marker aus EST-Sequenzen von grünen senkrechten Strichen repräsentiert. Überlappende YAC-Klone sind als dunkelblaue, PAC-Klone als hellblaue horizontale Balken angegeben. <sup>1)</sup> auch stSG4331, A002T41, N50531, stSG8564. <sup>2)</sup> auch SGC35870, N34878, Cda10d06. <sup>3)</sup> auch N26021, A006B27, stSG8460, stSG4145, stSG447, stSG31419. <sup>4)</sup> identisch zu dJ135O20, dJ190G15, dJ219G3, dJ302H14, dJ315C2.

**b**, Genomischer Aufbau von *pNEU60*. Der codierende Bereich ist als rotes Viereck, nicht-translatierte Regionen als gelbe Flächen dargestellt. Die intronische Sequenz ist durch eine schwarze horizontale Linie repräsentiert. Die Anordnung und Größe der Exon-Intron-Struktur ist maßstabsgetreu angegeben.

### 3.2 Untersuchung des Kandidatengens *pNEU60*

#### 3.2.1 Isolierung und Klonierung der vollständigen cDNA-Sequenz

Die Analyse der EST-Sequenzen innerhalb der Kandidatengenregion führte zur Identifizierung einer Sequenz (SGC31133), welche durch die drei überlappenden, retinaspezifischen EST-Klone ys91a03, ze65c05 und ze59a07 repräsentiert wurde. Ausgehend von den bereits vorliegenden, jeweils ca. 300 bp großen, 5'- und 3'-Sequenzen des größten dieser Klone (ys91a03), wurde die vollständige Sequenz der 2057 bp großen cDNA bestimmt. Um das vollständige 5'-Ende der cDNA zu erhalten, wurde die 5'-RACE Technik angewendet. Dazu wurde aus humaner Retina Gesamt-RNA, Erststrang-cDNA mit Hilfe des Oligonukleotidprimers DHRD-91.s8 gewonnen. Für eine erste PCR wurde der Primer

DHRD-91.s4, für die zweite verschachtelte PCR der Primer DHRD-91.s5 verwendet. Somit konnte die vorhandene Sequenz um weitere 19 bp erweitert werden. Insgesamt konnten somit eine 2076 bp lange cDNA Sequenz isoliert werden. Diese enthielt ein ORF von 1665 bp mit dem ersten ATG-Startcodon 42 Nukleotide strangabwärts (Abbildung 25).

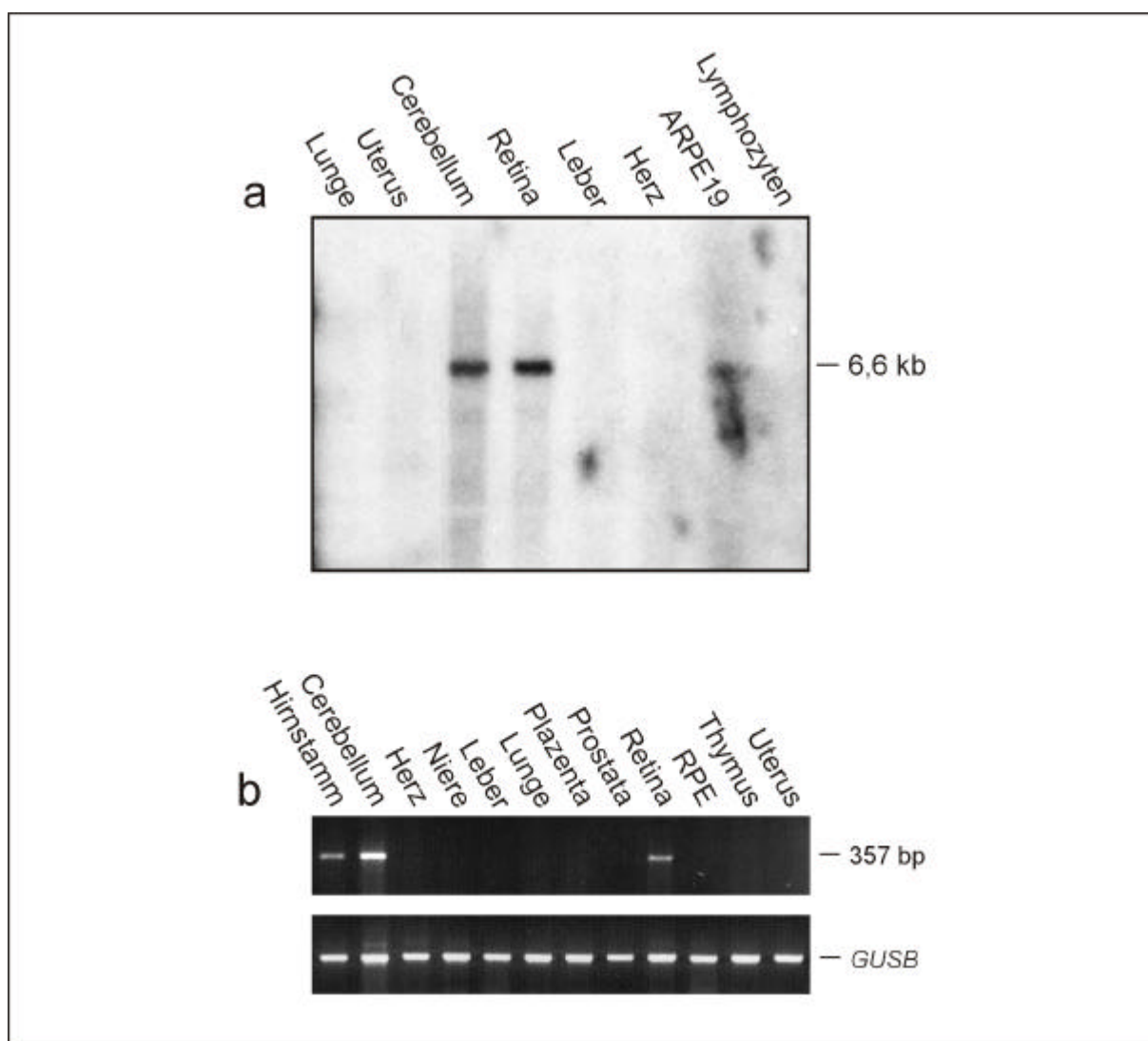
-232	GGGATGCGCGGAGGCGGTGGCGATGGCGATGCCTCTAGTCTGCATCATCCAGAGCGGAGCGGAGCTGGGGTCCGGACTGCGAGATGGAG	
	Ex2	
-137	GAGGGGCGCGCTGCGGCCACCCGGCAGGCTTATCTGTCTTGGGCCTCTTTTGTACATATTGCTCATCTGTGAGCTGAGGCCCTGACTCACTGA	
-42	GTATTTTGGGGAGCAGAAGAAGGAGACATTTCTCTCCGAAAATGAAGTCAACAGGCCACCTTCAGGATGCCCAATGCCACCTCGTCCATGT	
	M N S T G H L Q D A P N A T S L H V	18
54	GCCTCACTACAGGAAGAAACAGCACCTCTCTCCAGGAGGGTCTTCAGGATCTATCCACACAGCCACCTTGGTGACCTGTACTTTTCTACTGG	
	P H S Q E G N S T S L Q E G L Q D L I H T A T L V T C T F L L	49
149	CGGTCACTTCTGCTGGGTTCTATGGCAACTTCATTGTCTTCTTGTCTTCTTCGATCCAGCCTTCAGGAAATTCAGAACCAACTTTGATTTTC	
	A V I F C L G S Y G N F I V F L S F F D P A F R K F R T N F D F	81
244	ATGATCCTGAACCTGCTCTCTGTGACCTCTTCATTGTGGAGTGACAGCCCATGTTACCTTTGTGTTATTCTTCAGCTCAGCCAGTAGTAT	
	M I L N L S F C D L F I C G V T A P M F T F V L F F S S A S S I	113
339	CCCGGATGCTTTCTGCTTCACTTTCCATCTCACCAGTTCAGGCTTCATCATCATGTCTCTGAAGACAGTGGCAGTGATCGCCCTGCACCGGCTCC	
	P D A F C F T F H L T S S G F I I M S L K T V A V I A L H R L	144
434	GGATGGTGTGGGAAACAGCCTAATCGCACGGCTCCTTTCCCTGCACCGTACTCTCACCCCTGCTTCTCTGGGCCACCAAGTTTACCCCTTGCC	
	R M V L G K Q P N R T A S F P C T V L L T L L L W A T S F T L A	176
529	ACCTTGGTACCTTGAACCAGCAAGTCCACCTCTGTCTTCCCATGTCAGTCTGATTGCTGAAAAGGAAAGCCATTTTGTCTCTCTATGT	
	T L A T L K T S K S H L C L P M S S L I A G K G K A I L S L Y V	208
624	GGTGCAGTTCACCTTCTGTGTGCTGTGCTCTTACATCATGATTGCTCAGACCTGCGGAAGAAGCTCAAGTCAGAAAGTGCCCC	
	V D F T F C V A V V S V S Y I M I A Q T L R K N A Q V R K C P	239
719	CTGTAATCACAGTCGATGCTTCCAGACCAGCCCTTTCATGGGGTCCCTGTGACGGGAGGTGGAGATCCCATCCAGTGTGCCATGCCGCTCTG	
	P V I T V D A S R P Q P F M G V P V Q G G G D P I Q C A M P A L	271
814	TATAGGAACCAGAATTACAACAACTGCAGCAGCTTCAGACCCGTGGATATACCAAGAGTCCCAACCAACTGGTCACCCCTGCAGCAAGCCGACT	
	Y R N Q N Y N K L Q H V Q T R G Y T K S P N Q L V T P A A S R L	303
909	CCAGCTCGTATCAGCCATCAACCTCTCCACTGCCAAGGATTCAAAGCCGTGGTCACTGTGTGATCATTGTGCTGTGCTCAGTCTGGTGTGCTGTC	
	Q L V S A I N L S T A K D S K A V V T C V I I V L S V L V C C	334
1004	TTCCACTGGGGATTTCTTGGTACAGGTGGTCTCTCCAGCAATGGGAGCTTCAATCTTTACCAGITTTGAATTTGTTGGATTTACTCTTATATTT	
	L P L G I S L V Q V V L S S N G S F I L Y Q F E L F G F T L I F	366
1099	TTCAAGTCAGGATTAACCCCTTTTATATATTTCTCGAACAGTGCAGGGCTGAGAAGGAAAGTCTCTGGTGCCTCCAATACATAGGCCCTGGGTTT	
	F K S G L N P F I Y S R N S A G L R R K V L W C L Q Y I G L G F	398
1194	TTTCTGTCTCAAAACAAAGACTCGACTTCGAGCCATGGGAAAAGGAACTCGAAGTCAACAGAAAACAAATCTCCCATCATGAAACAAACTCTG	
	F C C K Q K T R L R A M G K G N L E V N R N K S S H H E T N S	429
1289	CCTACATGTTATCTCAAAGCCACAGAAGAAATTTGTGGACCAGGCTTGTGGCCCAAGTCATTCAAAGAAAGATGGTGAGTCCCAAGATCTCT	
	A Y M L S P K P Q K K F V D Q A C G P S H S K E S M V S P K I S	461
1384	GCTGGACATCAACTGTGGTCAGAGCAGCTCGACCCCATCAACTCGGATTGAACCTTACTACAGCATATATAACAGCAGCCCTTCCAGGA	
	A G H Q H C G Q S S S T P I N T R I E P Y Y S I Y N S S P S Q E	493
1479	GGAGAGCAGCCATGTAACCTACAGCCAGTAAACTCTTTTGGATTGGCAATTCATATATTGCCATGCATTATCACACCACTAATGACTTAGTGC	
	E S S P C N L Q P V N S F G F A N S Y I A M H Y H T T N D L V	524
1574	AGGAATATGACAGCACTTCAGCCAAAGCAGATTCAGTCCCTCCGTTTAAAGTCATGGAGGCTATAGGATCTTATGTAACAGTPTTTTGTCTG	
	Q E Y D S T S A K Q I P V P S V *	540
1669	ATAGTAATGGACTTTATTCTAACTTGAGATCAGTGGCGGATCAAACCTACAAGATTCAACTGAAAAGTTGGCAGTTATGGTTTCTTTCATCTG	
1764	ATGTGTCAGTATCTGTGATTGCTTTGTAGTTTGTGACATCTTAAGATTTGATGTGAAAAGTTTGTAGATTTTTTACCCTGA	

**Abb. 25: cDNA-Sequenz von *pNEU60***

Die vorhergesagte Proteinsequenz ist unterhalb der *pNEU60* cDNA Sequenz angegeben. Die Zahlen auf der linken Seite bezeichnen Nukleotid-, die Zahlen auf der rechten Seite Aminosäurepositionen. Die Lage der Exon-Intron-Grenze ist durch einen senkrechten Strich gekennzeichnet.

### 3.2.2 Expressionsanalyse

Zur Bestimmung des Expressionsprofils von *pNEU60* wurden Northern Blot und RT-PCR Analysen durchgeführt (Abbildung 26). Der verwendete RNA-Filter enthielt jeweils 12 µg Gesamt-RNA verschiedener humaner Gewebe wie Lunge, Uterus, Cerebellum, Retina, Leber, Herz und peripheren Blutlymphozyten, sowie aus der humanen RPE-Zelllinie ARPE19. Als Hybridisierungsprobe wurde ein 615 bp großes PCR-Fragment verwendet, dass mit den Primern DHRD-91.r4 und DHRD-91.s1 aus dem EST-Klon ys91a03 amplifiziert wurde (siehe Anhang B und J). Ein Hybridisierungssignal konnte mit dieser Sonde nur in der Gesamt-RNA von Cerebellum und Retina nachgewiesen werden. Die Größe des detektierten Transkriptes betrug jeweils 6,6 kb (Abbildung 26a).



**Abb. 26: Expressionsanalyse von *pNEU60*.**

**a**, Northern Blot Analyse mit einem 615 bp PCR-Fragment aus *pNEU60*. In Cerebellum und Retina wurde ein jeweils 6,6 kb großes Transkript detektiert. In allen anderen Geweben wurden keine positiven Hybridisierungssignale gefunden. **b**, Die RT-PCR Analyse zeigt eine Expression von *pNEU60* im Hirnstamm, Cerebellum und Retina. Die Amplifikation des *GUSB*-Gens dient zur Kontrolle der Konzentration und Integrität der eingesetzten Erststrang-cDNA.

Mit Hilfe der Primer DHRD-3UTR-F und DHRD-3UTR-R wurde aus dem PAC-Klon dJ302H14 ein 270 bp großes PCR-Fragment amplifiziert und als Hybridisierungssonde verwendet. Dieses etwa 2,3 kb strangabwärts vom Stoppcodon liegende Fragment detektierte ebenfalls ein 6,6 kb Transkript in Retina und Cerebellum (Daten nicht gezeigt). Für die RT-PCR Analyse wurde Erststrang-cDNA aus den humanen Geweben Hirnstamm, Cerebellum, Herz, Niere, Leber, Lunge, Plazenta, Prostata, Retina, RPE, Thymus und Uterus eingesetzt. Die Amplifizierung eines 357 bp großen Fragmentes erfolgte mit Hilfe der Primer DHRD-91.r13 und DHRD-91.s4 (siehe Anhang B und J). Eine Expression von *pNEU60* konnte damit im Hirnstamm, Cerebellum und Retina nachgewiesen werden (Abbildung 26b). Die gleichmäßige Konzentration, sowie die Integrität der eingesetzten Erststrang-cDNA wurde durch die PCR-Amplifizierung eines 454 bp großen Fragmentes aus dem  $\beta$ -Glucuronidase Gen (*GUSB*) nachgewiesen (siehe Anhang B und J).

### 3.2.3 Genomische Organisation

Zur Gewinnung genomischer Klone von *pNEU60* wurde der PAC-Klon dJ187H14 mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* gespalten, auf einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran gebロットet. Die Hybridisierung mit dem vollständigen Insert des EST-Klons ys91a03 identifizierte zwei Fragmente mit einer Größe von 1,3 kb und 4,5 kb. Der 1,3 kb Klon wurde vollständig sequenziert und enthielt die ersten 123 bp der *pNEU60* cDNA (Nukleotide -232 bis -110) als ununterbrochene Sequenz. Bei der Sequenzierung des 4,5 kb großen *EcoRI* Fragmentes wurde die restliche cDNA Sequenz (Nukleotide -109 bis +1845) als zusammenhängende Sequenz gefunden. Die Berechnung des *splice site discrimination scores* der flankierenden genomischen Sequenzen lag mit einem Wert von 1,1 für die potentielle 5'-Donor Spleißstelle und 7,1 für die potentielle 3'-Akzeptor Spleißstelle im üblichen Bereich. Damit konnte gezeigt werden, dass *pNEU60* aus zwei Exonen besteht, wobei das erste Exon nicht translatiert wird (Tabelle 11, Abbildung 24b). Die Introngröße wurde mit dem Expand Long Template PCR System (Roche), unter Zuhilfenahme der Primer 91.int-F und 91.int-R, bestimmt (siehe Anhang B und J).

**Tab. 11: Genomische Struktur von *pNEU60*.**

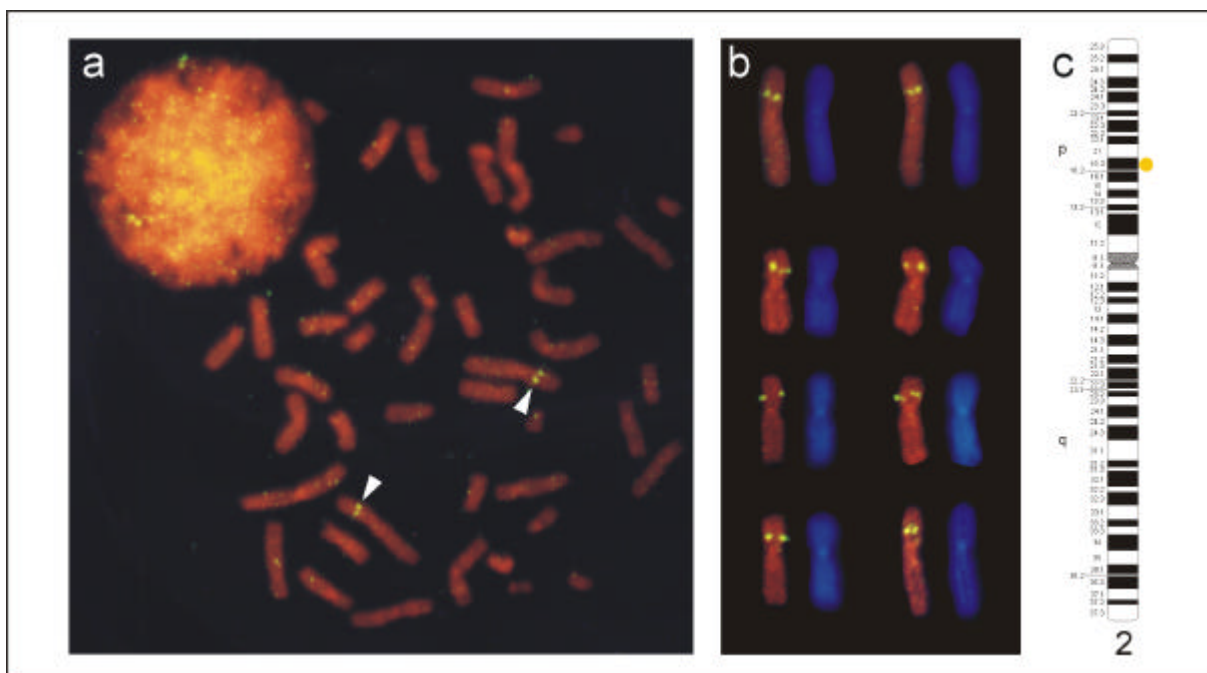
Exon	Größe (bp)	3'-Akzeptor Spleißstelle*	5'-Donor Spleißstelle*	Genbank Acc. No.	Introngröße (kb)
1	123		...CCGGCAG gtagag...	AF303576	~4,8
2	1732	...tgtgtag GCTTATC...		AF101472	

\* Exonische Sequenzen sind als Großbuchstaben, intronische Sequenzen als Kleinbuchstaben dargestellt.



### 3.2.4 FISH-Kartierung von *pNEU60*

Die Lokalisierung von *pNEU60* innerhalb der Kandidatengenregion basierte auf der RH-Kartierung der EST-Sequenz SGC31133. Um diese Kartierung mit einer unabhängigen Methode zu überprüfen wurde die Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH) verwendet. Dazu wurde der PAC-Klon dJ187H14 durch *nick translation* mit Biotin-16-UTP markiert und auf Präparationen humaner Metaphasechromosomen hybridisiert. Dabei konnten spezifische Signale auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 gefunden werden (Abbildung 27a). Die Hybridisierungssignale wurden mit Hilfe von FITC-konjugiertem Avidin und einem biotynilierten Anti-Avidin Antikörper unter einem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen. Für die Gegenfärbung der Chromosomen wurde Propidiumjodid (PI) und DAPI verwendet (KÖHLER & VOGT 1994). Die Hybridisierungssignale bei den aus verschiedenen Metaphasen entnommenen Chromosomen 2, waren deutlich an der jeweils gleichen Region im kurzen Arm erkennbar (Abbildung 27b). Die Position der Hybridisierungssignale wurde durch den Vergleich mehrerer Metaphasen mit den schematischen G-gebänderten Ideogrammen menschlicher Chromosomen bestimmt (FRANCKE 1994). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Signale jeweils aus der chromosomalen Region 2p16.2-q16.3 stammten (Abbildung 27c). Die FISH-Hybridisierungen wurden von M. Köhler durchgeführt.



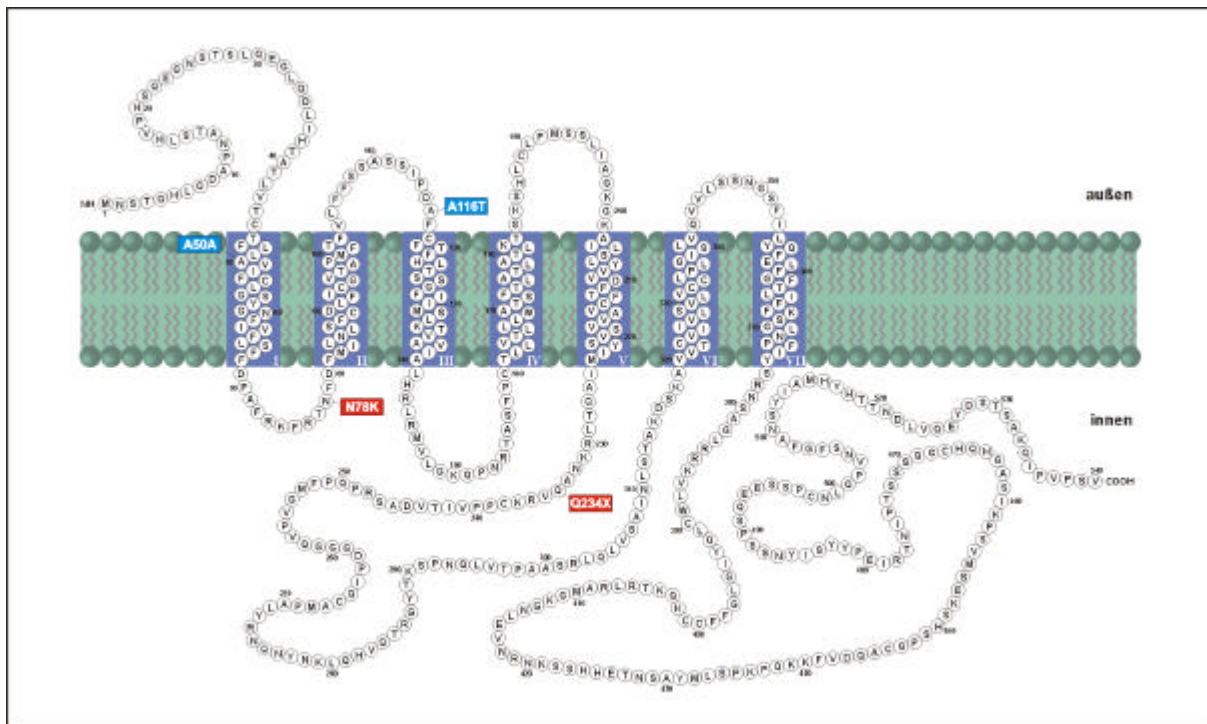
**Abb. 27: FISH Kartierung von *pNEU60***

**a.** Metaphasenpräparation humaner Chromosomen. Die als gelbe Punkte sichtbaren signifikanten Hybridisierungssignale sind durch weiße Pfeilspitzen markiert. **b.** Ausgewählte Chromosomenpräparationen von Chromosom 2 zeigen die jeweils gleiche relative Position der Hybridisierungssignale. **c.** Bestimmung der chromosomalen Lage der Hybridisierungssignale (gelber Punkt) anhand eines schematischen Ideogramms von Chromosom 2 nach FRANCKE 1994.



### 3.2.5 Analyse der vorhergesagten Proteinsequenz

Die gefundene Nukleotidsequenz `tccgaaaATGA` welche das erste ATG Startcodon umgab, stand nur in einem schwachen Kontext zur Kozak Konsensussequenz (KOZAK 1987). Ein *in-frame* Stoppcodon wurde 45 bp strangaufwärts vom ATG Startcodon gefunden. Das aus dem ORF der *pNEU60* cDNA vorhergesagte Protein bestand aus 540 Aminosäureresten, wobei kein N-terminales Signalpeptid vorhergesagt wurde. Das kalkulierte Molekulargewicht betrug 59,4 kDa und der theoretische isoelektrische Punkt lag bei pH 9,3. Bei der Untersuchung der Proteinsequenz wurden sieben N-gebundene Glykosilierungsstellen für die Positionen Asn2-Ser3-Thr4-Gly5, Asn12-Ala13-Thr14-Ser15, Asn25-Ser26-Thr27-Ser28, Asn153-Arg154-Thr155-Ala156, Asn310-Leu311-Ser312-Thr313, Asn349-Gly350-Ser351-Phe352 und Asn420-Lys421-Ser422-Ser423 gefunden. Darüber hinaus wurden zwei N-gebundene Myristylierungsstellen für die Positionen Gly24-Asn25-Ser26-Thr27-Ser28-Leu29 und Gly468-Gln469-Ser470-Ser471-Ser472-Thr473 vorhergesagt.



**Abb. 28: Vorhergesagte Sekundärstruktur des Genproduktes von *pNEU60*.**

Die schematische Darstellung des *pNEU60* Proteins zeigt die vorhergesagten sieben Transmembrandomänen, sowie deren Orientierung zur Membran. Ebenfalls dargestellt ist die Lokalisierung der, bei einer Analyse von AMD-Patienten (siehe Abschnitt 3.2.7) gefundenen, zwei potentiellen krankheitsassoziierten Varianten (rot unterlegt) und der zwei potentiellen Polymorphismen (blau unterlegt). Jeder Kreis repräsentiert einen Aminosäurerest.

Mittels umfangreicher BLAST-Analysen, konnten keine hoch signifikanten Sequenzübereinstimmungen zu bereits bekannten Proteinen identifiziert werden. Relativ schwache Übereinstimmung (E value=0,002 bzw. 0,013) wurden zu verschiedenen G-Protein gekoppelten Rezeptoren, wie dem Neuropeptid Y-Rezeptor aus *C. elegans* (Swiss-Prot Acc. No.: Q18179) oder den Wachstumshormon Secretagogue Rezeptor Typ 1b aus

*S. scrofa* (Q95254) gefunden. Bei der Untersuchung der Sekundärstruktur von pNEU60 wurden sieben Transmembrandomänen vorhergesagt, wobei das relativ kurze Nterminale Ende auf der Außenseite und der sehr lange C-Terminus auf der Innenseite der Membran lag (Abbildung 28). Zwischen den Transmembrandomänen V und VI wurde eine relativ lange Schleife aus 95 Aminosäureresten vorhergesagt, während die anderen Schleifen aus nur jeweils 11-20 Aminosäureresten bestanden.

### 3.2.6 Mutationsanalyse in Patienten mit radiären Drüsen

Die genomische DNA von betroffenen Individuen aus zwei MLVT-Familien und einer DHRD-Familie, sowie 14 Einzelpersonen mit diagnostizierten radiären Drüsen stand für eine Mutationsanalyse zur Verfügung. Dazu wurden der vollständige ORF von *pNEU60*, sowie 109 bp der 5'-UTR, 40 bp der IVS und 135 bp der 3'-UTR in sieben überlappenden PCR-Fragmenten (siehe Anhang B und J) amplifiziert und mit Hilfe von SSCP-Analysen auf Sequenzveränderungen untersucht. Dabei konnten keine Sequenzvarianten gefunden werden.

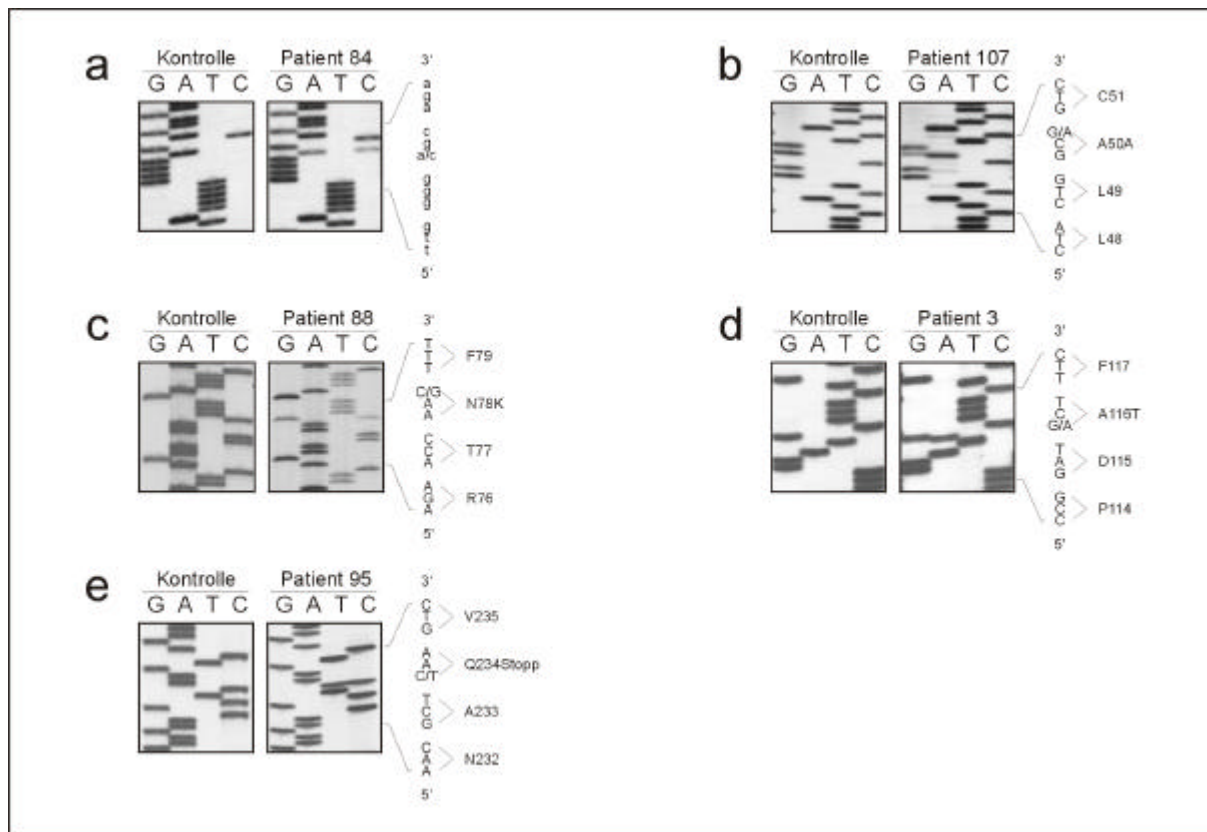
### 3.2.7 Mutationsanalyse in AMD-Patienten

Für die Mutationsanalyse stand genomische DNA von 198 AMD Patienten, sowie 101 nicht betroffene Kontrollpersonen zur Verfügung. Diese wurden mit Hilfe von SSCP-Analysen in den sieben überlappenden Amplicons von *pNEU60* untersucht. Dabei konnten fünf verschiedene Sequenzvarianten identifiziert werden (Tabelle 12, Abbildungen 28, 29).

**Tab. 12: Gefundene Sequenzvarianten in *pNEU60* bei 198 AMD-Patienten und 101 Kontrollen.**

Amplicon	Veränderung Nukleotid	Aminosäure	Allelfrequenz bei Patienten (n=396)	Allelfrequenz bei Kontrollen (n=202)
1	-30A>C	-	27 (6,8%)	14 (6,9%)
1	150G>A	A50A	1 (0,3%)	0
2	234C>G	N78K	1 (0,3%)	0
2	346G>A	A116T	5 (1,3%)	2 (1,0%)
3	700C>T	Q234X	1 (0,3%)	0

Zwei der Veränderungen konnten sowohl in der Gruppe der AMD-Patienten als auch in jener der Kontrollen nachgewiesen werden. Die Transversion eines Adeninrestes in einen Cytosinrest an der Nukleotidposition -30 im 5'-UTR (-30A>C) konnte mit einer Frequenz von 6,8% (27 von 396 Allelen) in AMD-Patienten und 6,9% (14 von 202 Allelen) in der Kontrollgruppe gefunden werden. Bei 1,3% (5 von 396 Allelen) der AMD-Patienten und 1,0% (2 von 202 Allelen) der Kontroll-Individuen wurde an der Nukleotidposition +346 die Substitution eines Guaninrestes gegen einen Adeninrest (346G>A) identifiziert, welche zu einem nicht-konservativen Aminosäureaustausch (A116T) führte.

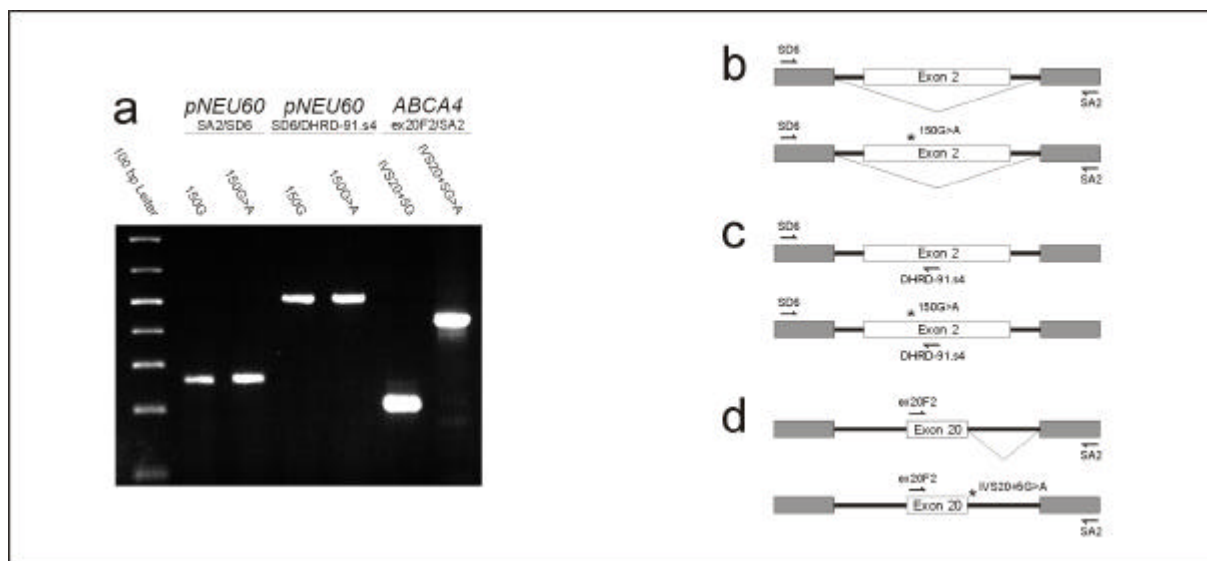


**Abb. 29: Mutationsanalyse von pNEU60 in AMD-Patienten.**

**a.** Transversion von A nach C an der Nukleotidposition -30 in der 5'-UTR. **b.** Identifizierung des G nach A Austausches in Codon 50. **c.** Transition eines Cytosinrestes gegen einen Guaninrest im Codon 78. **d.** Der Austausch eines G nach A im Codon 116 verändert Arginin in ein Tryptophan. **e.** *nonsense*-Mutation im Codon 234 in einem AMD-Patienten.

Drei der gefundenen Sequenzvarianten wurden jeweils in einem einzigen AMD-Patienten, aber nicht in Personen der Kontrollgruppe nachgewiesen. Dazu zählten die Substitution eines Guaninrestes durch einen Adeninrest an der Nukleotidposition +150 (150G>A) im Patienten 107. Diese Veränderung hatte keinen Effekt auf die Aminosäuresequenz (A50A), führte aber zur Einführung des Dinukleotides AG strangabwärts eines pyrimidinreichen Sequenzabschnittes, dem charakteristischen Merkmal einer 3'-Akzeptor-Spleißstelle. Zumal der *splice site discrimination score* mit 6,7 im Bereich realer Spleißstellen lag (PENOTTI 1987). Ob diese Veränderung tatsächlich eine kryptische Spleißstelle erzeugte, wurde in einem *Exon-trapping* System untersucht. Dazu wurde mit Hilfe der Primer R1-EcoRI-F und S8-BamHI-R (siehe Anhang B, J) ein 333 bp großes PCR-Fragment, welches die 150G>A Veränderung enthielt aus der genomischen DNA von Patient 107 amplifiziert und in den Expressionsvektor pSPL3b (Life Technologies) kloniert. Konstrukte mit dem Wildtyp- (150G) und dem veränderten 150A-Allel wurden in die eukaryotische COS-7 Zelllinie eingebracht. Anschließend wurde aus der isolierten Gesamt-RNA mit Hilfe der vektorspezifischen Primer SD6 und SA2, sowie SD6 und dem genspezifischen Primer DHRD.91.s4 zwei RT-PCR Reaktionen durchgeführt (Abbildung 30). Die beiden vektorspezifischen Primer amplifizierten jeweils das gleiche 261 bp große Fragment aus dem Wildtyp- und dem veränderten Allel (Abbildung 30a, b). Die

Sequenzierung bestätigte, dass beide Fragmente nur Vektorsequenz beinhalteten, bei denen die eingefügte Fremd-DNA durch die im Vektor vorhandenen Spleißstellen vollständig herausgespleißt wurde. Die zweite RT-PCR mit den Primern SD6 und DHRD-91.s4 amplifizierte ein 505 bp großes Fragment, sowohl aus dem Wildtyp- als auch aus dem veränderten Allel (Abbildung 30a, c). Das durch eine hypothetische kryptische Spleißstelle erwartete 138 bp große Fragment konnte nicht beobachtet werden. Als Positivkontrolle diente eine bereits bekannte Spleißvariante (IVS20-5G>A) aus dem *ABCA4*-Gen (RIVERA *et al.* 2000, Abbildung 30a, d). Die Transfektion der COS7-Zellen, sowie die anschließenden Analysen wurden von A. Rivera durchgeführt.



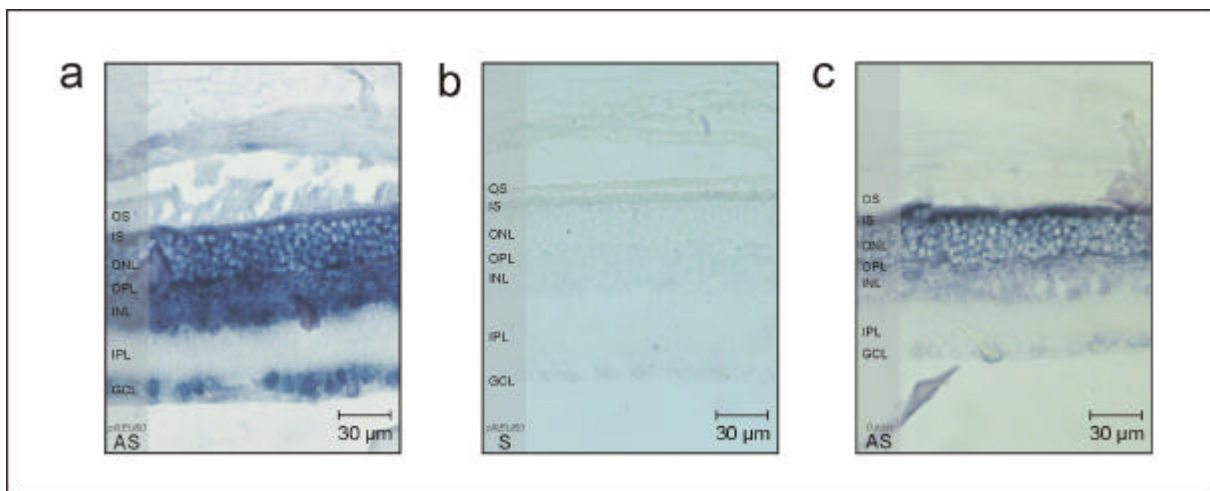
**Abb. 30: Untersuchung der Auswirkungen der 150G>A Veränderung.**

**a**, Die Ergebnisse der RT-PCR Analyse zeigen identische Spleißprodukte bei der Wildtyp- (150G) und veränderten Sequenz (150G>A). Bei der Positivkontrolle (IVS20+5G>A im *ABCA4*-Gen) führte die Sequenzveränderung zum differentiellen Spleißen zwischen der Wildtyp- und veränderter Sequenz. Der abgebildete Ausschnitt der 100 bp Leiter umfasst den Bereich von 100 bp bis 700 bp. **b-d**, Schematische Darstellung der beobachteten Spleißvorgänge. Die Position der verwendeten Oligonukleotid Primer ist durch Pfeile, die Lage der Sequenzvarianten durch einen Stern gekennzeichnet.

Bei Patient 88 wurde ein nicht-konservativer Aminosäureaustausch (N78K) durch eine Cytosin nach Guanin Substitution an der Nukleotidposition +234 (234C>G) hervorgerufen. Im AMD-Patienten 95 konnte schließlich eine *nonsense*-Mutation identifiziert werden. Die Transition eines Cytosin in ein Thymidin an der Nukleotidposition +700 (700C>T) erzeugte ein vorzeitiges Terminationssignal im Codon 234 (Q234X) und führte damit zu einem stark verkürzten Genprodukt.

### 3.2.8 Analyse der räumlichen Expression von *pNEU60*

Für die Untersuchung der räumlichen Expression von *pNEU60* in der Retina wurden RNA *in situ*-Hybridisierungen an Paraffinschnitten von Mausaugen durchgeführt. Als Hybridisierungssonde diente hierzu das vollständige Insert des EST-Klons ys91a03. Zur Herstellung DIG-markierter Sonden durch *in vitro*-Transkription, wurde der Vektor pT7T3D mit den Restriktionsenzymen *Xho* I für die Transkription des *antisense* Stranges und *Hind* III für die Transkription des *sense* Stranges linearisiert. Mit den so gewonnenen Proben wurden Paraffinschnitte von Augen einer CD-1®-Maus hybridisiert (Abbildung 31).



**Abb. 31: RNA *in situ*-Hybridisierung von *pNEU60***

**a**, RNA *in situ*-Hybridisierung einer 2057 bp großen, DIG-markierten RNA *antisense*-Probe aus *pNEU60*. **b**, Hybridisierung mit der *pNEU60 sense*-Sonde (Negativkontrolle). **c**, Hybridisierung mit einer Opsin *antisense*-Probe (Positivkontrolle). Abkürzungen: AS, *antisense*-Probe; S, *sense*-Probe; äußere (OS) und innere (IS) Segmente der Photorezeptoren; ONL, äußere Körnerschicht; OPL, äußere plexiforme Schicht; INL, innere Körnerschicht; IPL, innere plexiforme Schicht; GCL, Ganglienzellschicht.

Die *pNEU60 antisense*-Probe erzeugte Hybridisierungssignale in der äußeren (ONL) und inneren (INL) Körnerschicht und in der Ganglienzellschicht (GCL) (Abbildung 31a). Die Hybridisierung mit der *pNEU60 sense*-Sonde (Negativkontrolle) ergab kein signifikantes Hybridisierungssignal. (Abbildung 31b). Die als Positivkontrolle verwendete Opsin *antisense*-Probe hybridisierte zu den inneren Segmenten der Photorezeptoren und zu der äußeren Körnerschicht (Abbildung 31c).

### 3.3 Untersuchung von *EFEMP1*

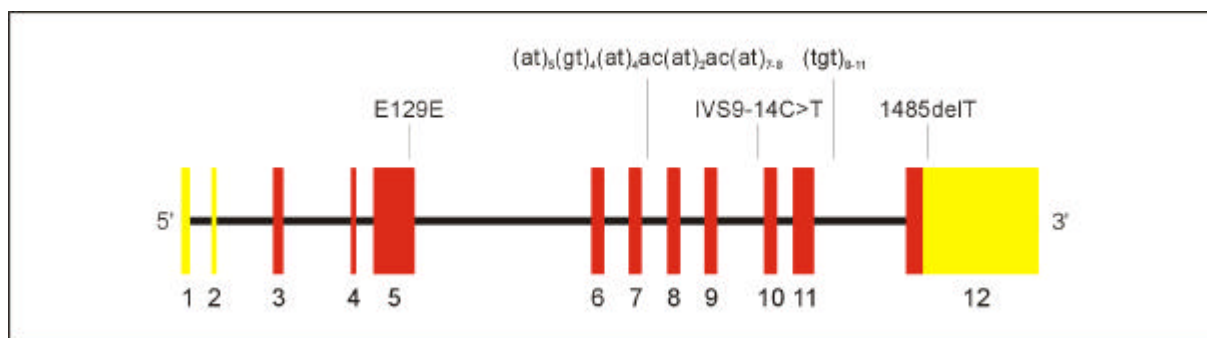
Während der Untersuchungen an *pNEU60*, konnte von einer amerikanischen Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass eine *missense*-Mutation (R345W) im EGF (*epidermal growth factor*)-enthaltenden Fibulin-ähnlichen extrazellulären Matrixprotein 1 (EFEMP1), mit der Doyneschen Honigwablen Dystrophie und der Malattia Leventinese assoziiert ist (STONE *et al.* 1999). Das Gen von EFEMP1 kartierte, proximal zu der von KERMANI *et al.* 1999



angegebenen Kandidatenregion, zwischen den polymorphen DNA-Markern D2S2153 und D2S378 (Abbildung 24a).

### 3.3.1 Genomische Struktur von *EFEMP1*

Das *EFEMP1*-Gen besteht aus 12 Exonen, wobei die ersten beiden Exone nicht translatiert werden (Abbildung 32, Tabelle 13). Das in vielen Geweben exprimierte Gen hat einen ORF von 1481 bp und codiert ein aus 493 Aminosäureresten bestehendes Protein mit einem Molekulargewicht von 54,6 kDa (IKEGAWA *et al.* 1996; LECKA-CZERNIK *et al.* 1995). *EFEMP1* besitzt sechs Ca<sup>2+</sup>-bindende EGF-ähnliche Domänen, welche u.a. eine Rolle bei spezifischen Protein-Protein Interaktionen spielen (RAO *et al.* 1995).



**Abb. 32: Genomische Struktur von *EFEMP1*.**

Genomische Organisation von *EFEMP1*. Exone sind als rote Vierecke, nicht-translatierte Regionen als gelbe Flächen dargestellt. Intronische Sequenzen sind durch schwarze horizontale Linien repräsentiert. Die Anordnung und Größe der Exon-Intron-Struktur ist jeweils maßstabsgetreu angegeben. Die bei der Mutationsanalyse sporadischer radiärer Drusen gefundenen Sequenzvarianten sind jeweils an der entsprechenden Stelle im Gen eingezeichnet (siehe Abschnitt 3.3.3).

Zur Durchführung von Mutationsanalysen wurden die Exon-Intron Grenzen von *EFEMP1* bestimmt (Tabelle 13). Dazu wurde die Sequenz der *EFEMP1*-cDNA (U03877) mit den Sequenzen genomischer PCR-Fragmente aus dem PAC-Klon dJ747P14 verglichen (siehe Anhang B und J).

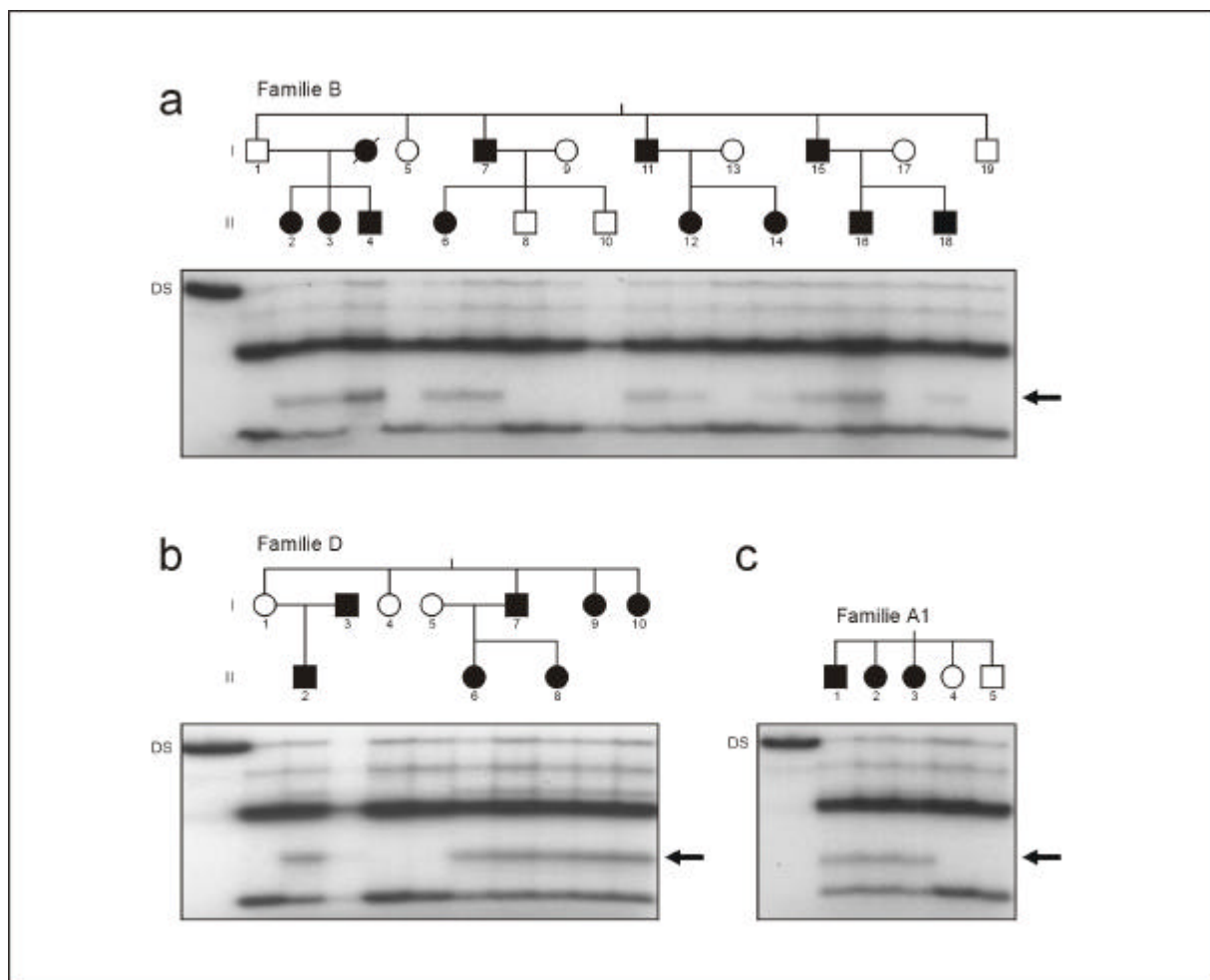
**Tab. 13: Genomische Struktur von *EFEMP1*.**

Exon	Größe (bp)	3'-Akzeptor Spleißstelle	5'-Donor Spleißstelle	Genbank Acc. No.
1	77*		...CACAG gtagg...*	-
2	41*	...cacag GTATT...*	...ACACG gtagg...*	-
3	88	...cttgag ATTCACA...	...GTACACG gtaagg...	AY004321
4	49	...ttcag CAATGCA...	...TGCAAAG gtgagcc...	AY004322
5	387	...accacag ATATTGA...	...TGCCAAG gtaggaa...	AY004323
6	123	...ctgacag ACATAGA...	...TGCGTAG gtaagta...	AY004324
7	120	...aacctag ACATAGA...	...TGCGTAG gtaagcc...	AY004325
8	120	...tttcag ATATAAA...	...TGTGAAG gtaaac...	AY004326
9	120	...tcaacag ACATTGA...	...TGTC AAG gtaagtt...	AY004327
10	124	...tctacag ATATAAA...	...CAGAGAA gtaagaa...	AY004328
11	196	...tctgcag CCGATGT...	...CCTACGA gtaagta...	AY004329
12	162	...atcttag CAAACAA...		AY004330

\*Angaben übernommen aus IKEGAWA *et al.* 1996.

### 3.3.2 Analyse der R345W Mutation in DHRD-/MLVT-Familien

Für die Untersuchung der R345W Mutation stand genomische DNA von zwei MLVT-Familien (B und D) mit insgesamt 18 betroffenen und 11 nicht-betroffenen Individuen, sowie von einem Zweig einer DHRD-Familie (A1) mit drei betroffenen und zwei nicht-betroffenen Personen zur Verfügung. Mit Hilfe der Oligonukleotidprimer EFEMP1-mutF1 und EFEMP1-mutR (siehe Anhang B, J) wurde ein 91 bp großes Fragment aus Exon 10 von *EFEMP1* amplifiziert und anschließend einer SSCP-Analyse unterzogen (Abbildung 33). Dabei konnte gezeigt werden, dass die betroffenen Mitglieder aller drei Familien die R345W Mutation tragen. Dies wurde durch eine direkte Sequenzanalyse von Patient D-I/10 bestätigt (Abbildung 34e).

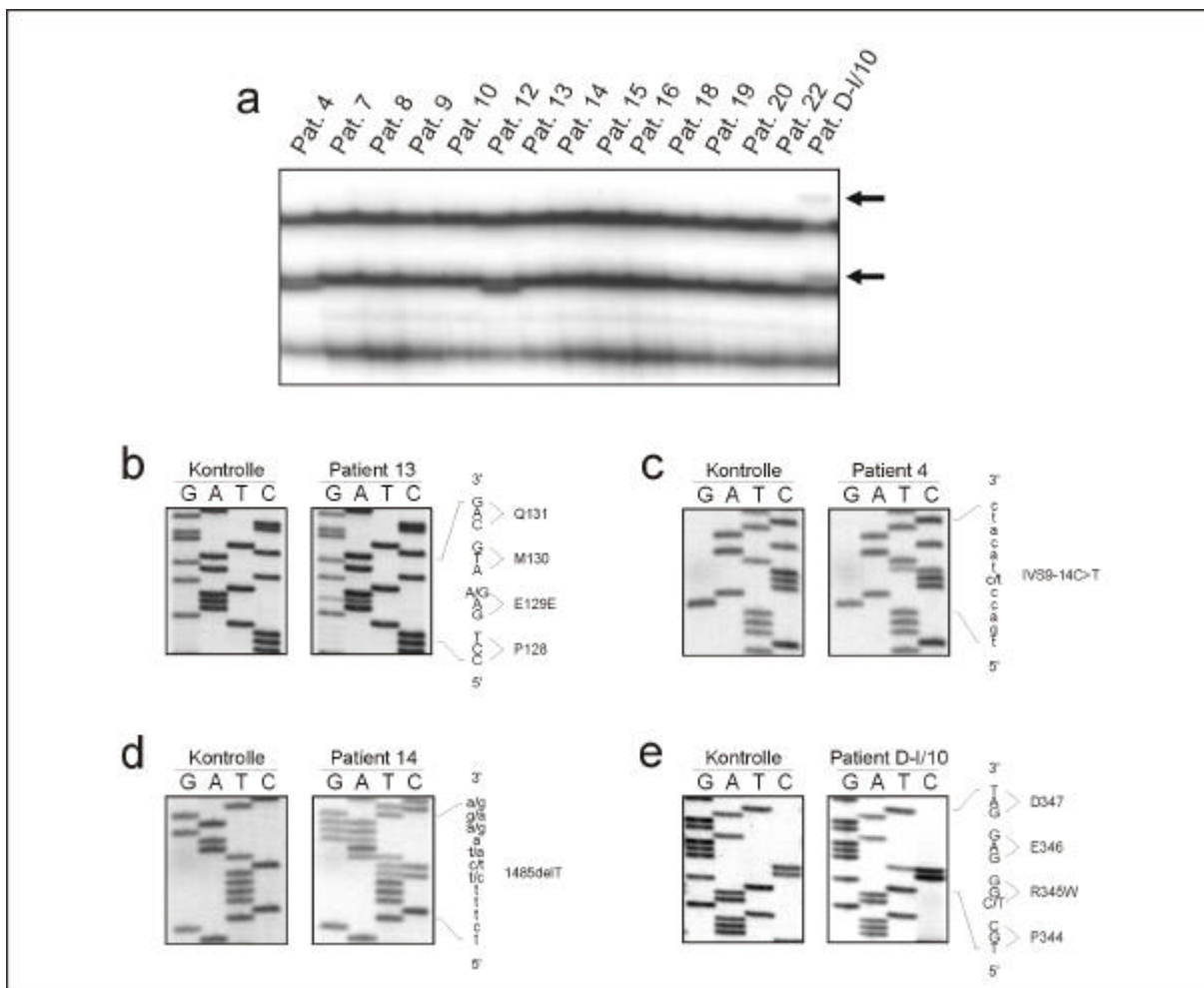


**Abb. 33: SSCP-Analyse der R345W Mutation in DHRD-/MLVT-Familien.**

Kosegregation des MLVT-Phänotyps mit der R345W Mutation in Familie B (a), in Familie D (b) und in einem Zweig der DHRD-Familie A1(c). Der *mobility shift* ist jeweils durch einen Pfeil gekennzeichnet. Der DNA-Doppelstrang ist mit DS bezeichnet.

### 3.3.3 Mutationsanalyse in Patienten mit sporadischen radiären Drüsen

Für die Mutationsanalyse von *EFEMP1* stand die genomische DNA von 14 Individuen mit radiären Drüsen, sowie 70 Kontrollpersonen zur Verfügung (Tabelle 2). Bei allen erkrankten Personen waren keine weiteren betroffenen Familienmitglieder bekannt. Mit Hilfe von SSCP-Analysen und direkter Sequenzierung wurden die 10 codierenden Exone von *EFEMP1* untersucht (Abbildungen 32, 34). Dabei konnten drei verschiedene Sequenzvarianten und zwei intragenische polymorphe Sequenzwiederholungen sowohl bei den erkrankten Individuen, als auch in der Kontrollgruppe gefunden werden.



**Abb. 34: Mutationsanalyse von *EFEMP1* bei Patienten mit radiären Drüsen.**

**a.** SSCP-Analyse von *EFEMP1*, Exon 10. Die charakteristischen *mobility shifts* der R345W Mutation waren nur bei Patient D-I/10 zu erkennen (Pfeile). Die *mobility shifts* bei den Patienten 4 und 12 wurden durch die IVS9-14C>T Veränderung hervorgerufen **(c)**. **b.** Patient 13 hatte einen Adenin nach Guanin Austausch an der Nukleotidposition + 387. **d.** die Deletion eines Thyminrestes in der 3'-UTR an der Nukleotidposition + 1485 bei Patient 14. **e.** Nachweis der R345W Mutation in der Positivkontrolle D-I/10.

Die R345W Mutation, welche mit DHRD und MLVT assoziiert wurde, konnte nur in der Positivkontrolle (Patient D-I/10) aber in keinem der 14 Patienten nachgewiesen werden (Abbildung 34a, e). Die Transition eines Adenin gegen ein Guanin an der Nukleotidposition



+387 verursachte keine Änderung der Aminosäuresequenz (Abbildung 34b, Tabelle 14) und wurde in 7,1% (2 von 28 Allelen) der Patienten und 2,1% (3 von 140 Allelen) der Kontrollen gefunden. Die Veränderung eines Cytosinrestes in einen Thyminrest lag im Intron 9 an der Position -14 und war bei 7,1% (2 von 28 Allelen) der Patienten mit radiären Drusen und 7,1% (10 von 140 Allelen) der Kontrollpersonen vorhanden (Abbildung 34c, Tabelle 14). Die Deletion eines Thyminrestes in der 3'-UTR (1485delT) besaßen schließlich 7,1% (2 von 28 Allelen) der betroffenen Personen und 2,1% (3 von 140 Allelen) der Kontrollen (Abbildung 34d, Tabelle 14).

**Tab. 14: Gefundene Sequenzvarianten in EFEMP1.**

Sequenzänderung	Lokalisierung	Allelfrequenz bei Patienten (n=28)	Allelfrequenz bei Kontrollen (n=140)
387A>G	Exon 5	2 (7,1%)	3 (2,1%)
IVS9-14C>T	IVS 9	2 (7,1%)	10 (7,1%)
1485delT	3'UTR	2 (7,1%)	3 (2,1%)

Mit Hilfe der SSCP-Analyse und direkter Sequenzierungen konnten auch zwei intragenische Polymorphismen gefunden werden. Im Intron 7 fand sich die komplexe Sequenzwiederholung (at)<sub>5</sub>(gt)<sub>4</sub>(at)<sub>4</sub>ac(at)<sub>2</sub>ac(at)<sub>7,8</sub> (Abbildung 32, Tabelle 15). Eine einfache Trinukleotidwiederholung (ttg)<sub>9,12</sub> wurde im Intron 11 nachgewiesen (Abbildung 32, Tabelle 15). Der Vergleich der Allelfrequenzen dieser beiden Sequenzwiederholungen in der Gruppe mit radiären Drusen und der Kontrollgruppe zeigten keine signifikanten Unterschiede.

**Tab. 15: Intragenische polymorphe Sequenzwiederholungen in EFEMP1.**

Allel	repetitives Element	Allelfrequenz bei Patienten (n=28)	Allelfrequenz bei Kontrollen (n=140)
1	(at) <sub>7</sub>	27 (96,4%)	140 (100,0%)
2	(at) <sub>8</sub>	1 (3,6%)	0
1	(ttg) <sub>9</sub>	1 (3,6%)	0
2	(ttg) <sub>10</sub>	26 (92,9%)	135 (96,4%)
3	(ttg) <sub>11</sub>	0	2 (1,4%)
4	(ttg) <sub>12</sub>	1 (3,6%)	3 (2,1%)

### 3.3.4 Untersuchungen zur Funktion von EFEMP1

Für die Analysen zur Funktion von EFEMP1 wurde das Hefe Zwei-Hybrid System verwendet. Als Untersuchungssystem wurde das Rind (*Bos taurus*) ausgewählt, um die einfache und schnelle Isolierung beliebiger Mengen retinalen Gewebes zu gewährleisten.

### 3.3.4.1 Klonierung des orthologen *EFEMP1*-Gens vom Rind

Als Ausgangspunkt für die Klonierung des bovinen *EFEMP1* Orthologs dienten die bereits bekannten *EFEMP1* cDNA-Sequenzen aus Mensch (U03877) und Ratte (D89730).

-32	CCCGGACGGCGACCCGGCCGCGCAGATTACAGATGTTGAAAGCCCTTTTCCTAACTATGCTGACTCTGGCGTTGGTCAAG	
	<u>M L K A L F L T M L T L A L V K</u>	16
49	TCACAGGACACTGAAGAAACCATCACGTACACGCAATGCACAGATGGATATGAGTGGGATCCTGTAAGACAGCAGTGCAA	
	<u>S Q D T E E T I T Y T Q C T D G Y E W D P V R Q Q C K</u>	43
129	AGATATTGATGAATGTGACATTGTCCAGATGCTTGCAAAGGTGGAATGAAATGTGTCAACCACTATGGAGGATACTCT	
	D I D E C D I V P D A C K G G M K C V N H Y G G Y L	69
209	GCCTTCCTAAAACAGCCAGATTATTGTCAACAATGAGCAACCTCAGCAAGAAACACCAGCAGCCGAAGGTGCGGGTGC	
	C L P K T A Q I I V N N E Q P Q Q E T P A A E G A G A	96
289	GCTGCAAAATCAGCCGCGACCTCTAGTACAGGCACTGGGGGTAGCAGCCACTGGCGTCGCTGCCAGTGGAGTGGTCC	
	A A N A A A T S S T G T G G V A A T G V A A S G V V P	123
369	TGGGGTGGTTTTGTGCGCAGTGTCTGTGTAAGTGCAGACTGGCCGAAATAACTTTGTCACCCGGCGGAACCCATCTG	
	G G G F V A S A A A E V Q T G R N N F V T R R N P S	149
449	ACCCTCAGCGCATCCCATCAACCCTTCTCACCGGATCCAGTGTGCAACAGGCTATGAGCAGAGTGAGCATAACGTGTGC	
	D P Q R I P I N P S H R I Q C A T G Y E Q S E H N V C	176
529	CAAGACATAGCAATGCACTGCAGGGACACAACTGTAGAGCCGATCAAGTGTGCATCAATCTGCGAGGTTCTTCGCG	
	Q D I D E C T A G T H N C R A D Q V C I N L R G S F A	203
609	CTGTCAATGCCCTCCCGGGTATCAGAAGCGAGGAGAGCAGTGTGTAGATGTAGACGAATGCACCATCCCTCCATATTGCC	
	C Q C P P G Y Q K R G E Q C V D V D E C T I P P Y C	229
689	ACCAAAGATGTGTGAACACACCAGGATCATTTTATTGCCAGTGAATCCTGGGTTTCAGTTGGCAGCAAACAATAACC	
	H Q R C V N T P G S F Y C Q C N P G F Q L A A N N Y T	256
769	TGTGTAGATATAAATGAATGTGATGCCAGCAATCAATGTGCTCAGCAATGTACAACTTCTTGGTTCATTCATCTGTCA	
	C V D I N E C D A S N Q C A Q Q C Y N I L G S F I C Q	283
849	GTGCAATCAAGGATATGAGCTAAGCAGTGCAGGCTCAACTGTGAAGACATTGATGAATGCAGAACCTCGAGCTACCTGT	
	C N Q G Y E L S S D R L N C E D I D E C R T S S Y L	309
929	GTCAATATCAATGTGTCAACGAACCTGGGAAATTTCTCATGTATGTGCCCAAGGATACCAAGTGGTGAGAGGTAGAACA	
	C Q Y Q C V N E P G K F S C M C P Q G Y Q V V R G R T	336
1009	TGTCAGGATATAAATGAGTGTGAGACCACAAATGAATGTGCGGAAGATGAAATGTGTTGGAATTATCATGGCGGCTCCG	
	C Q D I N E C E T T N E C R E D E M C W N Y H G G F R	363
1089	TTGTTACCCACGAAATCCTTGTCAAGATCCCTATGTTCTAACATCAGAGAACCAGTGTGTTTGGCCAGTCTCAAATGCAA	
	C Y P R N P C Q D P Y V L T S E N R C V C P V S N A	389
1169	TGTGCCGAGAAATTCCTCAATCCATCGTCTACAAATATATGAGCATTTCGATCTGATAGGTCTGTACCATCAGACATCTTC	
	M C R E I P Q S I V Y K Y M S I R S D R S V P S D I F	416
1249	CAAATACAGCCACAACCAATTTATGCCAACTATCAACACTTTTCGGATTAATCTGGAAATGAAAACGGAGAGTTCTA	
	Q I Q A T T I Y A N T I N T F R I K S G N E N G E F Y	443
1329	CCTAAGACAAAAGTCTGTAAAGTCAATGCTTGTGCTGGTGAAGTCGCTATCAGGACCAAGAGAATACATAGTGGACC	
	L R Q T S P V S A M L V L V K S L S G P R E Y I V D	469
1409	TGGAGATGGTACAGTCAACAGTATAGGAACCTCCGCACTAGTTCAGTGTAAAGATTGACAATAATAGTGGGGCCATTT	
	L E M V T V N S I G T F R T S S V L R L T I I V G P F	496
1489	TCATTTTGTGTTTTTAAAGCGTCCACTGTAGGCATTTAAATCAGCCAAGAATTTTGTATCTTAAAGCACTATTTTATT	
	S F *	498
1569	TATAGACATATCTAGTTCATCTACATCTATATACTGTACACTCATGAATAATCAACAATTACCCATGGTATAAAGTG	
1649	GGCATTAACTGTAAAGATTCAAGGTTGCTTCTACTGTAGTAAATAGACATTA	

**Abb. 35: Sequenz der bovinen *EFEMP1* cDNA und die daraus abgeleitete Proteinsequenz.**

Die Zahlen auf der linken Seite beziehen sich auf die Nukleotidsequenz, die auf der rechten Seite auf die Proteinsequenz. Das vorhergesagte, 17 Aminosäurereste lange Signalpeptid ist unterstrichen.

Dazu wurden drei Primerpaare innerhalb konservierter Sequenzen generiert, welche die Amplifizierung überlappender PCR-Fragmente aus boviner Retina Gesamt-RNA ermöglichten (siehe Anhang B und J). Die so amplifizierte bovine cDNA-Sequenz umfasste die Nukleotide

+ 18 bis + 1454 (Abbildung 35). Um die 5'- und 3'-Enden der bovinen cDNA zu isolieren wurde die 5'- bzw. 3'-RACE Technik angewandt. Bei der 5'-RACE wurde die Erststrang cDNA mit Hilfe des Primers EFEMP1\_3R gewonnen. Die erste PCR erfolgte mit dem Primer EFEMP1\_2R, die zweite PCR mit dem Primer EFEMP1\_1R. Durch die 5'-RACE konnten weitere 49 bp (Nukleotidpositionen -32 bis + 17) isoliert werden. Die erste PCR der 3'-RACE wurde mit dem Primer EFEMP1\_2F, die zweite PCR mit dem Primer EFEMP1\_3F durchgeführt. Das so amplifizierte PCR-Produkt hatte eine Größe von etwa 1,2 kb. Durch die partielle Sequenzierung dieses Fragmentes wurden weitere 253 bp (Nukleotidpositionen +1455 bis + 1703) hinzugewonnen. Damit konnten insgesamt 1735 bp der bovinen *EFEMP1* cDNA, mit einem ORF von 1494 bp isoliert werden. Die daraus abgeleitete Proteinsequenz bestand aus 498 Aminosäuren, wobei die ersten 17 Aminosäurereste als Signalpeptid vorhergesagt wurden (Abbildung 35).

Ein Vergleich der EFEMP1 Proteinsequenzen von Rind, Mensch und Ratte ergab eine Übereinstimmung von 92,4% zwischen der humanen und bovinen Sequenz bzw. 89,0% zwischen den Sequenzen von Ratte und Rind (Abbildung 36).

EFEMP1 ( <i>H.sapiens</i> )	1	MLKALFLTMLTLALVKSQDTEETI TYTQCTDGYEWDVPRQQCKDI DECDI VPDACKGGMKCVNHYGGYLC
EFEMP1 ( <i>R. norvegicus</i> )	1	MLQTVFLTMLTLALVKSQVTEETI TYTQCTDGYEWDVPRQQCKDI DECDI VPDACKGGMKCVNHYGGYLC
EFEMP1 ( <i>B. taurus</i> )	1	MLKALFLTMLTLALVKSQDTEETI TYTQCTDGYEWDVPRQQCKDI DECDI VPDACKGGMKCVNHYGGYLC
EFEMP1 ( <i>H.sapiens</i> )	71	LPKTAQI I VNNEQPQOETPAAE TSGAT. . . . . TGVVAASSMATSGV I PGGGFVASAAAVAGPEVD
EFEMP1 ( <i>R. norvegicus</i> )	71	LPKTAQI I VNNEQPQOETPAAE ASSGAA. . . . . TGVVAASSMATSGV I PGGGFV ASAVAGPEVQ
EFEMP1 ( <i>B. taurus</i> )	71	LPKTAQI I VNNEQPQOETPAAE GAGAAANAATSTGTG GVRATGVAA SGV I PGGGFVASAAA. . . . . EVQ
EFEMP1 ( <i>H.sapiens</i> )	132	TGRNRFVI RRPADPQRI PSNP SHRI QCAAGYEQSEHNVCQDI DECTAGTHNCRADQVCI NLRGSFACQC
EFEMP1 ( <i>R. norvegicus</i> )	132	TGRNRFVI RRPADPQRI PSNP SHRI QCAAGYEQSEHNVCQDI DECTSGTHNCRADQVCI NLRGSFACQC
EFEMP1 ( <i>B. taurus</i> )	137	TGRNRFVIRRNPSDPQRI PINPSHRI QCAAGYEQSEHNVCQDI DECTAGTHNCRADQVCI NLRGSFACQC
EFEMP1 ( <i>H.sapiens</i> )	202	PPGYQKRGEQCVDI DECTI PPYCHQRCVNTPGSFYQCQSPGFQLAANNYTCVDI NECDASNQCAQQCYNI
EFEMP1 ( <i>R. norvegicus</i> )	202	PPGYQKRGEQCVDI DECSVPPYCHQRCVNTPGSFYQCQCPGFQLAANNYTCVDI NECDASNQCAQQCYNI
EFEMP1 ( <i>B. taurus</i> )	207	PPGYQKRGEQCV D DECTI PPYCHQRCVNTPGSFYQCQCPGFQLAANNYTCVDI NECDASNQCAQQCYNI
EFEMP1 ( <i>H.sapiens</i> )	272	LGSFI CQCNGYELSSDRLNCEDI DECR TSSYLCQYQCVNEPGKFCMCPQGYQVVR SRTCQDI NECETT
EFEMP1 ( <i>R. norvegicus</i> )	272	LGSFI CQCNGYELSSDRLNCEDI DECR TSSYLCQYQCVNEPGKFCMCPQGYQVVR SRTCQDI NECETT
EFEMP1 ( <i>B. taurus</i> )	277	LGSFI CQCNGYELSSDRLNCEDI DECR TSSYLCQYQCVNEPGKFCMCPQGYQVVR SRTCQDI NECETT
EFEMP1 ( <i>H.sapiens</i> )	342	NECREDEM CWNYHGGFR CYPRNPCQDPYI LTPENRCVCPVSNAMCRELPQSI VYKYMNI RSDRSVPSDI F
EFEMP1 ( <i>R. norvegicus</i> )	342	NECREDEM CWNYHGGFR CYPRNPCQDPYVLTSENRCVCPVSNAMCRDVPQSI VYKYMNI RSDRSVPSDI F
EFEMP1 ( <i>B. taurus</i> )	347	NECREDEM CWNYHGGFR CYPRNPCQDPYVLTSENRCVCPVSNAMCRELPQSI VYKYMNI RSDRSVPSDI F
EFEMP1 ( <i>H.sapiens</i> )	412	QI QATTI YANTI NTFRI KSGNENGEFYLRQTSPVSAM.VLVKSLSGPREHI VDLEM.TVSSI GTFRTSSV
EFEMP1 ( <i>R. norvegicus</i> )	412	QI QATTI YANTI NTFRI KSGNENGEFYLRQTSPVSAM.VLVKSLSGPREHI V GLEM.TVSSI GTFRTSSV
EFEMP1 ( <i>B. taurus</i> )	417	QI QATTI YANTI NTFRI KSGNENGEFYLRQTSPVSAM.VLVKSLSGPREVI VDLEM.TVNSI GTFRTSSV
EFEMP1 ( <i>H.sapiens</i> )	482	LRLTI I VGPF SF
EFEMP1 ( <i>R. norvegicus</i> )	482	LRLTI I VGPF SF
EFEMP1 ( <i>B. taurus</i> )	487	LRLTI I VGPF SF

**Abb. 36: Vergleich der Proteinsequenz von EFEMP1 bei Mensch, Ratte und Rind.**

Identische Aminosäurereste sind schwarz hinterlegt, ähnliche Aminosäurereste sind grau hinterlegt.

### 3.3.4.2 Analyse der Interaktion von EFEMP1 mit anderen Proteinen

Mit Hilfe eines Hefe Zwei-Hybrid Systems (MATCHMAKER Two-Hybrid System 3, Clontech), wurde die Fähigkeit von EFEMP1 zur Interaktion mit anderen Proteinen untersucht. Dazu wurden mehrere Konstrukte hergestellt (siehe Abschnitt III/11.1).

Die Klone mit dem bovinen EFEMP1 beinhalten den vollständigen codierenden Bereich des Gens, mit Ausnahme der 17 Aminosäuren langen Signalsequenz.

Zur Untersuchung des Einflusses der R345W Mutation auf die Interaktionsfähigkeit von EFEMP1 wurden Konstrukte hergestellt, welche diese Sequenzvariation enthielten (siehe Abschnitt III/11.1).

Bei der Durchsuchung einer cDNA Bank aus dem Lungengewebe einer adulten Ratte mit dem ubiquitär exprimierten Gen *DA41*, konnte mit Hilfe eines Hefe Zwei-Hybrid Systems EFEMP1 als Interaktionspartner von DA41 isoliert werden (OZAKI *et al.* 1997a). Durch die Herstellung von Deletionsmutanten konnte der mit EFEMP1 interagierende Bereich von DA41 auf die Aminosäurereste 155 bis 232 eingegrenzt werden. Für die Verwendung im Hefe Zwei-Hybrid System wurde diese Domäne, sowie 30 bp strangaufwärts und 35 bp strangabwärts flankierende Sequenz in die beiden Fusionsvektoren kloniert (siehe Abschnitt III/11.1). Die Sequenzierung mehrerer Klone zeigte, dass zwei verschiedene Sequenzen kloniert worden waren. Die als DA41-1 und DA41-2 bezeichneten Sequenzen stimmten zu 86,6% überein (Abbildung 37).

DA41-1 ( <i>B. taurus</i> )	GGACTTGCAGGCTCTGAGTAGCCTCGGCTTGAAGCTCGACTAACTTCTCTGAGCTCCAGAACCCAGATGCAGCAGCAGC
DA41-2 ( <i>B. taurus</i> )	GGACTTGCAGGCTCTGAGTAGCCTGGGTTTGAATACACCAACTTCTCTGAACTACAGAGCCAGATGCAGCGGCAAC
DA41 ( <i>R. norvegicus</i> ) 433	GGACTTGCAGGCTCTGAGTAGCCTGGGTTTAAATACACCAACTTCTCTGAACTACAGAGCCAAATGCAGCGGCAAC
DA41-1 ( <i>B. taurus</i> )	TCCTTGTCCAGCCCTGAGATGATGATCCAAATCATGGAAAATCCCTTTTGTTCAGAGCATGCTTTCGAATCCTGACCT
DA41-2 ( <i>B. taurus</i> )	TTATGTCCAAATCCTGAAATGATGCTCCAGATCATGGAAATCCCTTTTGTTCAGAGCATGCTTTCGAATCCTGACCT
DA41 ( <i>R. norvegicus</i> ) 509	TTTTGTCTAACCCCTGAAATGATGGTCCAGATCATGGAAAATCCCTTTTGTTCAGAGCATGCTTTCGAATCCTGACCT
DA41-1 ( <i>B. taurus</i> )	GATGAGGCAGTTAATTATGGCCAAATCCACAAATGCAACAGTTGATACAGAGAAAATCCAGAAAATCAGTCACCTGCTA
DA41-2 ( <i>B. taurus</i> )	GATGAGGCAGTTAATTATGGCCAAATCCACAAATGCAACAGTTGATACAGAGAAAATCCAGAAAATGATCAATGCTA
DA41 ( <i>R. norvegicus</i> ) 585	GATGCGGCAGCTGATGATGGCCAAATCCACAGATGCAGCAGCTGATACAGAGAAAATCCAGAGATCAGTCACATGCTC
DA41-1 ( <i>B. taurus</i> )	AAACAACCAGATATAATGAGGCAGACCCCTTGAATCGCCAGGAATCCAGCTATGATGCAAGAGATGATGAG
DA41-2 ( <i>B. taurus</i> )	AATAAACCAGATATGATGAGACAACATTGGAACCTTGCAGGAATCCAGCAATGATGCAAGAGATGCTGAG
DA41 ( <i>R. norvegicus</i> ) 661	AATAAACCAGATATAATGAGGCAGACATTGGAACCTTGCAGGAATCCAGCAATGATGCAAGAGATGATGAG

**Abb. 37: Sequenzvergleich der DA41 cDNA Teilsequenzen von Rind und Ratte.**

Die Sequenzen der bovinen *DA41* cDNAs entsprechen den Nukleotidpositionen +433 bis +731 der *DA41* cDNA der Ratte (Genbank Acc. No.: D87950). Identische Nukleotide sind schwarz unterlegt. Der mit EFEMP1 interagierende Bereich ist rot hervorgehoben (OZAKI *et al.* 1997a).

Eine BLAST-Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenzen mit Proteindatenbanken zeigte signifikante Übereinstimmungen mit mehreren Vertretern aus der Proteinfamilie der Ubiquiline (UBQLN) (Abbildung 38). Diese sind an zahlreichen Prozessen, wie z.B. der Regulation des Zellzyklus (OZAKI *et al.* 2000), dem Abbau von Proteinen (KLEIJNEN *et al.* 2000), oder der Regulation von Proteinfilament Interaktionen (WU *et al.* 1999) beteiligt.

NP038466-UBQLN1 ( <i>H. sapiens</i> )	152	LGGLAGLSSLGLNITNFSELQSQMRQLLSNPEMMVQIMENPFVQSMLSNPDLMRQLI
NP038472-UBQLN2 ( <i>H. sapiens</i> )	148	LGGLAGLSSLGLSSTNFSELQSQMQQLMASPEMMI QIMENPFVQSMLSNPDLMRQLI
AAF67143-UBQLN3 ( <i>H. sapiens</i> )	141	.....SRLGLAYRGEPPDQSSLMRQHVSVPEFVITQLIDDPFITPGLLSNTGLVRLV
BAA92267-DA41 ( <i>R. norvegicus</i> )	143	LGGLAGLSSLGLNITNFSELQSQMRQLLSNPEMMVQIMENPFVQSMLSNPDLMRQLI
AAF01365-UBQLN1 ( <i>M. musculus</i> )	143	LGGLAGLSSLGLNITNFSELQSQMRQLLSNPEMMVQIMENPFVQSMLSNPDLMRQLI
AAF01366-UBQLN2 ( <i>M. musculus</i> )	159	LGSLSLSNLGLNSPNFTELNNQMQQLLASPEMMI QIMENPFVQSMLSNPDLMRQLI
DA41-1 ( <i>B. taurus</i> )		GGGLAGLSSLGLSSTNFSELQSQMQQLLSPEMMI QIMENPFVQSMLSNPDLMRQLI
DA41-2 ( <i>B. taurus</i> )		GGGLAGLSSLGLNITNFSELQSQMRQLMSNPEMMVQIMENPFVQSMLSNPDLMRQLI
NP038466-UBQLN1 ( <i>H. sapiens</i> )	210	MANPQMQLIQRNPEISHMLNPNDIRQTLEARNPAMMQEMM
NP038472-UBQLN2 ( <i>H. sapiens</i> )	206	MANPQMQLIQRNPEISHLLNPNDIRQTLEARNPAMMQEMM
AAF67143-UBQLN3 ( <i>H. sapiens</i> )	193	.DNPHMQQLIQHNPEI GHI LNNPEIMRQTLEARNPAMMQEMM
BAA92267-DA41 ( <i>R. norvegicus</i> )	201	MANPQMQLIQRNPEISHMLNPNDIRQTLEARNPAMMQEMM
AAF01365-UBQLN1 ( <i>M. musculus</i> )	201	MANPQMQLIQRDPEISHMLNPNDIRQTLEARNPAMMQEMM
AAF01366-UBQLN2 ( <i>M. musculus</i> )	217	MANPQMQLIQRNPEISHLLNPNDIRQTLEARNPAMMQEMM
DA41-1 ( <i>B. taurus</i> )		MANPQMQLIQRNPEISHLLNPNDIRQTLEARNPAMMQEMM
DA41-2 ( <i>B. taurus</i> )		MANPQMQLIQRNPEISHMLNPNDIRQTLEARNPASMQEMM

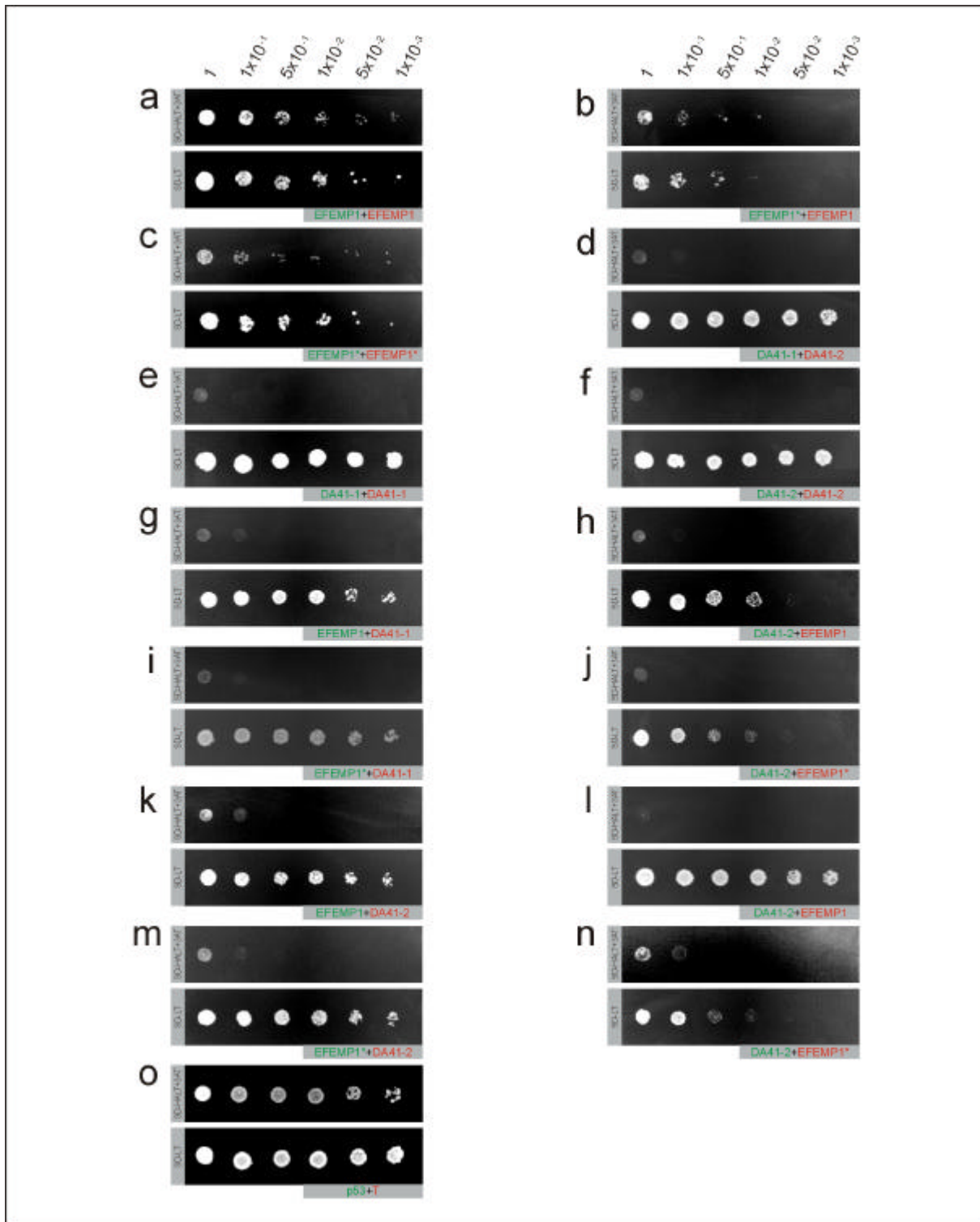
**Abb. 38: Vergleich der bovinen DA41 Proteinsequenzen mit verschiedenen orthologen Proteinen.**

Hochkonservierte Aminosäurereste sind schwarz unterlegt, ähnliche Aminosäurereste sind grau unterlegt. Die Swiss-Prot Acc. No. der Sequenzen ist, soweit vorhanden, angegeben.

UBQLN1, Ubiquilin 1 (OZAKI *et al.* 1997b; HANOKA *et al.* 2000; WU *et al.* 1999); UBQLN2, Ubiquilin 2 (KAYE *et al.* 2000; KLEIJNEN *et al.* 2000; WU *et al.* 1999); UBQLN3, Ubiquilin 3 (CONKLIN *et al.* 2000); DA41 (OZAKI *et al.* 1997b).

Für die Hefe Zwei-Hybrid Analyse wurden bereits auf Vektorselektionsmedium (SD -Leu,-Trp) vorselektionierte Klone in Verdünnungsreihen parallel auf SD -Leu,-Trp- (SD-LT) und SD -His,-Ade,-Leu,-Trp,+ 3-AT-Medium (SD-HALT+ 3AT) aufgetropft. In allen Versuchsansätzen wuchsen die Hefeklone auf dem Medium zur Selektion beider Fusionsvektoren (SD-LT) (Abbildung 39).

Klone mit EFEMP1 in beiden Vektoren wuchsen auch auf dem Interaktionsmedium (SD-HALT+ 3AT) (Abbildung 39a). Die *missense* Mutation R345W hatte keinen Einfluss auf die Interaktion von EFEMP1 mit sich selbst (Abbildung 39b, c). Die DA41 Proteine interagierten in keiner der möglichen Kombinationen miteinander (Abbildung 39d, e, f). Keine Interaktion konnte auch zwischen EFEMP1 und DA41-1 (Abbildung 39g, h) und EFEMP1 und DA41-2 (Abbildung 39k, l) nachgewiesen werden. Zwischen dem mutagenisierten EFEMP1 und DA41-1 (Abbildung 39i, j) und DA41-2 (Abbildung 39m, n) konnten ebenfalls keine Wechselwirkungen gefunden werden. Beim Kontrollansatz mit p53 und T-Antigen wuchsen die Klone in allen Verdünnungsstufen, sowohl auf dem SD-LT-, als auch auf dem SD-HALT+ 3AT-Medium (Abbildung 39o).



**Abb. 39: Analyse der Interaktionsfähigkeit von EFEMP1 mittels Hefe Zwei-Hybrid System.**

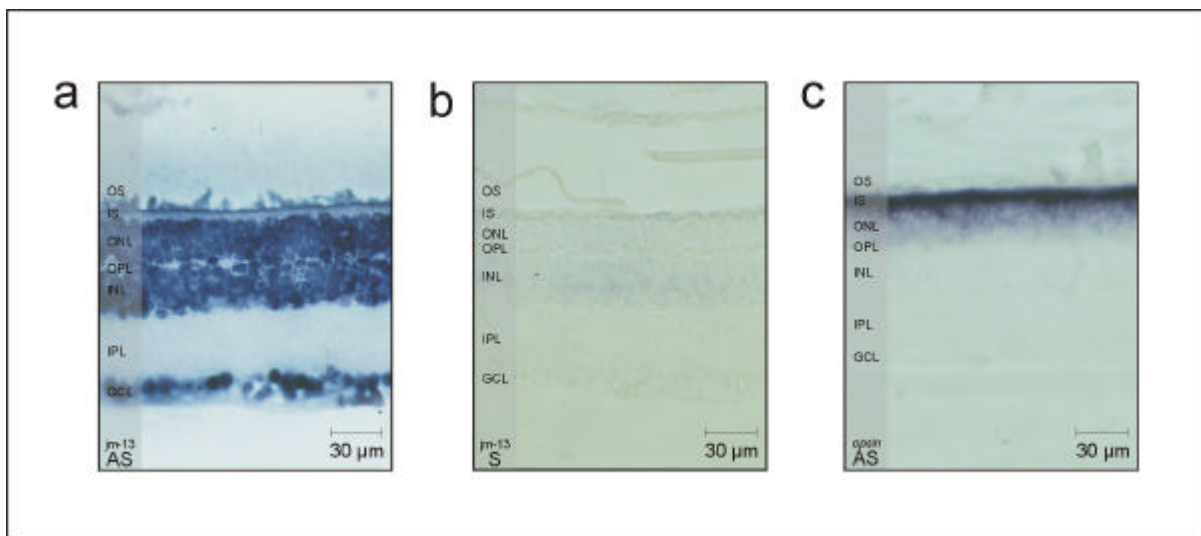
Ermittlung der Wachstumsfähigkeit transformierter Hefeklone. Interaktionsplatten (SD-HALT+ 3AT) sind jeweils oben und Vektorselektionsplatten (SD-LT) jeweils darunter abgebildet. Inserts im Vektor pGBKT7 sind jeweils grün, im Vektor pGADT7 jeweils rot dargestellt. Die relative Konzentration der aufgetropften Klonsuspensionen ist jeweils angegeben. Verwendete Abkürzungen: EFEMP1, *EGF-containing fibulin like extracellular matrix protein 1*; EFEMP1\*, EFEMP1 mit *missense* Mutation R345W; DA41-1, bovines Ubiquilin, Variante 1; DA41-2, bovines Ubiquilin, Variante 2; p53, murines p53; T, großes T-Antigen aus SV40.

#### 4. Untersuchungen zur räumlichen Expression von *CACNA1F* in der Retina

Als krankheitsassoziiertes Gen der inkompletten X-gebundenen kongenitalen stationären Nachtblindheit (CSNB) wurde *CACNA1F* identifiziert (STROM *et al.* 1998). Um einen ersten Einblick in die physiologische Bedeutung dieses Gens in der Netzhaut zu gewinnen, wurden Untersuchungen zur räumlichen Expression von *CACNA1F* in der Retina durchgeführt.

##### 4.1. RNA *in situ*-Hybridisierung von *CACNA1F* an Paraffinschnitten

Ein 586 bp großes Fragment aus einem nicht-konservierten Bereich von *CACNA1F* wurde mit Hilfe der Primer jm8-13F und jm8-13R amplifiziert und in den Vektor pBluescript® II SK (+) (Stratagene) kloniert (STROM *et al.* 1998). Zur Herstellung DIG-markierter Proben durch *in vitro*-Transkription, wurde der Klon JM8FR13/5 mit den Restriktionsenzymen *Not* I für die Transkription des *antisense* Stranges und *Xho* I für die Transkription des *sense* Stranges linearisiert. Die so gewonnenen Proben wurden als jm-13 *antisense* bzw. jm-13 *sense* bezeichnet. Mit ihnen wurden Paraffinschnitte von Augen einer adulten CD-1®-Maus hybridisiert (Abbildung 40).



**Abb. 40: RNA *in situ*-Hybridisierung von *CACNA1F*.**

**a**, RNA *in situ*-Hybridisierung einer 586 bp großen DIG-markierten RNA *antisense*-Probe aus *CACNA1F*. **b**, Hybridisierung mit der jm-13 *sense*-Sonde (Negativkontrolle). **c**, Hybridisierung mit einer Opsin *antisense*-Sonde (Positivkontrolle). Abkürzungen: AS, *antisense*-Probe; S, *sense*-Probe; äußere (OS) und innere (IS) Segmente der Photorezeptoren; ONL, äußere Körnerschicht; OPL, äußere plexiforme Schicht; INL, innere Körnerschicht; IPL, innere plexiforme Schicht; GCL, Ganglienzellschicht.

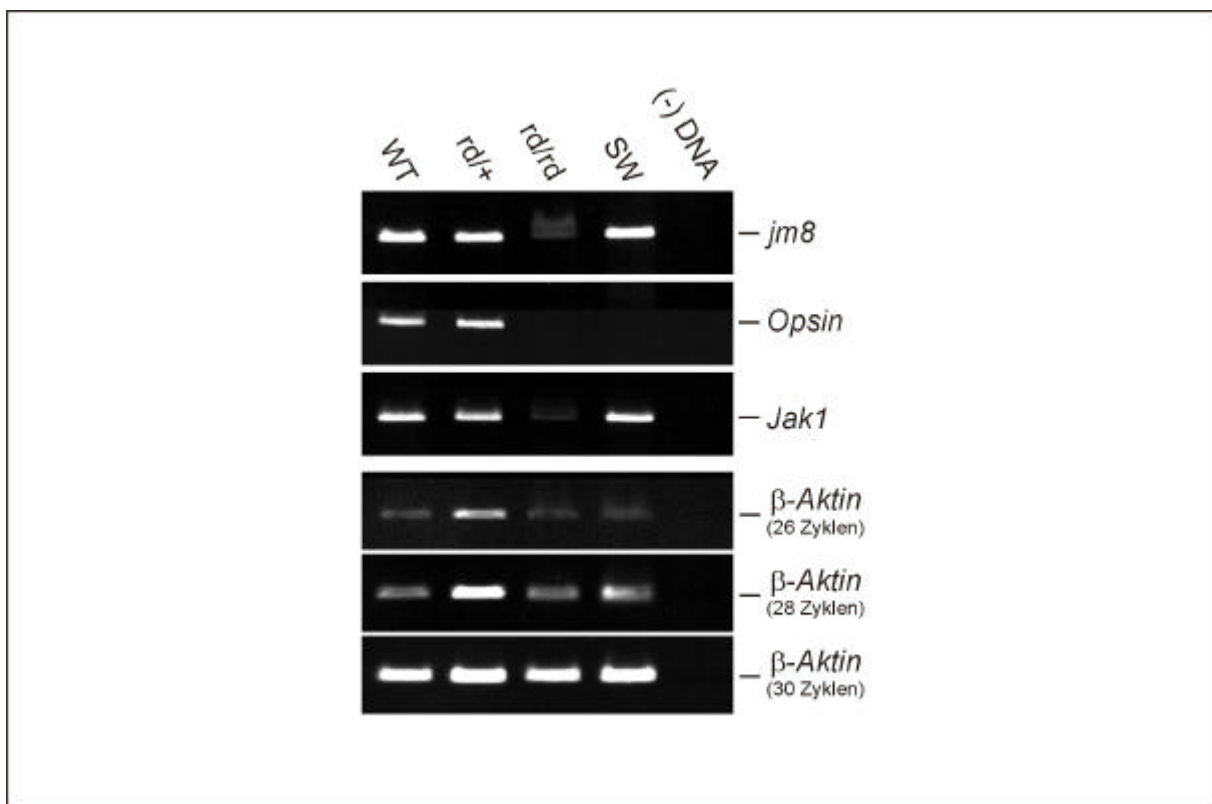
Spezifische Hybridisierungssignale wurden mit der jm-13 *antisense*-Sonde in der äußeren (ONL) und inneren (INL) Körnerschicht und in der Ganglienzellschicht (GCL) erzeugt (Abbildung 40a). Kein signifikantes Hybridisierungssignal ergab die Hybridisierung mit der jm-13 *sense*-Probe (Abbildung 40b). Die Opsin *antisense*-Sonde hybridisierte zu den inneren Segmenten der Photorezeptoren (IS) und der äußeren Körnerschicht (ONL) (Abbildung 40c).

## 4.2 Analyse des räumlichen Expressionsprofils des *CACNA1F*-Gens der Maus

Die Klonierung des murinen Orthologs zu *CACNA1F* (A. Meindl, unveröffentlichte Daten) ermöglichte die Untersuchung des räumlichen Expressionsmusters von *CACNA1F* in einer speziesspezifischen Umgebung. Die laborinterne Bezeichnung dieses Gens lautete *jm8*.

### 4.2.1 RT-PCR von *jm8* in verschiedenen rd-Mauslinien

Die RT-PCR Analyse wurde mit Gesamt RNA aus den Augen verschiedener Mauslinien durchgeführt (siehe 2.3.1.2).



**Abb. 41: Analyse der räumlichen Expression von *jm8* im Mausauge.**

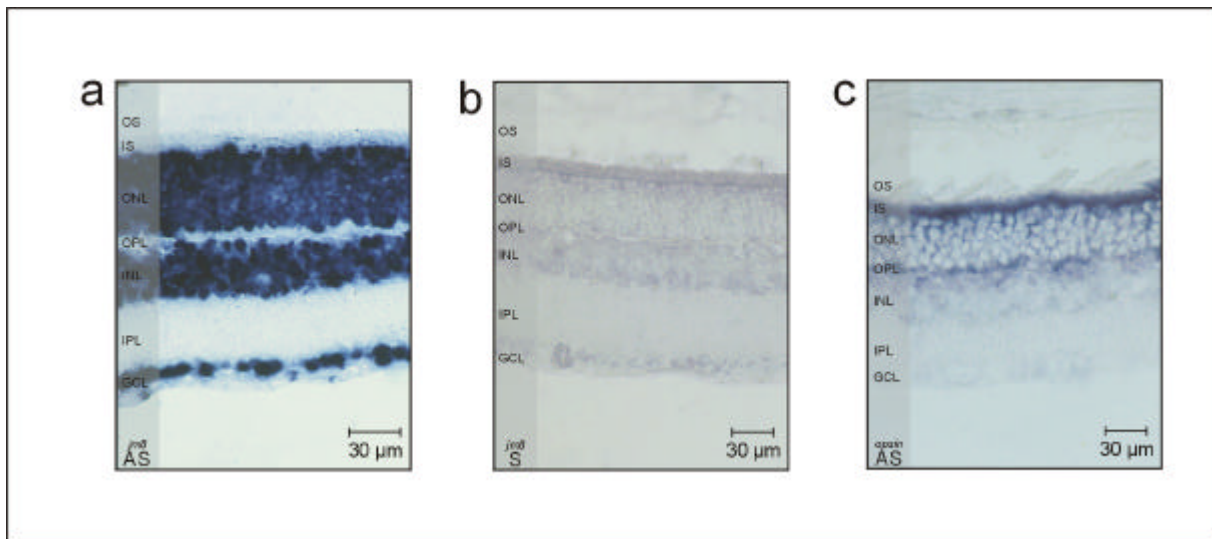
RT-PCR eines etwa 740 bp großen Fragmentes aus dem murinen Ortholog von *CACNA1F*, *Opsin*, *Jak1* und  $\beta$ -Aktin mit totaler Augen-RNA verschiedener Mausstämme. WT, Wildtypmaus (NMRI); rd/+, heterozygote rd Maus (C57BL/6J-rd le Gus -s\*h), rd/rd, homozygote rd-Maus (C3H/HeJ); Swiss Webster (SW)-Maus (CFW®).

Mit Hilfe der Primer *jm8Mus-c44F1* und *jm8Mus-c48R1* wurde ein etwa 740 bp großes PCR-Fragment amplifiziert (siehe Anhang B und J). Basierend auf der Expression der Kontrollgene *Opsin*, *Jak1* und  $\beta$ -Aktin (siehe 2.3.1.2; Abbildung 41), konnte für *jm8* folgendes Expressionsmuster identifiziert werden. Die Expression von *jm8* ist mit der von *Jak1* vergleichbar, d.h. *jm8* wurde analog zu *Jak1* in der Ganglienzellschicht und in der inneren Körnerschicht exprimiert. Das RT-PCR-Profil von *Opsin* zeigt darüber hinaus, dass *jm8* auch in den Photorezeptoren exprimiert wurde.



#### 4.2.2 RNA *in situ*-Hybridisierung von *jm8* an Paraffinschnitten

Als Hybridisierungsprobe diente ein etwa 650 bp großes Fragment, welches mit den Primern *jm8Mus-c44F2* und *jm8Mus-c48R2* aus Gesamt-RNA von Mausaugen amplifiziert wurde. Dieses wurde in den Vektor pCRScript™ Amp SK (+) (Stratagene) kloniert. Für die Herstellung der DIG-markierten Hybridisierungsproben wurde der Klon mit *Eco* RI (*antisense*) und *Not* I (*sense*) linearisiert. Die so gewonnenen Sonden wurden als *jm8 antisense* bzw. *jm8 sense* bezeichnet. Mit ihnen wurden Paraffinschnitte von Augen einer adulten CD-1®-Maus hybridisiert (Abbildung 42).



**Abb. 42: RNA *in situ*-Hybridisierung von *jm8***

**a.** RNA *in situ*-Hybridisierung einer etwa 650 bp großen DIG-markierten RNA *antisense*-Probe aus dem murinen Ortholog von *CACNA1F*. **b.** Hybridisierung mit der *jm8 sense*-Probe (Negativkontrolle).

**c.** Hybridisierung mit einer Opsin *antisense*-Probe (Positivkontrolle). Abkürzungen: AS, *antisense*-Probe; S, *sense*-Probe; äußere (OS) und innere (IS) Segmente der Photorezeptoren; ONL, äußere Körnerschicht; OPL, äußere plexiforme Schicht; INL, innere Körnerschicht; IPL, innere plexiforme Schicht; GCL, Ganglienzellschicht.

Die Hybridisierung der *jm8 antisense*-Probe ergab Hybridisierungssignale in der äußeren (ONL) und inneren Körnerschicht (INL), sowie in der Ganglienzellschicht (GCL) (Abbildung 42a). Die Hybridisierung der als Negativkontrolle dienenden *jm8 sense*-Probe konnte kein signifikantes Hybridisierungssignal nachweisen (Abbildung 42b). Die Opsin *antisense*-Sonde wurde als Positivkontrolle verwendet und hybridisierte zu den inneren Segmenten der Photorezeptoren (IS) und der äußeren Körnerschicht (ONL) (Abbildung 42c).

## V. Diskussion

Die Netzhaut des menschlichen Auges ist ein hochkomplexes Organ, das aus mehreren funktionell unterschiedlichen Zellschichten aufgebaut ist. Die Vielzahl der Proteine die am Aufbau und der Erhaltung dieser Strukturen, sowie den darin ablaufenden vielschichtigen physiologischen Vorgängen beteiligt sind, prädestiniert dieses Organ für eine große Anzahl erblicher Netzhauterkrankungen.

Die genauen molekularbiologischen Ursachen, sowie die zellphysiologischen Vorgänge die zu den degenerativen Prozessen in der Netzhaut bzw. Makula führen, sind jedoch bislang weitgehend unbekannt. Ein wesentlicher Grund dafür ist die nur sehr begrenzte Verfügbarkeit von erkranktem Augengewebe für direkte biochemische und molekulargenetische Analysen. Hinzu kommt der meist stark progrediente Verlauf von Netzhautdegenerationen der dazu führt, dass zum Zeitpunkt einer Gewebeuntersuchung die primären Ursachen der Erkrankung in der Regel nicht von den sekundären oder tertiären Folgeerscheinungen unterschieden werden können.

Als sehr erfolgreiche Strategie zur Isolierung krankheitsverursachender Gene hat sich die Positionsklonierung erwiesen (z.B. ROMMENS *et al.* 1989; BROOK *et al.* 1992). Sie kann weitgehend unabhängig von den zugrunde liegenden Pathomechanismen der jeweiligen Erkrankung angewandt werden kann und bietet sich als ideale Methode zur Erforschung der genetischen Ursachen von Netzhauterkrankungen an. Mit der Anwendung genetischer Kopplungsanalysen konnten bereits 127 Genlozi den verschiedenen retinalen Erkrankungen zugeordnet werden<sup>34</sup>. Dies bildete die Grundlage für die Klonierung von bisher 68 Krankheitsgenen<sup>34</sup>, wie z.B. VMD2 (MARQUARDT *et al.* 1998; PETRUKHIN *et al.* 1998), TIMP3 (WEBER *et al.* 1994), ABCA4 (ALLIKMETS *et al.* 1997a), CACNA1F (STROM *et al.* 1998) oder CRX (FREUND *et al.* 1997). Die positionelle Klonierungsstrategie beinhaltet eine Vielzahl unterschiedlichster Methoden, deren jeweilige Anwendung von dem vorhandenen Kenntnisstand der zu untersuchenden Erkrankung abhängt. In zunehmendem Maße werden die teilweise sehr zeit- und kostenintensiven Untersuchungen durch die im Zusammenhang mit dem Human Genom Projekt veröffentlichten Sequenzdaten des menschlichen Genoms erleichtert. So ermöglicht z.B. die Sequenzierung großer chromosomaler Abschnitte, in Verbindung mit immer detaillierteren Genkarten, die direkte Analyse von Kandidatengenen. Die Nutzung dieser Daten vereinfachte bzw. ermöglichte auch einige der im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Untersuchungen zur molekulargenetischen Analyse hereditärer Netzhauterkrankungen.

---

<sup>34</sup> <http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/>

## North Carolina Makuladystrophie

Die North Carolina Makuladystrophie (NCMD) ist eine sehr seltene Makuladegeneration mit variablem Phänotyp und nur gering progressivem Verlauf. Genetische Kopplungsanalysen kartierten den MCDR1-Lokus auf den langen Arm von Chromosom 6 in den Bereich 6q14q16.2 (SMALL *et al.* 1992b; SMALL *et al.* 1997). Aufgrund des gemeinsamen Vorkommens in separaten Zweigen einer großen Familie, geht man davon aus, dass die zentral areoläre Pigmentepitheldystrophie (CAPED), trotz phänotypischer Unterschiede, eine allelische Form der NCMD darstellt. Die NCMD wurde erstmals in einer einzigen großen, nordamerikanischen Familie mit irischer Abstammung beschrieben. Mittlerweile konnte sie jedoch auch in weiteren Familien unterschiedlicher ethnischer und geographischer Regionen, wie z.B. England, Frankreich, Spanien, Belize und Mexiko nachgewiesen werden (SMALL *et al.* 1997). Die in dieser Arbeit untersuchten zwei Familien L und A sind die ersten bekannten NCMD-Familien mit deutscher Abstammung. Die ebenfalls analysierte deutsche CAPED-Familie W wurde zwar bereits klinisch beschrieben (KÄSMANN *et al.* 1992), die chromosomale Lokalisation des zugrundeliegenden Gendefekts und dessen Verhältnis zur NCMD war jedoch noch ungeklärt.

Die Ergebnisse der Kopplungsanalysen mit 12 polymorphen DNA-Markern aus dem Bereich des MCDR1-Lokus auf Chromosom 6q14-q16.2 zeigen, dass in allen drei untersuchten NCMD/CAPED-Familien eine signifikante Kopplung zu diesem Krankheitslokus besteht (Tabelle 6). Damit konnte die klinische Diagnose einer NCMD/CAPED erstmals in deutschen Familien genetisch nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde damit die genetische Homogenität dieser Erkrankung bestätigt. Da auch die CAPED-Familie mit dem MCDR1-Lokus gekoppelt war, konnten frühere Ergebnisse nach denen NCMD und CAPED allelische Erkrankungen darstellen sollen, weiter bestätigt werden (SMALL *et al.* 1992a).

Eine Einengung der durch die Kopplungsanalyse ermittelten Kandidatengenregion von über 40 cM auf knapp 10 cM gelang mit Hilfe von neun zusätzlichen polymorphen DNA-Markern. Diese flankieren die Kandidatenregion distal zwischen den Markern D6S252 und D6S286, und proximal zwischen D6S283 und dem Marker D6S262 (Abbildung 15). Bei allen drei Familien konnten weitere Rekombinationsereignisse auf der proximalen Seite identifiziert werden, wobei die nicht-betroffene Person III/4 aus Familie W bereits am Marker D6S301 rekombinierte und damit die kritische Region auf der proximalen Seite um fast 19 cM verkleinert werden konnte. Auf der distalen Seite der Kandidatenregion trug lediglich die betroffene Person III/5 aus Familie W zur weiteren Eingrenzung bei. Sie trug ab dem Marker D6S417 den nicht-betroffenen Haplotyp. Dies führte zur Verschiebung der distalen Grenze um mehr als 11 cM. Trotz der relativ geringen Anzahl verfügbarer Familienmitglieder, trug

Familie W am meisten zur Verfeinerung des MCDR1-Lokus bei. Möglicherweise könnte die Untersuchung weiterer Mitglieder dieser Familie zu einer weiteren Eingrenzung beitragen.

Da NCMD in Deutschland eine extrem seltene Erkrankung darstellt, lag die Vermutung nahe, dass die drei NCMD/CAPED-Familien trotz negativer Stammbaumanalysen, einen gemeinsamen Vorfahren besitzen. Tatsächlich konnte durch die Genotypisierung am Locus D6S475, ein in der Allgemeinbevölkerung sehr seltenes Allel identifiziert werden, das in zwei (L und A) der drei Familien mit der Erkrankung segregierte. Darüber hinaus wurde mit Hilfe weiterer Haplotyp-Analysen eine enge Assoziation zwischen der NCMD und weiteren Allelen in unmittelbarer Nachbarschaft zu D6S475 nachgewiesen. So haben die beiden Familien L und A den krankheitsassoziierten Haplotypen 5-2-10-4 (D6S1716, D6S1717, D6S475 und D6S1543) gemeinsam. Da die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten dieses Haplotypen in der Bevölkerung nur  $1,5 \times 10^{-4}$  beträgt, ergibt sich die Wahrscheinlichkeit von 99,9%, dass die Familien L und A einen gemeinsamen Vorfahren besitzen. Basierend auf einem Signifikanz-Niveau von 5% ist dieses Ergebnis hochsignifikant. Ein etwas anderes Bild ergibt sich, wenn man den gemeinsamen Haplotypen 2-5-2 (D6S249, D6S1716 und D6S1717) der Familien A und W betrachtet. Mit einer Wahrscheinlichkeit von  $4,6 \times 10^{-2}$  tritt dieser Haplotyp auch in der Normalbevölkerung auf was dazu führt, dass mit 91,5% die Wahrscheinlichkeit einer gemeinsamen Abstammung der Familien A und W nicht signifikant ist. Betrachtet man dagegen den allen drei Familien gemeinsamen Haplotypen 5-2 (D6S1716 und D6S1717) ergibt sich eine Wahrscheinlichkeit von 95,5%, dass dieser Haplotyp nicht das Ergebnis eines zufälligen Ereignisses ist, sondern aufgrund eines ancestralen Vorfahren vererbt wurde. Wenn dieser statistisch ermittelte *core*-Haplotyp korrekt ist, dann kann auf diese Weise der Kandidatengenbereich auf 3,2 cM verfeinert werden und wird nun von den Markern D6S249 und D6S475 flankiert. Die Analyse weiterer hochpolymorpher DNA-Marker innerhalb oder in unmittelbarer Nähe dieses Intervalls könnte es ermöglichen, den chromosomalen Bereich des *core*-Haplotypen zu festigen. Allerdings ist deren Auswahl in den verfügbaren genetischen Karten sehr beschränkt, so dass zunächst versucht werden müsste, neue polymorphe Mikrosatellitenmarker selbst zu identifizieren. Hierzu werden wiederum genomische Klone aus dem Bereich des MCDR1-Lokus benötigt, welche mittlerweile aufgrund der Anstrengungen des Human Genom Projektes in zunehmendem Maße verfügbar sind. Die rasant fortschreitende Sequenzierung dieser chromosomalen Abschnitte wird die Identifikation polymorpher Sequenzen weiter vereinfachen.

### **X-gebundene juvenile Retinoschisis**

Die X-gebundene juvenile Retinoschisis ist eine relativ seltene Makuladegeneration von der nur Jungen betroffen sind. Sie äußert sich phänotypisch als foveale, radspeichenartige Schisis im Bereich der Nervenfaserschicht. Umfangreiche Kopplungsanalysen kartierten das

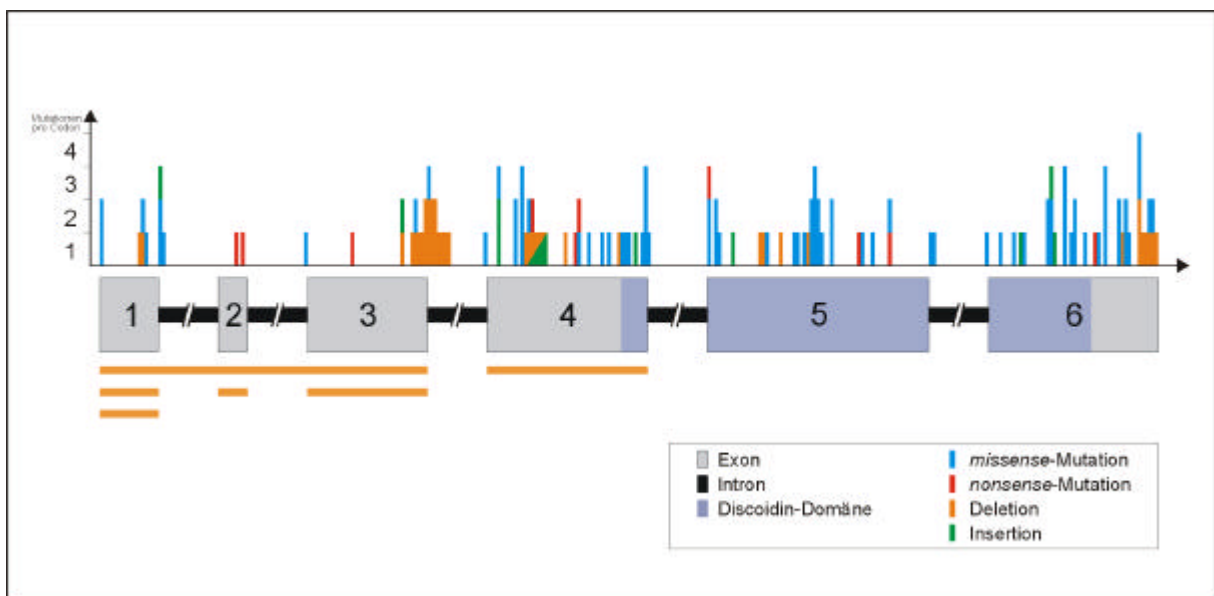
zugrunde liegende Gen in den Bereich Xp22.2 auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms zwischen die polymorphen DNA-Marker DXS418 und DXS999 (IVES *et al.* 1970; WIEACKER *et al.* 1983; ALITALO *et al.* 1987; WEBER *et al.* 1995; VAN DE VOSSE *et al.* 1996; HUOPANIEMI *et al.* 1997). Diese von mehreren YAC-Klonen repräsentierte Kandidatenregion wurde zunächst in einen *contig* aus überlappenden PAC-Klonen umgewandelt. Mit Hilfe der vom *Sanger Centre*<sup>35</sup> veröffentlichten PAC-Klone gelang die Vervollständigung des *contigs*, v.a. im distalen Bereich des Kandidatenintervalls. Dabei zeigte sich, dass dieser Abschnitt in dem zur Verfügung stehenden Segment RPCI1 der RPCI-PAC-Bank stark unterrepräsentiert war.

Die computergestützte Analyse von EST-Datenbanken führte schließlich zur Identifizierung einer retinalen cDNA-Sequenz (RS1), die innerhalb der Kandidatenregion, etwa 130 kb von der proximalen Grenze (DXS999) entfernt lag. Das Transkript von RS1 war retinaspezifisch und konnte in keinem anderen der untersuchten Gewebe nachgewiesen werden. Dies ließ eine zellspezifische Expression in der sensorischen Neuroretina vermuten. Die Untersuchung der Transkription des murinen Orthologs *Rs1h* in der Retina bestätigten dies. Durch Northern Blot Analyse wurde gezeigt, dass die Expression des *Rs1h*-Transkriptes zwischen dem dritten und elften postnatalen Tag beginnt. Mit Hilfe von RT-PCR Analysen wurde der Expressionsbeginn auf den postnatalen Tag P5 (REID *et al.* 1999), bzw. P3 (A. Gehrig, persönliche Mitteilung) festgelegt. Bemerkenswerterweise beginnt die Expression von *Rs1h* etwa zur gleichen Zeit wie die Genese der Photorezeptoren. Daraus lässt sich schließen, dass diese beiden Ereignisse in engem Zusammenhang stehen. Tatsächlich wurde durch die RT-PCR-Analyse mit *rd*-Mauslinien eine vornehmliche Expression in den Photorezeptoren gezeigt. Doch auch andere Zelltypen scheinen das *Rs1h*-Transkript zu exprimieren, wie das schwache PCR-Produkt bei der photorezeptorlosen *rd/rd* Maus zeigt (Abbildung 22e). Im Northern Blot ist die *Rs1h* mRNA bei der homozygoten *rd*-Maus nicht nachweisbar (Abbildung 23), was vermutlich in der geringeren Sensitivität der Methode begründet liegt. Die bei der RNA *in situ*-Hybridisierung gefundene Verteilung des *Rs1h*-Transkriptes in der äußeren und inneren Körnerschicht, sowie in der Ganglienzellschicht scheint mit den Resultaten der RT-PCR übereinzustimmen. Die Ergebnisse von RNA *in situ*-Hybridisierungen anderer Arbeitsgruppen zeigen jedoch ein anderes Expressionsmuster (REID *et al.* 1999; GRAYSON *et al.* 2000). Dort finden sich die Hybridisierungssignale ausschließlich in den inneren Segmenten der Photorezeptoren und in der äußeren Körnerschicht. Möglicherweise war die Spezifität der verwendeten Hybridisierungssonde nicht ausreichend, was jedoch unwahrscheinlich erscheint, da die verwendete Probe der bei der RT-PCR Analyse amplifizierten Sequenz entspricht. Die Ergebnisse der verwendeten Positiv- (Opsin *antisense*) und Negativkontrolle (*Rs1h sense*) zeigen jedoch, dass sich die Ursache der unspezifischen Hybridisierung nicht auf das verwendete Hybridisierungsprotokoll zurückführen lässt.

---

<sup>35</sup> <http://www.sanger.ac.uk>

Die Mutationsanalyse von *RS1* konnte in allen zur Verfügung stehenden RS-Familien eine spezifische Sequenzveränderung nachweisen (Tabelle 10). Damit wurde gezeigt, dass Mutationen in *RS1* zur Retinoschisis führen. Mittlerweile konnten bereits 124 verschiedene Mutationen im *RS1*-Gen nachgewiesen werden (Abbildung 43; DUVAL *et al.* 1999; GEHRIG *et al.* 1999b; GEHRIG *et al.* 1999c; HIROKA *et al.* 2000; HIRIYANNA *et al.* 1999; HUOPANIEMI *et al.* 1999; INOUE *et al.* 2000; MASHIMA *et al.* 1999; MENDOZA-LONDONO *et al.* 1999; PARK *et al.* 2000; RODRIGUEZ *et al.* 1998; SAUER *et al.* 1997; SHASTRY *et al.* 1999; SHINODA *et al.* 1999; SIEVING *et al.* 1999; TAKETANI *et al.* 1999; THE RETINOSCHISIS CONSORTIUM 1998). Diese decken das ganze Spektrum üblicher Mutationen ab und umfassen 68 (57,6%) *missense*-, 10 (8,5%) *nonsense*- und 10 (8,5%) Spleißstellen-Mutationen, sowie 21 (17,8%) kleinere intragenische Deletionen bzw. Insertionen und 9 (7,6%) größere Deletionen (RetinoschisisDB<sup>36</sup>). Damit wurde der kausale Zusammenhang zwischen Sequenzveränderungen im *RS1*-Gen und dem Krankheitsbild der Retinoschisis bestätigt. Die Mehrzahl der beobachteten Mutationen ist darüber hinaus im Bereich der konservierten Discoidin-Domäne lokalisiert, was die Bedeutung dieses Motivs für die Funktion des *RS1*-Proteins unterstreicht.



**Abb. 43: Lokalisierung der bisher identifizierten *RS1*-Mutationen.**

Darstellung der sechs Exone des *RS1*-Gens und Verteilung der bisher beschriebenen 124 verschiedenen Mutationen. Die Lokalisierung der einzelnen Mutationen bezieht sich auf das jeweils betroffene Codon und ist maßstabsgetreu über dem Gen angegeben. Größere Deletionen sind als orange waagrechte Balken unter der schematischen Genstruktur dargestellt. Exone sind als graue Vierecke, intronische Sequenzen sind als schwarze Balken dargestellt. Die konservierte Discoidin-Domäne (Codons 101-203) ist blaugrau hervorgehoben. Die Größe der Exone ist maßstabsgetreu. *Missense*-Mutationen sind als blaue, *nonsense*-Mutationen als rote, Deletionen als orange und Insertionen als grüne Striche dargestellt.

<sup>36</sup> <http://www.dmd.nl/rs/rshome.html>

Die Discoidin-Domäne wurde im C-terminalen Bereich der vorhergesagten Proteinsequenz von RS1 identifiziert. Dieses Motiv findet sich in vielen Proteinen einer ganzen Reihe verschiedener Spezies, von *Dictyostelium discoideum* bis *Homo sapiens*. Der genaue Funktionsmechanismus der Discoidin-Domäne ist bislang nicht bekannt. Man geht jedoch davon aus, dass sie an der Bindung von Kohlenhydratresten an Zelloberflächen, sowie an Protein-Protein Interaktionen beteiligt ist (BAUMGARTNER *et al.* 1998). In einer detaillierten Untersuchung des RS1-Proteins konnte gezeigt werden, dass RS1 unter disulfidreduzierenden Bedingungen als ein 24 kDa großes Protein in der Membranfraktion von Retinahomogenaten nachgewiesen werden kann (MOLDAY *et al.* 2001). Diese Größe stimmt sehr gut mit dem berechneten Molekulargewicht von 23 kDa überein. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen wurde jedoch ein über 95 kDa großes Protein mit SDS-PAGE (*polyacrylamide gel electrophoresis*) nachgewiesen. Möglicherweise sind die zehn Cysteinreste des RS1-Proteins unter den oxidierenden Bedingungen, wie sie auch im Lumen des endoplasmatischen Retikulums, bzw. im extrazellulären Raum herrschen, an der Ausbildung von inter- und intrazellulären Disulfidbrücken beteiligt und führen möglicherweise zum Zusammenschluss von RS1-Proteinen zu einem oligomeren Proteinkomplex. Die genaue Zusammensetzung eines solchen RS1-Komplexes ist jedoch noch nicht bekannt. In der gleichen Studie wurde die bereits aufgrund der Proteinsequenz vorhergesagte Sekretion von RS1 nachgewiesen (MOLDAY *et al.* 2001). Durch immunohistochemische Untersuchungen mit einem gegen den N-Terminus von RS1 gerichteten polyklonalen Antikörper wurde gezeigt, dass das RS1-Protein, analog zur mRNA, hauptsächlich mit den inneren Segmenten der Photorezeptoren assoziiert ist. Darüber hinaus konnte das Protein in der inneren Körnerschicht, genauer an Bipolarzellen, nachgewiesen werden. In einer anderen Untersuchung wurde das Protein neben den inneren Segmenten der Photorezeptoren auch in Müllerzellen, Ganglienzellen und anderen nicht näher spezifizierten Zellen der inneren Retina nachgewiesen (GRAYSON *et al.* 2000). Allerdings erscheint dabei die Spezifität des verwendeten Antikörpers zweifelhaft, da dieser im Western-Blot neben der RS1-Bande weitere unspezifische Banden markierte.

Auf eine Funktion des RS1-Proteins in der inneren Körnerschicht deuten auch die Ergebnisse einer ersten histologischen Untersuchung, an den Augen von RS1-*knock out*-Mäusen, hin (B. Weber, persönliche Mitteilung). Bei diesen Tieren wurden die Exone vier bis sechs deletiert, was bei hemizygoten Männchen zu einem verkürzten Protein ohne die funktionell bedeutsame Discoidin-Domäne führt. In etwa zwei Wochen alten hemizygoten Tieren beginnt in der inneren Körnerschicht eine zunehmende Auflösung des Zellverbandes, wobei eine schwammartige Struktur entsteht. Diese degenerativen Vorgänge sind bei vier Wochen alten Mäusen auch im Bereich der äußeren Körnerschicht sichtbar. Ophthalmoskopisch äußern sich diese histologischen Veränderungen als gleichmäßig über die Retina verteilte blasenartige Strukturen, die sehr stark dem Phänotyp der humanen Retinoschisis ähneln.

Damit stellt die *RS1-knock out*-Maus ein ideales Tiermodell zur weiteren Erforschung dieser retinalen Erkrankung dar und dient somit möglicherweise dazu die genauen Pathomechanismen, die zur Auslösung einer Netzhautdegeneration führen, aufzuklären. Darüber hinaus eröffnen sich dadurch neue Möglichkeiten zur detaillierten Untersuchung von pharmazeutischen und genetischen Therapiemaßnahmen.

## **Radiäre Drusen**

Der Begriff radiäre Drusen fasst eine Reihe von Netzhauterkrankungen zusammen, die durch das Auftreten radiär angeordneter weißlicher Flecken, sogenannter Drusen, im Bereich der Makula gekennzeichnet sind. Der Krankheitslokus wurde durch Kopplungsanalysen in einer großen Familie mit Doynescher Honigwaben Dystrophie (DHRD) auf den kurzen Arm von Chromosom 2 in die Bande 2p16 kartiert (GREGORY *et al.* 1996). Die ursprüngliche, nach neueren Genkarten 3,8 cM große Kandidatenregion, wurde mit Hilfe zweier neuer rekombinanter Mitglieder der DHRD-Familie auf etwa 1 cM eingengt. Diese werden von den DNA-Markern D2S2352 und D2S2251 flankiert (KERMANI *et al.* 1999). Die physikalische Größe dieser Region wurde auf etwa 700 kb geschätzt und diente als Ausgangspunkt für die Klonierung des, den radiären Drusen zugrunde liegenden, Gens. Abweichungen zwischen den bereits veröffentlichten genetischen und physikalischen Karten der Kandidatenregion erforderte zunächst die genaue Bestimmung der Anordnung der DNA-Marker bzw. YAC-Klone. Dies geschah unter Zuhilfenahme weiterer STS-Marker, die mit der RH-(*radiation hybrid*) Kartierungsmethode in den Bereich der Kandidatenregion kartiert wurden<sup>37</sup>. Dabei stellte sich heraus, dass die Auflösung der RH-Karte oft ungenau ist und viele STS-Marker an die falsche Position kartiert wurden. Auch die tatsächliche Anordnung der YAC-Klone wich zum Teil erheblich von den bereits publizierten Karten ab<sup>38</sup>. Der schließlich erstellte YAC-*contig* zeigte, dass vier YAC-Klone (753\_H\_1, 769\_G\_5, 806\_C\_12 und 929\_A\_8) die minimale Kandidatenregion vollständig überspannen (Abbildung 24a). Die anhand des YAC-*contigs* kartierten STS-Marker dienten als Ausgangspunkt für die Isolierung von PAC-Klonen, welche die Grundlage für die Isolierung von potentiellen Kandidatengen bilden sollten.

Unter den aus EST-Sequenzen generierten STS-Markern der RH-Karte befand sich mit SGC31133 bereits ein sehr aussichtsreicher Kandidat. Die inmitten der kritischen Region liegende Sequenz wurde von drei identischen EST-Klonen repräsentiert, die aus einer retinalen cDNA-Bank isoliert wurden. Mit Hilfe von Northern Blot und RT-PCR Analysen konnte eine Expression in neuronalen Geweben wie Cerebellum, Hirnstamm und Retina nachgewiesen werden (Abbildung 26). Aufgrund dieses Expressionsprofils und einem

---

<sup>37</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap98>

<sup>38</sup> <http://www-genome.wi.mit.edu>



theoretischen Molekulargewicht des Genproduktes von etwa 60 kDa wurde dieses Gen als *pNEU60* (*protein, neuronal, 60 kDa*) bezeichnet. Ausgehend von der detektierten Transkriptgröße von 6,6 kb, bei einer 5'-UTR von 232 bp und einem codierenden Bereich von 1623 bp war davon auszugehen, dass *pNEU60* eine sehr große 3'-UTR von etwa 4,75 kb besitzt. Dies konnte, durch die Hybridisierung mit einer etwa 2,3 kb strangabwärts vom Stoppcodon liegenden Sonde, bestätigt werden.

Bei der Analyse des räumlichen Expressionsprofils von *pNEU60* in der Retina mit Hilfe von RNA *in situ*-Hybridisierungen an Mäusaugen wurde eine Expression in der äußeren (ONL) und inneren (INL) Körnerschicht und in der Ganglienzellschicht (GCL) gefunden (Abbildung 31). Diese Zellschichten beinhalten die Zellkörper der Photorezeptoren, der Horizontal-, Bipolar- und amakrinen Zellen, sowie der Ganglienzellen, was auf eine mögliche Beteiligung von *pNEU60* am neuronalen Kreislauf der Photorezeption hindeuten könnte. Dieses Hybridisierungsergebnis steht jedoch im Widerspruch zu den Ergebnissen von TARTELLIN *et al.* (1999). Dort wurde bei RNA *in situ*-Hybridisierungen an menschlichen Augen, Signale in den perivaskulären Zellen der Ganglienzellschicht, welche die retinalen Arteriolen umschließen, detektiert. Erstaunlicherweise ergab die Hybridisierung der gleichen RNA-Probe auf Mäusaugen ein anderes Expressionsprofil. In diesem Fall wurde die Sonde an den inneren Segmenten der Photorezeptoren und in der äußeren Körnerschicht nachgewiesen. Die dabei verwendete 450 bp lange Hybridisierungsprobe wurde aus dem 3'-Ende des codierenden Bereichs von *pNEU60* gewonnen. Eine mögliche Begründung für das abweichende Hybridisierungsmuster sehen die Autoren darin, dass der 3'-Bereich im murinen Ortholog zu *pNEU60* evtl. nur geringe Übereinstimmungen mit der humanen Sequenz besitzt und damit die Hybridisierung im Mausauge unspezifisch ist (TARTELLIN *et al.* 1999). Die in dieser Arbeit verwendete Sonde umfasste den vollständigen 1623 bp großen codierenden Bereich von *pNEU60*, sowie 213 bp der 5'-UTR und 222 bp der 3'-UTR. Es erscheint wahrscheinlicher, dass die nicht-translatierten Bereiche der Sonde an unspezifische Sequenzen binden. Denkbar wäre auch, dass die für die sieben Transmembrandomänen codierenden Bereiche, innerhalb der Proteinfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPRS) so stark konserviert sind, dass die verwendete Sonde auch unspezifisch an andere Familienmitglieder hybridisieren kann. Allerdings steht dies im Widerspruch zu den durchgeführten BLAST-Analysen, bei denen nur schwache Sequenzübereinstimmungen mit anderen GPRs gefunden wurden.

Zusätzlich zu den strukturellen Übereinstimmungen mit GPRs, besitzt *pNEU60* eine Glykosilierungsstelle (Asn2-Ser3-Thr4-Gly5), deren Konsensussequenz (Asn-X-Ser/Thr) am N-terminalen Ende nahezu aller G-Protein gekoppelten Rezeptoren zu finden ist (STRADER *et al.* 1994). Die Mitglieder dieser Superfamilie von Membranproteinen, von denen Rhodopsin als erstes nachgewiesen wurde (NATHANS & HOGNESS 1983), vermitteln

Signaltransduktion und sind in verschiedene hereditäre und sporadische Erkrankungen involviert (zusammengefasst bei STRADER *et al.* 1994). Nachdem pNEU60 unabhängig von einer englischen Forschergruppe kloniert worden war (TARTELIN *et al.* 1999), wurde das Protein vom Nomenklatur-Komitee<sup>39</sup> des Human Genom Projektes offiziell als GPR75 bezeichnet.

Keine Sequenzveränderungen wurden bei der Mutationsanalyse von *GPR75* in betroffenen Mitgliedern von zwei MLVT-Familien, einer DHRD-Familie sowie 14 Personen mit sporadischen radiären Drusen gefunden. Somit konnte *GPR75* als krankheitsverursachendes Gen bei familiär und sporadisch auftretenden radiären Drusen ausgeschlossen werden. Dabei gilt jedoch zu beachten, dass die hier verwendeten Analysemethoden alle auf der PCR-Technik basierten, mit welcher naturgemäß einige Mutationstypen nicht nachgewiesen werden können. Konkret wären, mit dem hier gewählten Ansatz, Veränderungen im Promotor oder anderen regulatorischen Sequenzen, große Insertionen oder Deletionen, Genrearrangements, sowie intronische Veränderungen außerhalb der Akzeptor- und Donorspleißstellen nicht nachweisbar. Allerdings lassen sich damit bestenfalls einige wenige verpasste Sequenzvarianten erklären, wenn man nicht davon ausgehen kann, dass alle Patienten eine nicht identifizierte *founder*-Mutation tragen. Dagegen spricht jedoch die Anzahl der untersuchten Patienten und v.a. die 14 nicht-verwandten Personen mit sporadischen radiären Drusen. Unterstützt wird das Resultat der Mutationsanalyse durch die Ergebnisse einer unabhängigen Studie, bei der ebenfalls keine Assoziation dieses Gens mit der DHRD nachgewiesen werden konnte (TARTELIN *et al.* 1999).

Aufgrund der potentiellen Funktion von GPR75 als G-Protein gekoppelter Rezeptor in der Retina wurde das zugrunde liegende Gen als Kandidat für eine mögliche Assoziation mit dem AMD-Phänotyp angesehen. Daher wurden in Zusammenarbeit mit der Gruppe um R. Allikmets, Columbia University, New York, USA, 270 AMD-Patienten aus Deutschland und den USA, sowie 213 Kontrollpersonen aus diesen Ländern einer Mutationsanalyse im *GPR75*-Gen unterzogen (Tabelle 16; SAUER *et al.*, eingereicht). Zusätzlich zu den fünf Sequenzvarianten (-30A>C, 150G>A, 234C>G, 346G>A und 700C>T) die bereits bei den deutschen AMD-Patienten identifiziert wurden (Tabelle 12), konnten zwei weitere Veränderungen (-4G>A und 323G>C) in jeweils nur einem US-Patienten nachgewiesen werden. Da die meisten der gefundenen Sequenzveränderungen in den Amplicons 1 und 2 gefunden werden konnten, wurden diese zusätzlich in 263 AMD-Patienten und 36 Kontrollen aus den USA und Italien untersucht. Dabei wurden zwei weitere Sequenzvarianten in jeweils einem AMD-Patienten identifiziert. Die Substitution eines Cytosinrestes durch einen Thymidinrest an der Nukleotidposition 296 verursacht den Austausch eines Prolins gegen ein Leucin im Codon 99. Durch die Transversion eines

<sup>39</sup> <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/>

Adeninrestes in einen Cytosinrest an der Nukleotidposition 403 wurde im Codon 135 ein Threonin durch ein Prolin ersetzt.

**Tab. 16: Gefundene Sequenzvarianten in GPR75 bei 270 AMD-Patienten und 213 Kontrollen aus Deutschland und den USA.**

Amplicon	Veränderung		Allelfrequenz (D)		Allelfrequenz (USA)	
	Nukleotid	Aminosäure	Patienten (n=396)	Kontrollen (n=202)	Patienten (n=144)	Kontrollen (n=224)
1	-30A>C	-	27 (6,8%)	14 (6,9%)	13 (9,0%)	13 (5,8%)
1	-4G>A	-	0	0	1 (0,7%)	0
1	150G>A	A50A	1 (0,3%)	0	1 (0,7%)	1 (0,5%)
2	234C>G	N78K	1 (0,3%)	0	0	0
2	323G>C	S108T	0	0	1 (0,7%)	0
2	346G>A	A116T	5 (1,3%)	2 (1,0%)	2 (1,4%)	3 (1,3%)
3	700C>T	Q234X	1 (0,3%)	0	0	0

Damit konnten insgesamt neun verschiedene Sequenzänderungen identifiziert werden, wobei drei wahrscheinlich Polymorphismen darstellen. Zwei dieser polymorphen Veränderungen (-30A>C und 346G>A) konnten bei etwa gleicher Frequenz in AMD-Patienten und Kontrollen gefunden werden. Bei der dritten Variante (150G>A), die bei drei AMD-Patienten und einer Kontrollperson detektiert wurde, konnte mit Hilfe eines *exon trapping*-Systems ausgeschlossen werden, dass durch die stille Sequenzvariante eine kryptische Spleißstelle entsteht. Die bei einem einzelnen AMD-Patienten aus den USA gefundene Veränderung -4G>A liegt in der Nähe des ATG-Startcodons. Dabei wird der ohnehin vorhandene schwache Kontext zur Kozak Konsensussequenz nicht wesentlich verändert (KOZAK 1987). Die verbleibenden fünf Sequenzveränderungen (N78K, P99L, S108T, T135P und Q234X) wurden jeweils in einem einzigen AMD-Patienten gefunden und könnten möglicherweise einen negativen Effekt auf die Funktion des GPR75-Proteins haben. Alle diese Varianten befinden sich entweder innerhalb bzw. in unmittelbarer Nähe der sieben Transmembrandomänen, oder in Bereichen, welche möglicherweise an der Bindung von Liganden, oder an der Aktivierung von G-Proteinen in anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren, beteiligt sind (STRADER *et al.* 1994). Die beiden *missense*-Mutationen P99L und T135P könnten einen negativen Einfluss auf die dreidimensionale Struktur und damit die Funktion des GPR75-Proteins ausüben, da Prolin für die Einführung von Biegungen in Polypeptidketten verantwortlich ist. Die *nonsense*-Mutation Q234X liegt schließlich innerhalb der großen intrazellulären Schleife zwischen den Transmembrandomänen V und VI und führt zur Deletion dieser Schleife, zweier Transmembrandomänen und dem gesamten C-Terminus. Die Untersuchung der DNA von vier nicht-betroffenen Söhnen (Alter 36 bis 48 Jahre) des AMD-Patienten mit der Q234X Mutation ergab, dass einer ebenfalls die Veränderung trug, jedoch bei einem Alter von 47 Jahren klinisch unauffällig war.

Die Frequenz der potentiellen Mutationen in AMD-Patienten (5/533) unterscheidet sich statistisch nicht von der in der Kontrollgruppe (0/249). Trotz der fehlenden statistischen Signifikanz kann nicht ausgeschlossen werden, dass einige der gefundenen GPR75-Mutationen tatsächlich mit der AMD assoziiert sind. Andererseits könnten die GPR75-Mutationen eine Netzhauterkrankung mit einem der AMD-ähnlichen Phänotypen verursachen. Die klinischen Untersuchungen der vier AMD-Patienten mit den nicht-konservativen Aminosäureveränderungen (N78K, P99L, T135P) bzw. der Stoppmutation (Q234X) zeigten, dass diese Patienten ausgedehnte weiche Drusen, RPE-Abhebungen und disziforme Degenerationen der Makula besaßen. Dagegen hatte der AMD-Patient mit der konservativen Aminosäuresubstitution (S108T) eine geographische Atrophie, sowie eine positive Familienanamnese für AMD. Falls Mutationen in *GPR75* mit einer der AMD ähnlichen Netzhauterkrankung assoziiert sind, so hätte diese ein ähnliches Erkrankungsalter wie AMD. Denn bei den vier Patienten mit den potentiellen Mutationen in *GPR75* lag der Beginn der Erkrankung zwischen dem 63. und 85. Lebensjahr und der 47-jährige Sohn des AMD-Patienten mit der Q234X Mutation zeigte zu diesem Zeitpunkt keine Veränderungen der Retina.

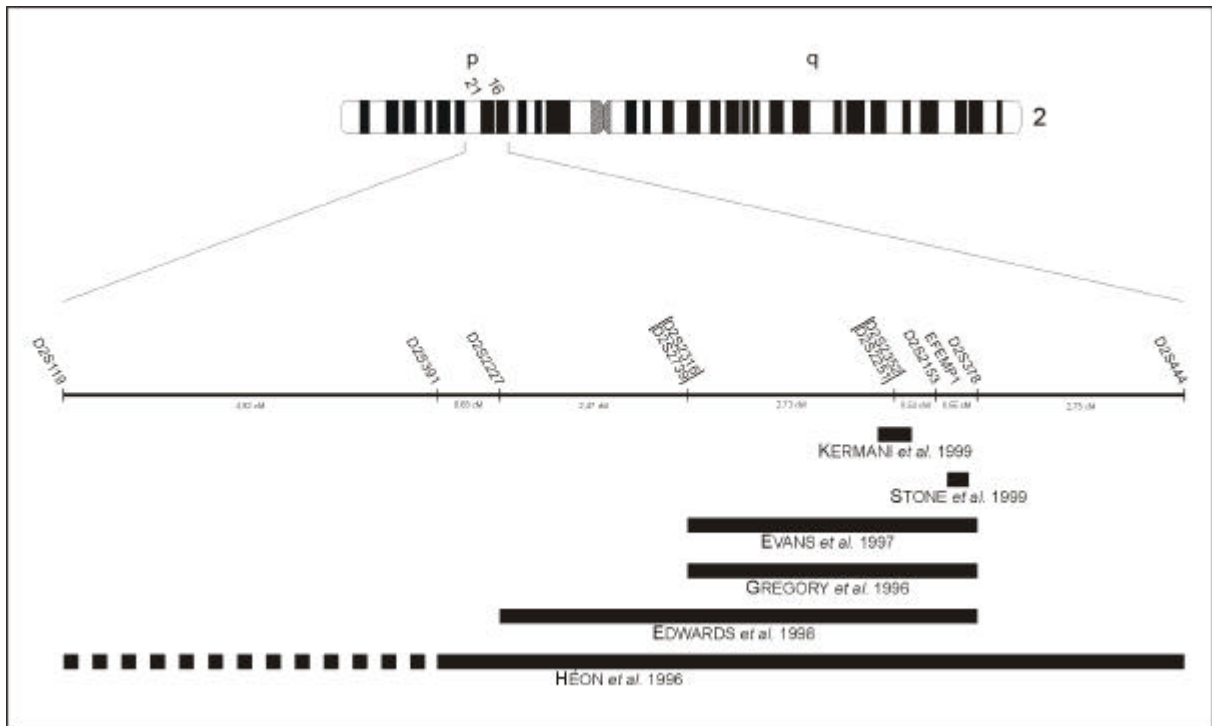
Die Ergebnisse der Mutationsanalyse sind somit vergleichbar mit anderen Studien an AMD-Patienten, z.B. im *VMD2*-Gen, bei denen ähnlich niedrige Mutationsfrequenzen von 1% bis 1,5% gefunden wurden (ALLIKMETS *et al.* 1999, KRÄMER *et al.* 2000, LOTERY *et al.* 2000). Obwohl die gefundenen Sequenzvarianten in *GPR75* scheinbar keinen entscheidenden Beitrag zur Prädisposition für AMD leisten, müssen sicherlich wesentlich mehr AMD-Patienten und Kontrollen untersucht werden, um zu einer statistisch abgesicherten Aussage bezüglich einer möglichen Assoziation zwischen Veränderungen in *GPR75* und AMD zu gelangen. Nur so können die schwachen Effekte eines solchen Gens, in einer komplexen Erkrankung wie AMD nachgewiesen werden. Die Notwendigkeit einer sehr großen Untersuchungsgruppe, mit mehr als 1000 AMD-Patienten und ebenso vieler Kontrollen, für die statistisch gesicherte Annahme oder Ablehnung einer Assoziationshypothese zeigte auch die Analyse des *ABCA4*-Gens in AMD-Patienten (zusammengefasst bei ALLIKMETS 2000).

Die Klonierung der minimalen Kandidatenregion für DHRD/MLVT zwischen den DNA-Markern D2S2352 und D2S2251 in überlappende PAC-Klone wurde mit Hilfe der STS-Marker aus GeneMap'98<sup>40</sup> durchgeführt. Durch die Klonierung von EFEMP1 und dessen Assoziation mit DHRD/MLVT (STONE *et al.* 1999) wurde die weitere Erarbeitung eines PAC-*contigs* obsolet und daher eingestellt. Dieser blieb deshalb unvollständig (Abbildung 24a). Überraschenderweise lag EFEMP1 fast 1 cM proximal zur Kandidatenregion die von KERMANI *et al.* (1999) publiziert wurde. Abbildung 44 verdeutlicht die

---

<sup>40</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap98/>

unterschiedliche Lokalisierung der beiden minimalen Intervalle nach KERMANI *et al.* (1999) und STONE *et al.* (1999).



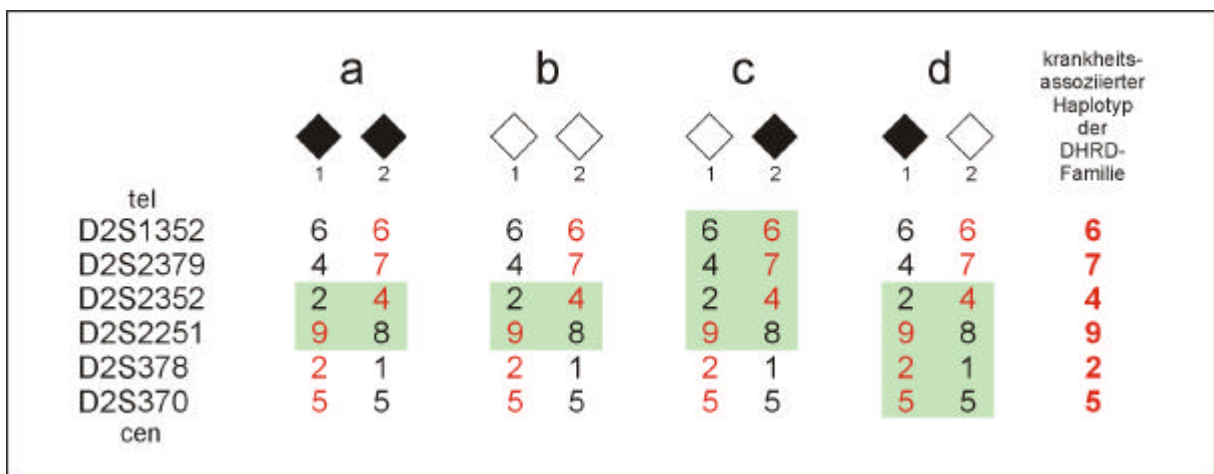
**Abb. 44: Verfeinerung der Kandidatenregion für DHRD und MLVT.**

Die minimalen krankheitsassoziierten Haplotypen sind jeweils als schwarze waagrechte Balken angegeben. Die von HÉON *et al.* (1996) bestimmte distale Grenze D2S1761 liegt zwischen den beiden Markern D2S119 und D2S391. Da die genaue Lage von D2S1761 jedoch nicht bekannt ist, wurde der krankheitsassoziierte Haplotyp distal von D2S391 als unterbrochener Balken dargestellt. Der von KERMANI *et al.* (1999) bestimmte Krankheitslokus liegt zwischen den Markern D2S2352 und D2S2251, die nach der hier verwendeten Karte keinen Abstand besitzen. Das von STONE *et al.* (1999) bestimmte minimale Kandidatenintervall liegt innerhalb der Marker DS2153 und D2S378, wird von diesen jedoch nicht unmittelbar begrenzt. Die Anordnung der DNA-Marker und deren genetischen Abstände wurde vom *Center for Medical Genetics*<sup>41</sup>, Marshfield, USA übernommen und ist maßstabsgetreu dargestellt.

Die Eingrenzung der DHRD-Kandidatenregion zwischen die DNA-Marker D2S2352 und D2S2251 durch KERMANI *et al.* (1999), erfolgte mit Hilfe von zwei neuen Mitgliedern der ursprünglichen DHRD-Familie (GREGORY *et al.* 1996). Dabei wurden die Haplotypen der beiden neuen Familienmitglieder mit dem krankheitsassoziierten Haplotyp der DHRD-Familie verglichen (Abbildung 45). Es zeigte sich, dass bei beiden Personen eine Rekombination zwischen den Markern D2S2352 und D2S2251 stattgefunden hatte. Der krankheitsassoziierte Haplotyp der DHRD-Familie wurde von Person 1 an den Markern D2S2251, D2S378 und D2S370 geteilt. Der Haplotyp von Person 2 stimmte für die DNA-Marker D2S2352, D2S2379 und D2S1352 mit dem betroffenen DHRD-Haplotypen überein. Geht man davon aus, dass beide Personen, wie bei KERMANI *et al.* (1999) beschrieben, betroffen sind, so liegt die Kandidatenregion damit zwischen den Markern D2S2352 und D2S2251 (Abbildung 45a). Wenn beide Personen nicht-betroffen wären, würde der Genlokus

<sup>41</sup> <http://research.marshfieldclinic.org/genetics/>

ebenfalls von D2S2352 und D2S2251 flankiert werden (Abbildung 45b). Besitzen diese beiden Personen jedoch einen unterschiedlichen Krankheitsstatus, d.h. eine Person ist betroffen während die andere Person nicht-betroffen ist, so hätte dies erhebliche Auswirkungen auf die Lokalisierung der Kandidatenregion. Unter der Annahme, dass z.B. Person 1 klinisch unauffällig wäre, während Person 2 den DHRD-Phänotypen besäße, würde die Kandidatenregion nur noch auf der proximalen Seite von D2S2251 begrenzt werden (Abbildung 45c). Im umgekehrten Fall, wenn Person 1 betroffen und Person 2 nicht-betroffen wäre, läge das Kandidatenintervall proximal vom Marker D2S2352 (Abbildung 45d). Diese Konstellation wäre mit der von *STONE et al.* (1999) publizierte Lokalisierung von EFEMP1 zwischen D2S2153 und D2S378 vereinbar (Abbildung 44) und scheint daher die tatsächlichen Verhältnisse wiederzugeben. Die möglicherweise falsche klinische Diagnose bei einem der beiden Familienmitglieder wurde mittlerweile auch bestätigt (S. Bhattacharya, persönliche Mitteilung). Dies zeigt, wie enorm wichtig eine absolut exakte klinische Diagnose für die Kartierung und Verfeinerung eines Genlokus ist. Kopplungsanalysen basieren deshalb i.d.R. auf der Betrachtung möglichst vieler Meiosen, um somit den Einfluss potentieller Fehldiagnosen zu minimieren.



**Abb. 45: Einfluss der klinischen Diagnose auf die Lokalisierung der DHRD-Kandidatenregion.**

Der von *KERMANI et al.* (1999) ermittelte krankheitsassoziierte Haplotyp der ursprünglichen DHRD-Familie ist rot angegeben. Da das Geschlecht der beiden neu untersuchten Mitglieder dieser DHRD-Familie nicht bekannt ist, sind diese als Raute dargestellt. Sie sind darüber hinaus mit den Ziffern 1 und 2 bezeichnet. Der jeweilige (hypothetische) Erkrankungsstatus wird durch eine schwarz gefüllte (betroffen) oder nicht gefüllte (nicht-betroffen) Raute symbolisiert. Die jeweils resultierende Kandidatenregion ist grün unterlegt.

**a**, Sind beide Familienmitglieder betroffen, so wird die Kandidatenregion von den DNA-Markern D2S2352 (distal) und D2S2251 (proximal) flankiert. **b**, Der Genlokus liegt auch zwischen D2S2352 und D2S2251, wenn beide Personen nicht betroffen sind. **c**, Der Marker D2S2251 begrenzt die Kandidatenregion proximal, wenn nur Person 2 betroffen ist. **d**, Ist nur Person 1 betroffen, so bildet der DNA-Marker D2S2352 die distale Grenze des Kandidatenintervalls.

Bei der Mutationsanalyse von EFEMP1 in 161 betroffenen Mitgliedern aus 37 untersuchten Familien wurde die gleiche *missense*-Mutation (R345W) gefunden (*STONE et al.* 1999). Man geht daher davon aus, dass diese Sequenzvariante von einem gemeinsamen Vorfahren aller Familien stammt. Dabei stellt sich die Frage, ob R345W tatsächlich die krankheits-

verursachende Mutation darstellt, oder lediglich eine polymorphe Veränderung ist. Denkbar wäre eine weitere Mutation in einem, in unmittelbarer Nähe zu EFEMP1 liegenden, zweiten Gen, die zur gleichen Zeit wie R345W entstanden ist. Nach dieser allerdings recht unwahrscheinlichen Hypothese, könnte die eigentliche Mutation aufgrund der räumlichen Nähe zu EFEMP1, stets gemeinsam vererbt worden sein. Es gibt jedoch einige Hinweise auf eine direkte Assoziation zwischen DHRD/MLVT und der R345W-Veränderung. Zum einen besteht ein Kopplungsungleichgewicht zwischen dem Krankheitsphänotyp und der R345W-Variante, die in über 1.900 nicht-betroffenen Allelen nicht gefunden wurde. Darüber hinaus betrifft diese nicht-konservative Aminosäuresubstitution ein, bei Mensch, Maus und Ratte, hochkonserviertes Codon.

Die Übereinstimmung des klinischen Phänotypen zwischen DHRD/MLVT und den frühen Stadien der AMD haben dazu geführt, dass dominante Drusen als ein exzellentes genetisches Modell für die AMD gelten (HÉON *et al.* 1996, GREGORY *et al.* 1996). Bei der Analyse der vollständigen codierenden Sequenz von EFEMP1 in 494 AMD-Patienten konnten jedoch keine direkten Sequenzveränderung nachgewiesen werden (STONE *et al.* 1999).

Um die Rolle von EFEMP1 in der Pathogenese von Drusen mit frühem Erkrankungsalter näher zu beleuchten, wurden Mutationsanalysen in nicht-verwandten Patienten mit sporadischen radiären Drusen durchgeführt. Die Auswahl sporadischer Fälle ohne klare Familienanamnese sollte dabei ausschließen, dass die untersuchten Personen ebenfalls vom gemeinsamen Vorfahren der DHRD/MLVT-Familie abstammten. Damit wurde die Wahrscheinlichkeit erhöht, neue EFEMP1-Mutationen zu finden. Auch die klare klinische Abgrenzung des bei diesen Patienten beobachteten Phänotyps von der AMD, ist eine wichtige Voraussetzung dieser Untersuchung. Die Analyse der zehn codierenden Exone von EFEMP1 in 14 Patienten mit sporadischen radiären Drusen, konnte keine krankheitsassoziierte Mutation nachweisen. Statt dessen wurden drei potentiell polymorphe Sequenzveränderungen, mit etwa gleicher Frequenz in den Patienten und in einer Kontrollgruppe gefunden (Tabelle 14). Darüber hinaus konnten zwei intragenische polymorphe Sequenzwiederholungen identifiziert werden (Tabelle 15).

Obwohl der Phänotyp der 14 untersuchten Personen mit dem der radiären Drusen übereinstimmt, unterscheidet sich diese Patientengruppe in einem wesentlichen Punkt, der positiven Familienanamnese, von den DHRD- und MLVT-Familien die von STONE *et al.* (1999) untersucht wurden. Die Bedeutung eines familiären Hintergrundes als wichtiges diagnostisches Kriterium wurde durch molekulargenetische Untersuchungen an anderen makulären Degenerationen, wie beispielsweise dem Morbus Best gezeigt. Dabei zeigte sich, dass die Wahrscheinlichkeit eine Mutation im *VMD2*-Gen zu finden, bei nicht-familiären Fällen, signifikant niedriger liegt (KRÄMER *et al.* 2000, LOTERY *et al.* 2000). Die

Ergebnisse der Mutationsanalyse von EFEMP1 an Patienten mit sporadischen radiären Drusen lassen den Schluss zu, dass bei dieser Netzhauterkrankung, neben der klinischen (PIGUET *et al.* 1995, EVANS *et al.* 1997, EDWARDS *et al.* 1998) auch eine gewisse genetische Heterogenität vorhanden ist. Ob die genetische Heterogenität, wie beim Morbus Best, auf das sporadische Auftreten der Erkrankung beschränkt bleibt, oder auch bei Familien mit autosomal dominanter Vererbung vorhanden ist, müssen weitere Untersuchungen in einer größeren Zahl familiärer Fälle zeigen.

Um neue Kandidatengene zu identifizieren, welche mit dem Krankheitsbild sporadischer radiärer Drusen assoziiert sind, bietet sich u.a. die Analyse von Proteinen an, die mit EFEMP1 interagieren. Die Untersuchung von EFEMP1 mit Hilfe des Hefe Zwei-Hybrid Systems ist dabei eine Möglichkeit, solche Interaktionspartner zu identifizieren. Die hier durchgeführten Untersuchungen sollten einen ersten Einblick in die Funktionalität dieses Systems geben und als Vorbereitung zur Durchsuchung einer retinaspezifischen cDNA-Bank dienen.

EFEMP1 besitzt sechs  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende EGF-ähnliche Domänen, von denen eine N-terminal und die anderen fünf tandemartig bis in den C-terminalen Bereich des Proteins liegen (IKEGAWA *et al.* 1996). EGF-Domänen bestehen aus je 40 bis 50 Aminosäureresten und beinhalten je sechs Cysteinreste, welche an der Ausbildung von drei Disulfidbrücken beteiligt sind (RAO *et al.* 1995). Eine Untergruppe der EGF-Domänen enthält eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstelle, welche durch die Konsensussequenz  $\text{D/N-x-D/N-E/Q-x}_{n1}\text{-D/N}^*\text{-x}_{n2}\text{-Y/F}$  gekennzeichnet ist (HANDFORD *et al.* 1991, WERNER *et al.* 2000). Der mit einem Stern markierte Asparaginrest kann  $\beta$ -hydroxyliert vorliegen (REES *et al.* 1988). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstelle findet sich bei einer Reihe von Proteinen, wie z.B. Faktor IX und X der Blutgerinnungskaskade (HUANG *et al.* 1989, PERSSON *et al.* 1989) oder Fibrillin-1 (GLANVILLE *et al.* 1994, HANDFORD *et al.* 1995). Die funktionelle Bedeutung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstelle zeigte die Identifizierung von Aminosäuresubstitutionen in diesem Bereich im Faktor IX bei Patienten mit Hämophilie B (WINSHIP & DRAGON 1991) oder im Fibrillin-1 bei Patienten mit Marfan-Syndrom (DIETZ *et al.* 1993, HEWETT *et al.* 1993, KAINULAINEN *et al.* 1994). Untersuchungen der Kristallstruktur von  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende EGF-Domänen zeigten, dass das  $\text{Ca}^{2+}$  zur Stabilisierung der durch die EGF-Domäne vermittelten Protein-Protein Interaktionen beiträgt (RAO *et al.* 1995).

Ein Vergleich der EFEMP1-Proteinsequenzen von Mensch, Ratte und Rind (Abbildung 36) zeigt, dass besonders die Bereiche in denen die EGF-Domänen liegen hoch konserviert sind. Die in den betroffenen Mitgliedern der DHRD/MLVT-Familien gefundene R345W Mutation liegt in der letzten der sechs EGF-Domänen, unmittelbar neben einem der sechs wichtigen Cysteinreste. Mit der Einführung dieser Sequenzvariante in das bovine System sollte ein möglicher Einfluss dieser Veränderung auf die Ausbildung von Protein-Protein-



Wechselwirkungen untersucht werden. Bei den Versuchen mit dem Hefe Zwei-Hybrid System, konnte jedoch keine Beeinflussung der Interaktionsfähigkeit von EFEMP1 durch die R345W Mutation nachgewiesen werden. Weder bei der gefundenen Interaktion von EFEMP1 mit sich selbst, noch bei der nicht reproduzierbaren Wechselwirkung mit DA41 änderte die Einführung der R345W Variation das Ergebnis in signifikanter Weise (Abbildung 39). Aufgrund der multiplen EGF-Domänen von EFEMP1 war eine Wechselwirkung mit sich selbst zu erwarten. Obwohl solche Interaktionen für EFEMP1 bisher nicht beschrieben wurden, weiß man von anderen Protein mit EGF-Domänen, wie z.B. Notch und Delta, dass deren Wechselbeziehung auf  $Ca^{2+}$ -bindenden EGF-Domänen beruht (RAO *et al.* 1995). Die nachgewiesene Interaktion des DAN-bindenden Proteins DA41 mit EFEMP1 in der Ratte (OZAKI *et al.* 1997), konnte im hier verwendeten bovinen System nicht reproduziert werden. Da die Proteinsequenzen von EFEMP1 der Ratte und des Rindes zu 89%, die von DA41 der Ratte und den beiden orthologen bovinen Varianten zu 91,1% (DA41-1) bzw. 96,0% (DA41-2) übereinstimmen, scheinen speziesspezifische Unterschiede nicht die Ursache für die nicht beobachtete Interaktion der Proteine, innerhalb dieser Arbeit zu sein. Denkbar wären jedoch Probleme mit der Stabilität der Fusionsproteine oder eine fehlerhafte Proteinfaltung *in vitro*, die dazu führen könnte, dass die normalerweise für die Interaktion zuständigen Domänen nicht korrekt ausgebildet werden. Obwohl beide Untersuchungen auf dem GAL4-System basierten, wurden verschiedene Expressionsvektoren und Hefestämme eingesetzt. So benutzt der von Ozaki *et al.* (1997) verwendete Hefestamm HF7c zur Selektion positiver Klone lediglich einen Nährstoff-Marker (*HIS3*), während der hier verwendete Stamm AH109, zur Reduzierung falsch positiver Klone, zwei solcher Marker (*ADE2*, *HIS3*) besitzt. Auch das hier verwendete 3-AT erhöhte die Stringenz der Versuchsbedingungen. Möglicherweise sind die Wechselwirkungen zwischen EFEMP1 und DA41 relativ schwach, so dass bereits eine geringfügig höhere Stringenz ausreicht um die Detektion einer Interaktion zu verhindern. Die gefundenen positiven Wechselbeziehungen zwischen den EFEMP1-Proteinen und den als Positivkontrollen verwendeten Proteinen p53 und T-Antigen zeigen jedoch, dass die Verwendung des Hefe Zwei-Hybrid System zur Identifizierung spezifischer Interaktionspartner von EFEMP1 durchaus erfolgreich eingesetzt werden kann. Ob damit tatsächlich neue Kandidatengene für eine Assoziation mit dem Krankheitsbild der radiären Drusen, identifiziert werden können, müssen die entsprechenden Versuche jedoch erst zeigen.

### **X-gebundene kongenitale stationäre Nachtblindheit**

Bei der inkompletten Form der X-gebundenen kongenitalen stationären Nachtblindheit (CSNB2) wird als ursächlicher Defekt eine Störung in der Signalweiterleitung zwischen Photorezeptorzellen und nachgeschalteten Neuronen vermutet (HOOD & GREENSTEIN 1990). Die Analyse der räumlichen Expression des krankheitsassoziierten Gens *CACNA1F* sollte

erste Einblicke in dessen Beitrag zur Physiologie der Netzhaut geben. Die durchgeführte RT-PCR Analyse an verschiedenen Mauslinien legt eine Expression in der inneren Körnerschicht (INL) und der Ganglienzellschicht (GCL) nahe (Abbildung 41). Darüber hinaus deuten die Ergebnisse bei der homozygoten *rd*-Maus (C3H/HeJ) daraufhin, dass ein Großteil der *CACNA1F*-Transkripte in den Photorezeptoren exprimiert werden. Diese Mäuse besitzen keine äußeren (OS) und inneren Segmente (IS), sowie keine äußere Körnerschicht (ONL) (Abbildung 22g). Allerdings konnte bei den ebenfalls photorezeptorlosen Swiss-Webster (SW)-Mäusen (Abbildung 22h) keine Verminderung der *CACNA1F* Transkriptionsaktivität festgestellt werden. Die lichtmikroskopische Untersuchung der Netzhaut beider Mauslinien zeigte keine signifikanten Unterschiede, welche die voneinander abweichenden Amplifizierungen erklären könnte. Das Alter der verwendeten SW-Mäuse war zum Zeitpunkt der Untersuchung mit 49 Tagen angegeben, während die C3H/HeJ-Mäuse zwischen 44 und 56 Tagen alt waren. Theoretisch hätten die C3H/HeJ-Mäuse zum Zeitpunkt der Untersuchung bis zu einer Woche älter sein können als die SW-Mäuse. Möglicherweise war die Degeneration der Photorezeptoren bei der C3H-Maus bereits vollständig abgeschlossen, während bei der SW-Maus noch vereinzelte Photorezeptorzellen (Zapfen) vorhanden waren. Denkbar wäre auch, dass die Degenerationsprozesse bei der SW-Maus etwas langsamer als bei der C3H/HeJ-Maus ablaufen. Zur endgültigen Klärung dieser Fragen, könnten Untersuchungen wesentlich älterer Mäuse beitragen, bei denen die vollständige Degeneration der Photorezeptoren sicher feststeht. Die Ergebnisse der RNA *in situ*-Hybridisierung, sowohl mit der humanen Sonde jm-13 (Abbildung 40), als auch der murinen Probe jm8 (Abbildung 42) unterstützten die Ergebnisse der RT-PCR Analyse mit der *rd/rd*-Maus. Um jedoch zu einer wirklich verlässlichen Aussage über das räumliche Expressionsprofil von *CACNA1F* zu kommen, bedarf es noch weiterer Untersuchungen.

## **Ausblick**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Methoden der Positionsklonierung eingesetzt, um zur Aufklärung der genetischen Ursachen verschiedener erblicher Netzhautdegenerationen beizutragen.

Die mit Hilfe von Kopplungsanalysen erreichte Verfeinerung der Kandidatenregion für die North Carolina Makuladystrophie (NCMD) stellt eine wichtige Voraussetzung für die Identifizierung und Isolierung des krankheitsassoziierten Gens dar. Die rapide ansteigende Verfügbarkeit von Sequenzdaten des menschlichen Genoms wird diese Aufgabe sicherlich noch erleichtern.

Nach der erfolgreichen Klonierung des zugrundeliegenden Gens (*RS1*) der X-gebundenen juvenilen Retinoschisis (RS), steht nun die Untersuchung der funktionellen Aspekte des

RS1-Genproduktes im Vordergrund. Die Suche nach Interaktionspartnern von RS1 mit Hilfe des Hefe Zwei-Hybrid Systems, wird dabei möglicherweise zum besseren Verständnis der grundlegenden Mechanismen bei der Pathogenese der RS beitragen. Dies gilt auch für die Untersuchung der mittlerweile vorhandenen RS1-*knock-out*-Maus, die ein exzellentes Tiermodell für die Analyse der Pathomechanismen dieser Erkrankung darstellt. Somit ist eine Grundlage zur Erforschung neuer Therapieansätze, für eine effektive Behandlung der X-gebundenen juvenilen Retinoschisis geschaffen.

Auch bei dem in neuronalen Geweben exprimierten G-Protein gekoppelten Rezeptor GPR75, der in dieser Arbeit im Rahmen der Untersuchungen zu radiären Drusen gefunden wurde, bieten sich Untersuchungen zu dessen genauer Funktion im physiologischen Netzwerk der Retina an. So trägt z.B. die Identifizierung potentieller Liganden evtl. dazu bei, Hinweise auf eine mögliche Assoziation von *GPR75* mit neuronalen bzw. retinalen Erkrankungen zu finden.

Um neue Kandidatengene, die mit dem Phänotyp der sporadisch auftretenden radiären Drusen oder der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) assoziiert sind isolieren zu können, sollen mit Hilfe des Hefe Zwei-Hybrid Systems spezifische Interaktionspartner des EFEMP1-Proteins identifiziert und näher charakterisiert werden.

Die weitere Erforschung der Funktion retinaler Gene und ihrer Produkte trägt sicherlich dazu bei, unser Wissen zu den komplexen physiologischen und morphologischen Zusammenhängen in der normalen und erkrankten Retina zu erweitern und somit neue Möglichkeiten zur gezielten und wirkungsvollen Behandlung hereditärer Netzhauterkrankungen zu erhalten.

## VI. Literatur

- ADLER, R., CURCIO, C., HICKS, D., PRICE, D. AND WONG, F.** (1999) Cell death in age-related macular degeneration. *Mol. Vis.* **5**: 31.
- ALBERTSEN, H.M., ABDERRAHIM, H., CANN, H.M., DAUSSET, J. LE PASLIER, D. AND COHEN, D.** (1990) Construction and characterization of a yeast artificial chromosome library containing seven haploid human genome equivalents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4256-4260.
- ALITALO, T., KARNA, J., FORSIUS, H. AND DE LA CHAPELLE, A.E.** (1987) X-linked retinoschisis is closely linked to DXS41 and DXS16 but not DXS85. *Clin. Genet.* **32**: 192-195.
- ALITALO, T., FRANCIS, F., KERE, J., LEHRACH, H., SCHLESSINGER, D. AND WILLARD, H.F.** (1995) A 6-Mb YAC contig in Xp22.1-p22.2 spanning the DXS69E, XE59, GLRA2, PIGA, GRPR, CALB3, and PHKA2 genes. *Genomics* **25**: 691-700.
- ALLIKMETS, R., SINGH, N., SUN, H., SHROYER, N.F., HUTCHINSON, A., CHIDAMBARAM, A., GERRARD, B., BAIRD, L., STAUFFER, D., PEIFFER, A., RATTNER, A., SMALLWOOD, P., LI, Y., ANDERSON, K.L., LEWIS, R.A., NATHANS, J., LEPPERT, M., DEAN, M. AND LUPSKI, J.R.** (1997a) A photoreceptor cell specific ATP binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat. Genet.* **15**: 236-246.
- ALLIKMETS, R., SHROYER, N.F., SINGH, N., SEDDON, J.M., LEWIS, R.A., BERNSTEIN, P.S., PEIFFER, A., ZABRISKIE, N.A., HUTCHINSON, A., DEAN, M., LUPSKI, J.R. AND LEPPERT, M.** (1997b) Mutation of the Stargardt's disease gene (ABCR) in age-related macular degeneration. *Science* **277**: 1805-1807.
- ALLIKMETS, R., SEDDON, J.M., BERNSTEIN, P. S., HUTCHINSON, A., ATKINSON, A., SHARMA, S., GERRARD, B., LI, W., METZKER, M.L., WADELIUS, C., CASKEY, C.T., DEAN, M. AND PETRUKHIN, K.** (1999) Evaluation of the Best disease gene in patients with age-related macular degeneration and other maculopathies. *Hum. Genet.* **104**: 449-453.
- ALLIKMETS, R.** (2000) Simple and complex ABCR: Genetic predisposition to retinal disease. *Am. J. Hum. Genet.* **67**: 793-799.
- ALLIKMETS, R. AND THE INTERNATIONAL ABCR SCREENING CONSORTIUM** (2000) Further evidence for an association of ABCR alleles with age-related macular degeneration. *Am. J. Hum. Genet.* **67**: 487-491.
- ALONSO, S., MINTY, A., BOURLET, Y. AND BUCKINGHAM, M.** (1986) Comparison of three actin-coding sequences in the mouse; evolutionary relationships between the actin genes of warm-blooded vertebrates. *J. Mol. Evol.* **23**: 11-22.
- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W. AND LIPMAN, D.J.** (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- AL-UBAIDI, M.R., PITTLER, S.J., CHAMPAGNE, M.S., TRIANTAFYLLOS, J.T., MCGINNIS, J.F. AND BAEHR, W.** (1990) Mouse opsin: gene structure and molecular basis of multiple transcripts. *J. Biol. Chem.* **265**: 20563-20569
- APFELSTEDT-SYLLA, E., GAL, A. UND WEBER, B.H.F.** (2000) Molekulare Grundlagen erblicher Netzhautdegenerationen: Retinitis pigmentosa, Zapfen- und Makuladystrophien. Aus Handbuch der Molekularen Medizin, Band 7; Monogen bedingte Erbkrankheiten, Teil 2; (Hrsg. Ganten, D. und Ruckpaul, K.); Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 79-113.
- ARDEN, G.B., GORIN, M.B., POLKINGHORNE, P.J., JAY, M. AND BIRD, A.C.** (1988) Detection of the carrier state of X-linked retinoschisis. *Am. J. Ophthalmol.* **105**: 590-595.

- BAUMGARTNER, S., HOFMANN, K., CHIQUET-EHRISMANN, R AND BUCHER, P.** (1998) The discoidin domain family revisited: New members from prokaryotes and a homology-based fold prediction. *Prot. Sci.* **7**: 1626-1631.
- BECH-HANSEN, N.T., NAYLOR, M.J., MAYBAUM, T.A., PEARCE, W.G., KOOP, B., FISHMAN, G.A., METS, M., MUSARELLA, M.A. AND BOYCOTT, K.M.** (1998) Loss-of-function mutations in a calcium-channel alpha-1-subunit gene in Xp11.23 cause incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat. Genet.* **19**: 264-267.
- BECH-HANSEN, N.T., NAYLOR, M.J., MAYBAUM, T.A., SPARKES, R.L., KOOP, B., BIRCH, D.G., BERGEN, A.A.B., PRINSEN, C.F.M., POLOMENO, R.C., GAL, A., DRACK, A.V., MUSARELLA, M.A., JACOBSON, S.G., YOUNG, R.S.L. AND WELEBER, R.G.** (2000) Mutations in *NYX*, encoding the leucine-rich proteoglycan nyctalopin, cause X-linked complete congenital stationary night blindness. *Nat. Genet.* **26**: 319-323.
- BENSON, D.A., KARSCH-MIZRACHI, I., LIPMAN, D.J., OSTELL, J., RAPP, B.A. AND WHEELER, D.L.** (2000) GenBank. *Nucleic Acids Res.* **28**: 15-18.
- BERG, O.G. AND VON HIPPEL, P.H.** (1987) Selection of DNA binding sites by regulatory proteins; Statistical-mechanical theory and applications to operators and promoters. *J. Mol. Biol.* **193**: 723-750.
- BERG, O.G. AND VON HIPPEL, P.H.** (1988) Selection of DNA binding sites by regulatory proteins; The binding specificity of cyclic AMP receptor protein to recognition sites. *J. Mol. Biol.* **200**: 709-723.
- BERGEN, A.A.B., TEN BRINK, J.B., RIEMSLAG, F., SCHURMAN, E.J.M., AND TIJMES, N.** (1995) Localization of a novel X-linked congenital stationary night blindness locus: close linkage to the RP3 type retinitis pigmentosa gene region. *Hum. Mol. Genet.* **4**: 931-935.
- BETHESDA RESEARCH LABORATORIES** (1986) BRL pUC host : E.coli DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> competent cells. *Bethesda Res. Lab. Focus* **8(2)**: 9.
- BIRD, A.C. AND JAY, B.** (1994) Diagnosis in inherited retinal disorders. In *Molecular genetics of inherited eye disorders*. (Hrsg. Wright, A.F. und Jay, B.), Harwood Academic Publishers, Chur, Schweiz, 53-88.
- BLANKS, J.C. AND BOK, D.** (1977) An autoradiographic analysis of postnatal cell proliferation in the normal and degenerative mouse retina. *J. Comp. Neurol.* **174**: 317-328.
- BOYCOTT, K.M., PEARCE, W.G., MUSARELLA, M.A., WELEBER, R.G., MAYBAUM, T.A., BIRCH, D.G., MIYAKE, Y., YOUNG, R.S.L. AND BECH-HANSEN, N.T.** (1998) Evidence for genetic heterogeneity in X-linked congenital stationary night blindness. *Am. J. Hum. Genet.* **62**: 865-875.
- BRANN, M.R. AND YOUNG, W.S.** (1986) Localization and quantitation of opsin and transducin mRNAs in bovine retina by in situ hybridization histochemistry. *FEBS Lett.* **200**: 275-278.
- BREATHNACH, R., BENOIST, C., O'HARE, K., GANNON, F. AND CHAMBON, P.** (1978) Ovalbumin gene: Evidence for a leader sequence in mRNA and DNA sequences at the exon-intron boundaries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 4853-4857.
- BRESSLER, N.M., BRESSLER, S.B. AND FINE, S.L.** (1988) Age-related macular degeneration. *Surv. Ophthalmol.* **32**: 375-413.
- BROMAN, K.W., MURRAY, J.C., SHEFFIELD, V.C., WHITE, R.L. AND WEBER, J.L.** (1998) Comprehensive human genetic maps: Individual and sex-specific variation in recombination. *Am. J. Hum. Genet.* **63**: 861-869.

- BROOK, J.D., MCCURRACH, M.E., HARLEY, H.G., BUCKLER, A.J., CHURCH, D., ABURATANI, H., HUNTER, K., STANTON, V.P., THIRION, J.P., HUDSON, T., SOHN, R., ZEMELMAN, B., SNELL, R.G., RUNDLE, S.A., CROW, S., DAVIES, J., SHELBORNE, P., BUXTON, J., JONES, C., JUVONEN, V., JOHNSON, K., HARPER, P.S., SHAW, D.J. AND HOUSMAN, D.E.** (1992) Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3-prime end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* **68**: 799-808.
- BROWNSTEIN, B.H., SILVERMAN, G.A., LITTLE, R.D., BURKE, D.T. KORSMEYER, S.J. SCHLESSINGER, D. AND OLSON, M.V.** (1989) Isolation of single copy human genes from a library of yeast artificial chromosome clones. *Science* **244**: 1348-1351.
- BURKE, D.T., CARLE, G.F. AND OLSON, M.V.** (1987) Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* **236**: 806-812.
- CALEY, D.W., JOHNSON, C. AND LIEBELT, R.A.** (1972) The postnatal development of the retina in the normal and rodless CBA mouse; a light and electron microscope study. *Am. J. Anat.* **133**: 179-212.
- CARTER-DAWSON, D.L., LA VAIL, M.M. AND SIDMAN, R.L.** (1978) Differential effect of the rd mutation on rods and cones in the mouse retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **17**: 489-498.
- CAVALLERANO, A.A.** (1997) Age-related macular degeneration In *Macular disorders, an illustrated diagnostic guide*. (Hrsg. Cavallerano, A.A., Gutner, R.K. und Oshinskie, L.J.), Butterworth-Heinemann, Boston, 121-134.
- CHOMCZYNSKI, P. AND SACCHI, N.** (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159.
- CHRISTEN, W.G., GLYNN, R.J., MANSON, J.E., AJANI, U.A. AND BURING, J.E.** (1996) A prospective study of cigarette smoking and risk of age-related macular degeneration in men. *JAMA* **276**: 1147-1151.
- CHURCH, G.M. AND GILBERT, W.** (1984) Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 1991-1995.
- CLAVERIE, J.M.** 1997 Computational methods for the identification of genes in vertebrate genomic sequences. *Hum. Mol. Genet.* **6**: 1735-1744.
- COLLINS, J. AND HOHN, B.** (1978) Cosmids: a type of plasmid gene-cloning vector that is packageable in vitro in bacteriophage  $\lambda$  heads. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 4242-4246.
- COLLINS, F.S.** (1992) Positional cloning: Let's not call it reverse anymore. *Nat. Genet.* **1**: 3-6.
- CONKLIN, D., HOLDERMAN, S., WHITMORE, T.E., MAURER, M. AND FELDHAUS, A.L.** (2000) Molecular cloning, chromosome mapping and characterization of UBQLN3 a testis-specific gene that contains an ubiquitin-like domain. *Gene* **249**: 91-98.
- CORPET, F.** (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* **16**: 10881-10890.
- CRIFE, L.D., MOORE, K.D. AND KANE, W.H.** (1992) Structure of the gene for human coagulation factor V. *Biochemistry* **31**: 3777-3785.
- DARZINS, P., MITCHELL, P. AND HELLER R.F.** (1997) Sun exposure and age-related macular degeneration. An Australian case-control study. *Ophthalmology* **104**: 770-776.
- DEININGER, P.** (1989) Mobile DNA. (Hrsg.: Berg, D.E. und Howe, M.M.) American Society for Microbiology, Washington, DC, 619-636.

- DE LA PAZ, M.A., PERICAK-VANCE, M.A., LENNON, F., HAINES, J.L. AND SEDDON, J.M.** (1997) Exclusion of TIMP3 as a candidate locus in age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **38**: 1060-1065.
- DE LA PAZ, M.A., GUY, V.K., ABOU-DONIA, S., HEINIS, R., BRACKEN, B., VANCE, J.M., GILBERT, J.R., GASS, J.D.M., HAINES, J.L. AND PERICAK-VANCE, M.A.** (1999) Analysis of the Stargardt disease gene (ABCR) in age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **106**: 1531-1536.
- DEUTMAN, A.F.** (1971) The hereditary dystrophies of the posterior pole of the eye. Van Gorcum, Assen.
- DEUTMAN, A.F.** (1977) Vitreoretinal dystrophies. In *Hereditary retinal and choroidal diseases* (Hrsgs. Krill, A. und Archer, D.B.), Harper and Row Publishers Inc, New York, 1043-1108.
- DEUTMAN, A.F. AND JANSEN, L.M.** (1970) Dominantly inherited drusen of Bruch's membrane. *Br. J. Ophthalmol.* **54**: 373-382.
- DIB, C., FAURE, S., HZAMES, C., SAMSON, D., DRONOT, N., VIGUAL, A., MILLASSEAU, P., MARC, S., HAZAN, J., SEBOUN, E., LATHROP, M., GYAPAY, G., MORISETTE, J. AND WEISSENBACH, J.** (1996) A comprehensive genetic map of the human genome based on 5264 microsatellites. *Nature* **380**: 152-154.
- DIETZ, , H.C., MCINTOSH, I., SAKAI, L.Y., CORSON, G.M., CHALBERG, S.C., PYERITZ, R.E. AND FRANCOMANO, C.A.** (1993) Four novel FBN1 mutations: significance for mutant transcript level and EGF-like domain calcium binding in the pathogenesis of Marfan syndrome. *Genomics* **17**: 468-475.
- DOYNE, R.W.** (1899) Peculiar condition of choroiditis occurring in several members of the same family.. *Trans. Ophthalmol Soc. U.K.* **19**: 71.
- DURFEE, T., BECHERER, K., CHEN, P.L., YEH, S.H., YANG, Y., KILBURN, A.E., LEE, W.H. AND ELLEDGE, S.J.** (1993) The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 subunit. *Genes Devel.* **7**: 555-569.
- DUVAL, P.-A., MARLHENS, F., GRIFFOIN, J.-M., MILLET, P., ARNOUD, B. AND HAMEL, C.P.** (1999) X-linked retinoschisis with a novel substitutive amino acid (P193S) in XLR1. *Mutation and Polymorphism report no. 39 online. Hum. Mutat.* **13**: 259.
- EDWARDS, A.O., KLEIN, M.L., BERSELLI, B., FIELDING-HEITMANSKI, J., RUST, K., WIRTZ, M.K., WELEBER, R.G. AND ACOTT, T.S.** (1998) Malattia Leventinese: Refinement of the genetic locus and phenotypic variability in the autosomal dominant macular drusen. *Am. J. Ophthalmol.* **126**: 417-424.
- ELDER, B., LAKICH, D. AND GITSCHER, J.** (1993) Sequence of the murine factor VIII cDNA. *Genomics* **16**: 374-379.
- EVANS, J. AND WORMWALD, R.** (1996) Is the incidence of registrable age-related macular degeneration increasing? *Br. J. Ophthalmol.* **80**: 9-14.
- EVANS, K., GREGORY, C.Y., WJESURIYA, S.D, KERMANI, S, JAY, M.R., PLANT, C. AND BIRD, A.C.** (1997) Assessment of the phenotypic range seen in Doyme honeycomb retinal dystrophy. *Arch. Ophthalmol.* **115**: 904-910.
- EWING, C.C. AND IVES, E.J.** (1970) Juvenile hereditary retinoschisis. *Trans. Ophthalmol. Soc. UK* **89**: 29-39.
- FELBOR, U., DOEPNER, D., SCHNEIDER, U., ZRENNER, E. AND WEBER, B.H.** (1997) Evaluation of the gene encoding the tissue inhibitor of metalloproteinases-3 in various maculopathies. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **38**: 1054-1059.

- FERRERO, G.B., FRANCO, B., ROTH, E.J., FIRULLI, B.A., BORSANI, G., DELMAS-MATA, J., WEISSENBACH, J., HALLEY, G., SCHLESSINGER, D., CHINAULT, A.C., ZOGHBI H.Y., NELSON, D.L. AND A BALLABIO P.** (1995) An integrated physical and genetic map of a 35 Mb region on chromosome Xp22.3-Xp21.3. *Hum. Mol. Genet.* **4**: 1821-1827.
- FETKENHOUR, C.L., GURNEY, N., DOBBIE, G.L. AND CHROMOKOS, E.** (1976) Central areolar pigment epithelial dystrophy. *Am. J. Ophthalmol.* **81**: 745-753.
- FIELDS, S. AND SONG, O.** (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 245-247.
- FIELDS, S.** (1993) The two-hybrid system to detect protein-protein interactions. *Methods: A Companion to Meth. Enzymol.* **5**: 116-124.
- FORNI, S. AND BABEL, J.** (1962) Étude clinique et histologique de la malattia levantinese: affection appartenant au groupe des dégénérescences hyalines du pole posterieur. *Ophthalmologica* **143**: 313-322.
- FORSIUS, H., KRAUSE, U., HELVE, J., VUOPALA, V., MUSTONEN, E., VAINIO-MATTILA, B., FELLMAN, J. AND ERIKSSON, A.W.** (1973). Visual acuity in 183 cases of X-chromosomal retinoschisis. *Can. J. Ophthalmol.* **8**: 385-393.
- FRANCKE, U.** (1994) Digitized and differentially shaded human chromosome ideograms for genomic applications. *Cytogenet. Cell Genet.* **65**: 206-219.
- FRANK, H.R., LANDERS, M.B. WILLIAMS, R.J. AND SIDBURY, J.B.** (1974) A new dominant progressive foveal dystrophy. *Am. J. Ophthalmol.* **78**: 903-916.
- FREUND, C.L., GREGORY-EVANS, C.Y., FURUKAWA, T., PAPAIOANNOU, M., LOOSER, J., BLODER, L., BELLINGHAM, J., NG, D., HERBICK, J.A., DUNCAN, A., SCHERER, S.W., TSUI, L.C., LOUTRADIS-ANAGNOSTOU, A., JACOBSON, S.G., CEPKO, C.L., BHATTACHARYA, S.S. AND MCINNES, R.R.** (1997) Cone-rod dystrophy due to mutations in a novel photoreceptor-specific homeobox gene (CRX) essential for maintenance of the photoreceptor. *Cell* **91**: 543-553.
- FURUKAWA, T., MORROW, E.M. AND CEPKO, C.L.** (1997) Crx, a novel otx-like homeobox gene, shows photoreceptor-specific expression and regulates photoreceptor differentiation. *Cell* **91**: 531-541.
- GASS, J.D.M.** (1987) Stereoscopic Atlas of Macular Diseases. Mosby, St. Louis, Vol. 1, 3<sup>rd</sup> ed.
- GEHRIG, A.E., WARNEKE-WITTSTOCK, R., SAUER, C.G. AND WEBER, B.H.F.** (1999a) Isolation and characterization of the murine X-linked juvenile retinoschisis (Rs1h) gene. *Mam. Genome* **10**: 303-307.
- GEHRIG, A., WHITE, K., LORENZ, B., ANDRASSI, M., CLEMENS, S. AND WEBER, B.H.F.** (1999b) Assessment of RS1 in X-linked juvenile retinoschisis and sporadic senile retinoschisis. *Clin. Genet.* **55**: 461-465.
- GEHRIG, A., WEBER, B.H.F., LORENZ, B. AND ANDRASSI, M.** (1999c) First molecular evidence for a de novo mutation in RS1 (XLR51) associated with X-linked juvenile retinoschisis. *J. Med. Genet.* **36**: 932-934
- GEORGE, N.D., YATES, J.R. AND MOORE, A.T.** (1996) Clinical features in affected males with X-linked retinoschisis. *Arch. Ophthalmol.* **114**: 274-280.
- GIERASCH, L.M.** (1989) Signal sequences. *Biochemistry* **28**: 923-930.



- GIETZ, D., ST. JEAN, A., WOODS, R.A. AND SCHIESTL, R.H.** (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.* **20**: 1425.
- GINGRICH, J.C., BOEHRER, D.M., GARNES, J.A., JOHNSON, W., WONG, B.S., BERGMANN, A., EVELETH, G.G., IANGLOIS, R.G. AND CARRANO, A.V.** (1996) Construction and characterization of human chromosome 2-specific cosmid, fosmid, and PAC clone libraries. *Genomics* **32**: 65-74.
- GLANVILLE, R.W., QIAN, R.Q., MCCLURE, D.W. AND MASLEN, C.L.** (1994) Calcium binding, hydroxylation, and glycosylation of the precursor epidermal growth factor-like domains of fibrillin-1, the Marfan gene protein. *J. Biol. Chem.* **269**: 26630-26634.
- GRAFSTEIN, B.M., MURRAY, M. AND INGOGLIA, N.A.** (1972) Protein synthesis and axonal transport in retinal ganglion cells of mice lacking visual receptors. *Brain Res.* **44**: 37-48.
- GRAYSON, C., REID, S.N.M., ELLIS, J.A., RUTHERFORD, A., SOWDEN, J.C., YATES, J.R.W., FARBER, D.B. AND TRUMP, D.** (2000) Retinoschisin, the X-linked retinoschisis protein, is a secreted photoreceptor protein, and is expressed and released by Weri-Rb1 cells. *Hum. Mol. Genet.* **9**: 1873-1879.
- GREEN, W.R. AND KEY, S.N.** (1977) Senile macular degeneration: a histopathologic study. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* **75**: 180-254.
- GREGORY, C.Y., EVANS, K., WJESURIYA, S.D., KERMANI, S., JAY, M.R., PLANT, C., COX, N., BIRD, A.C. AND BHATTACHARYA, S.S.** (1996) The gene responsible for autosomal dominant Doyme's honeycomb retinal dystrophy (*DHRD*) maps to chromosome 2p16. *Hum. Mol. Genet.* **5**: 1055-1059.
- GRUNSTEIN, M. AND HOGNESS, D.S.** (1975) Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**: 3961.
- GUINTO, E.R., ESMON, C.T., MANN, K.G. AND MACGILLIVRAY, R.T.** (1992) The complete cDNA sequence of bovine coagulation factor V. *J. Biol. Chem.* **267**: 2971-2978.
- HAAS, J.** (1889) Ueber das Zusammenvorkommen von Veraenderungen der Retina und Choroidea. *Arch. Augenheilkd.* **37**: 343-348.
- HALDANE, J.B.S. AND SMITH, C.A.B.** (1947) A new estimate of the linkage between the genes for haemophilia and colour blindness. *Ann. Eugen.* **14**: 10-31.
- HANAHAH, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- HANDFORD, P.A., MAYHEW, M., BARON, M., WINSHIP, P.R., CAMPBELL, I.D. AND BROWNLEE, G.G.** (1991) Key residues involved in calcium-binding motifs in EGF-like domains. *Nature* **351**: 164-167.
- HANDFORD, P.A., DOWNING, A.K., RAO, Z., HEWETT, D.R., SYKES, B.C. AND KIELTY, C.M.** (1995) The calcium binding properties and molecular organization of epidermal growth factor-like domains in human fibrillin-1. *J. Biol. Chem.* **270**: 6751-6756.
- HANOKA, E., OZAKI, T., OHIRA, M., NAKAMURA, Y., SUZUKI, M., TAKAHASHI, E., MORIYA, H., NAKAGAWARA, A. AND SAKIYAMA, S.** (2000) Molecular cloning and expression analysis of the human DA41 gene and its mapping to chromosome 9q21.2-q21.3. *J. Hum. Genet.* **45**: 188-191.
- HAYASHI, K. AND YANDELL, D.W.** (1993) How sensitive is PCR-SSCP? *Hum. Mut.* **2**: 338-346.

- HÉON, E. AND MUSARELLA, M.A.** (1994) Congenital stationary night blindness: A critical review for molecular approaches. In *Molecular genetics of inherited eye disorders*. (Hrsg. Wright, A.F. und Jay, B.), Harwood Academic Publishers, Chur, Schweiz, 277-301.
- HÉON, E., PIGUET, B., MUNIER, F., SNEED, S.R., MORGAN, C.M., FORNI, S., PESCIA, G., SCHORDERET, D., TAYLOR, C.M., STREB, L.M., WILES, C.D., NISHIMURA, D.Y., SHEFFIELD, V.C. AND STONE, E.M.** (1996) Linkage of autosomal dominant radial drusen (Malattia Leventinese) to chromosome 2p16-21. *Arch. Ophthalmol.* **114**: 193-198.
- HEWETT, D.R., LYNCH, J.R., SMITH, R. AND SYKES, B.C.** (1993) A novel fibrillin mutation in Marfan syndrome which could disrupt calcium binding of the epidermal growth factor-like module. *Hum. Mol. Genet.* **2**: 475-477.
- HILL, J., DONALD, K.A. AND GRIFFITHS, D.E.** (1991) DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. *Nucleic Acids Res.* **19**: 5791.
- HIROKA, M., TRESE, M.T. AND SHASTRY, B.S.** (2000) X-linked juvenile retinoschisis is associated with a 4-base pair insertion at codon 55 of the XLR51 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **268**: 370-372.
- HIRIYANNA, K.T., BINGHAM, E.L., YASHAR, B.M., AYYAGARI, R., FISHMAN, G., SMALL, K.W., WEINBERG, D.V., WELEBER, R.G., LEWIS, R.A., ANDREASSON, S., RICHARDS, J.E. AND SIEVING, P.A.** (1999) Novel mutations in XLR51 causing retinoschisis, including first evidence of putative leader sequence change. *Hum. Mutat.* **14**: 423-427.
- HOLLWICH, F.** (1988) Augenheilkunde. 11. neubearb. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- HOLTHOUSE, E.H. AND BATTEN, R.D.** (1897) A case of superficial chorioretinitis of peculiar form and doubtful causation. *Trans. Ophthalmol. Soc. U.K.* **17**: 62-63.
- HOLZ, F.G., OWENS, S.L., MARKS, J., HAIMOVICI, R. AND BIRD, A.C.** (1997) Ultrastructural findings in autosomal dominant drusen. *Arch. Ophthalmol.* **115**: 788-792.
- HOOD, D.C. AND GREENSTEIN, V.** (1990) Models of the normal and abnormal rod system. *Vis. Res.* **30**: 51-68.
- HOTTA, Y., FUJIKI, K., HAYAKAWA, M., OHTA, T., FUJIMAKI, T., TAMAKI, K., YOKOYAMA, T., KANAI, A., HIRAKATA, A., HIDA, T., NISHIMA, S. AND AZUMA, N.** (1998) Japanese juvenile retinoschisis is caused by mutations of the XLR51 gene. *Hum. Genet.* **103**: 142-144.
- HUANG, L.H., KE, X.H., SWEENEY, W. AND TAM, J.P.** (1989) Calcium binding and putative activity of the epidermal growth factor domain of blood coagulation factor IX. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **160**: 133-139.
- HUOPANIEMI, L., RANTALA, A., TAHVANAINEN, E., DE LA CHAPELLE, A. AND ALITALO, T.** (1997) Linkage disequilibrium and physical mapping of X linked juvenile retinoschisis. *Am. J. Hum. Genet.* **60**: 1139-1149.
- HUOPANIEMI, L., RANTALA, A., FORSIUS, SOMER, M., DE LA CHAPELLE, A. AND ALITALO, T.** (1999) Three widespread founder mutations contribute to high incidence of X-linked juvenile retinoschisis in Finland. *Eur. J. Hum. Genet.* **7**: 368-376.
- HUTCHINSON, J. AND TAY, W.** (1875) Symmetrical central chorioretinal disease occurring in senile persons. *R. London Ophthalmol. Hosp. Rep.* **8**: 231-244.
- HVARREGAARD, J., ANDERSEN, M.H., BERGLUND, L., RASMUSSEN, J.T. AND PETERSEN, T.E.** (1996) Characterization of glycoprotein PAS-6/7 from membranes of bovine milk fat globules. *Eur. J. Biochem.* **240**: 628-636.

- HYMAN L.** (1987) Epidemiology of eye disease in the elderly. *Eye* **1**: 330-41.
- IKEGAWA, S., TODA, T., OKUI, K. AND NAKAMURA, Y.** (1996) Structure and chromosomal assignment of the human S1-5 gene (FBNL) that is highly homologous to fibrillin. *Genomics* **35**: 590-592.
- INOUE, Y., YAMAMOTO, S., OKADA, M., TSUJIKAWA, M., INOUE, T., OKADA, A.A., KUSAKA, S., SAITO, Y., WAKABAYASHI, K., MIYAKE, T., FUJIKADO, T. AND TANO, Y.** (2000) X-linked retinoschisis with point mutations in the XLR51 gene. *Arch. Ophthalmol.* **118**: 93-96.
- IOANNOU, P.A., AMEMIYA, C.T., GARNES, J., KROISEL, P.M., SHIZUYA, H. CHEN, C. AND DEJONG, P.J.** (1994) A new P1 derived vector for the propagation of large human DNA fragments. *Nat. Genet.* **6**: 84-89.
- ITO, H., RUKADA, Y., MURATA, K. AND KIMURA, A.** (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**: 163-168.
- IVES, E.J., EWING, C.C. AND INNES, R.** (1970) X-linked juvenile retinoschisis and Xg linkage in five families. *Am. J. Hum. Genet.* **22**: A17-A18.
- IWABUCHI, K., LI, B., BARTEL, P. AND FIELDS, S.** (1993) Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene* **8**: 1693-1696.
- JIMENEZ-SIERRA J.M., OGDEN, T.E. AND VAN BOEMEL, G.B.** (1989) Inherited retinal diseases. A diagnostic guide. Mosby, St. Louis.
- KAINULAINEN, K., KARTTUNEN, L., PUHAKKA, L., SAKAI, L. AND PELTONEN, L.** (1994) Mutations in the fibrillin gene responsible for dominant ectopia lentis and neonatal Marfan syndrome. *Nat. Genet.* **6**: 64-69.
- KARN, T., HOLTRICH, U., BRAUNINGER, A., BOHME, B., WOLF, G., RUBSAMEN-WAIGMANN, H. AND STREBHARDT, K.** (1993) Structure, expression and chromosomal mapping of TKT from man and mouse: a new subclass of receptor tyrosine kinases with a factor VIII-like domain. *Oncogene* **8**: 3433-3440.
- KÄSMANN, B., BLANKENAGEL, A. UND DAUS, W.** (1992) Die zentrale areoläre Pigmentepitheldystrophie. *Ophthalmologie* **89**: 60-66.
- KAWAKAMI, A., KITSUKAWA, T., TAKAGI, S. AND FUJISAWA, H.** (1996) Developmentally regulated expression of a cell surface protein, neuropilin, in the mouse nervous system. *J. Neurobiol.* **29**: 1-17.
- KAWANO, K., TANAKA, K., MURAKAMI, F. AND OHBA, N.** (1981) Congenital hereditary retinoschisis: evolution at the initial stage. *Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **217**: 315-323.
- KAYE, F.J., MODI, S., IVANOVSKA, I., KOONIN, E.V., THRESS, K., KUBO, A., KORNBLUTH, S. AND ROSE, M.D.** (2000) A family of ubiquitin-like proteins binds the ATPase domain of Hsp70-like Stch. *FEBS Lett.* **467**: 348-355.
- KELLNER, U., BRUMMER, S., FOERSTER, M.H. AND WESSING, A.** (1990) X-linked congenital retinoschisis. *Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **228**: 432-437.
- KELLNER, U.** (1997) Hereditäre Netzhautdystrophien. Teil 2: Differentialdiagnose. *Ophthalmologie* **94**: 450-465.
- KELSELL, R.E., GODLEY, B.F., EVANS, K, TIFFIN, P.A., GREGORY, C.Y., PLANT, C., MOORE, A.T., BIRD, A.C. AND HUNT, D.M.** (1995) Localization of the gene for progressive bifocal chorioretinal atrophy (PBCRA) to chromosome 6q. *Hum. Mol. Genet.* **4**: 1653-1656.

- KERE, J., NAGARAJA, R., MUMM, S., CICCODICOLA, A., D'URSO, M. AND SCHLESSINGER** (1992) Mapping human chromosomes by walking with sequence-tagged sites from end fragments of yeast artificial chromosome inserts. *Genomics* **14**: 241-248.
- KERMANI, S., GREGORY-EVANS, K., TARTTELIN, E.E., BELLINGHAM, J., PLANT, C., BIRD, A.C., FOX, M., BHATTACHARYA, S.S. AND GREGORY-EVANS, C.Y.** (1999) Refined genetic and physical positioning of the gene for Doyme honeycomb retinal dystrophy (DHRD). *Hum. Genet.* **104**: 77-82.
- KESSLER, C., NEUMAIER, P.S., AND WOLF, W.** (1985) Recognition sequences of restriction endonucleases and methylases - a review. *Gene* **33**: 1-102.
- KHOURI, G., METS, M.B., SMITH, V.C., WENDELL, M. AND PASS, A.S.** (1988) Xlinked congenital stationary night blindness; review and report of a family with hyperopia. *Arch. Ophthalmol.* **106**: 1417-1422.
- KLAINGUTI, R.** (1932) Die Tapeto-retinal Degeneration im Kanton Tessin. *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* **89**: 253-254.
- KLAVER, C.C., WOLFS, R.C., ASSINK, J.J., VAN DULIN, C.M., HOFMAN, A. AND DE JONG, P.T.** (1998a) Genetic risk of age-related maculopathy. Population-based familial aggregation study. *Arch. Ophthalmol.* **116**: 1646-51.
- KLAVER, C.C., KLIFFEN, M., VAN DULIN, C.M., HOFMAN, A., CRUTS, M., GROBBEE, D.E., VAN BROECKHOVEN, C. AND DE JONG, P.T.** (1998b) Genetic association of apolipoprotein E with age-related macular degeneration. *Am. J. Hum. Genet.* **63**: 200-206.
- KLEIJNEN, M.F., SHIH, A.H., ZHOU, P., KUMAR, S., SOCCIO, R.E., KEDERSHA, N.L., GILL, G. AND HOWLEY, P.M.** (2000) The hPLIC proteins may provide a link between the ubiquitination machinery and the proteasome. *Mol. Cell.* **6**: 409-419.
- KLEIN, M.L., MAULDIN, W.M. AND STOUMBOS, V.D.** (1994) Heredity and age-related macular degeneration. Observations in monozygotic twins. *Arch. Ophthalmol.* **112**: 932-37.
- KLEIN, M.L., SCHULTZ, D.W., EDWARDS, A., MATISE, T.C., RUST, K., BERSELLI, C.B., TRZUPEK, K., WELEBER, R.G., OTT, J., WIRTZ, M.K. AND ACOTT, T.S.** (1998) Age-related macular degeneration. Clinical features in a large family and linkage to chromosome 1q. *Arch. Ophthalmol.* **116**: 1082-1088.
- KLEIN, R., KLEIN B.E. AND JENSEN, S.C.** (1997) The relation of cardiovascular disease and its risk factors to the 5year incidence of age-related maculopathy: The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* **104**: 1804-1812.
- KLJAVIN, I.J. AND REH, T.A.** (1991) Muller cells are a preferred substrate for in vitro neurite extension by rod photoreceptor cells. *J. Neurosci.* **11**: 2985-2994.
- KÖHLER, M.R. AND VOGT, P.H.** (1994) Interstitial deletions of repetitive DNA blocks in dicentric human Y chromosomes. *Chromosoma* **103**: 324-330.
- KOHL, S., GIDDINGS, I., BESCH, D., APFELSTEDT-SYLLA, E., ZRENNER, E. AND WISSINGER, B.** (1998) The role of the peripherin/RDS gene in retinal dystrophies. *Acta Anat.* **162**: 75-84.
- KORNBERG, A.** (1974) DNA-Replication. W.H. Freeman and Company, New York, 333-336.

- KOTANI, E., YAMAKAWA, M., SHIN-ICHI, I., TASHIRO, M., MORI, H., SUMIDA, M., MATSUBARA, F., TANAI, K., KADONO-OKUDA, K., KATO, Y. AND MORI, H.** (1995) Cloning and expression of the gene of hemocytin, an insect humoral lectin which is homologous with the mammalian von Willebrand factor. *Biochim. Biophys. Acta* **1260**: 245-258.
- KOZAK, M.** (1987) An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* **15**: 8125-8148.
- KRÄMER, F., WHITE, K., PAULEIKHOFF, D. GEHRIG, A.; PASSMORE, L., RIVERA, A., RUDOLPH, G., KELLNER, U., ANDRASSI, M., LORENZ, B., ROHRSCHEIDER, K., BLANKENAGEL, A., JURKLIES, B., SCHILLING, H., SCHUTT, F., HOLZ, F. G. AND WEBER, B. H. F.** (2000) 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. *Europ. J. Hum. Gen.* **8**: 286-292.
- LARocca, D., PETERSON, J.A., URREA, R., KUNIYOSHI, J., BISTRAIN, A.M. AND CERIANI, R.L.** (1991) A M<sub>1</sub> 46,000 human milk fat globule protein that is highly expressed in human breast tumors contains factor VIII-like domains. *Cancer Res.* **51**: 4994-4998.
- LATHROP, G.M., LALOUEL, J.M., JULIER, C. AND OTT, J.** (1985) Multilocus linkage analysis in humans: detection of linkage and estimation of recombination. *Am. J. Hum. Genet.* **37**: 482-498.
- LA VAIL, M.M. AND MULLEN, R.J.** (1976) Role of the pigment epithelium in inherited retinal degeneration analyzed with experimental mouse chimeras. *Exp. Eye Res.* **23**: 227-245.
- LEFLER, W.H., WADSWORTH, J.A.C AND SIDBURY J.B.** (1971) Hereditary macular degeneration and amino-aciduria. *Am. J. Ophthalmol.* **71**: 224-230.
- LEHRACH, H., DIAMOND, D., WOZNEY, J.M. AND BOEDTKER, H.** (1977) RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* **16**: 4743-4751.
- LECKA-CZERNICK, B., LUMPKIN JR., C.K. AND GOLDSTEIN S.** (1995) An overexpressed gene transcript in senescent and quiescent human fibroblasts encoding a novel protein in the epidermal growth factor-like repeat family stimulates DNA synthesis. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 120-128.
- LEYDHECKER, W.** (1988) Augenheilkunde. 23. Auflage, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.
- LI, B. AND FIELDS, S.** (1993) Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 T antigen by using the yeast two-hybrid system. *FASEB J.*, **7**: 957-963.
- LINDL, T. UND BAUER, J.** (1989) Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. 2. überarbeitete Auflage. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- LOTERY, A.J., MUNIER, F.L., RSHMAN, G.A., WELEBER, R.G., JACOBSON, S.G., AFFATIGATO, L.M., NICHOLS, B.E., SCHORDERET, D.F., SHEFFIELD, V.C. AND STONE, E.M.** (2000) Allelic variation in the VMD2 gene in best disease and age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **41**: 1291-1296.
- MARLES-PERLMAN, J.A., BRADY, W.E., KLEIN, R. VAN DEN LANGENBERG, G.M., KLEIN, B.E. AND PALTA, M.** (1995) Dietary fat and age-related maculopathy. *Arch. Ophthalmol.* **113**: 743-748.
- MARQUARDT, A., STÖHR, H., PASSMORE, L.A., KRÄMER, F., RIVERA, A. AND WEBER, B.H.F.** (1998) Mutations in a novel gene, VMD2, encoding a protein of unknown properties cause juvenile-onset vitelliform macular dystrophy (Best's disease). *Hum. Mol. Genet.* **7**: 1517-1525.

- MASHIMA, Y., SHINODA, K., ISHIDA, S., OZAWA, Y., KUDHO, J., IWATA, T., OGUCHI, Y. AND SHIMIZU, N.** (1999) Identification of four novel mutations of the XLR1 gene in Japanese patients with X-linked juvenile retinoschisis. *Mutations in brief no. 234 online. Hum. Mutat.* **13**: 338.
- MENDOZA-LONDONO, R., HIRIYANNA, K.T., BINGHAM, E.L., RODRIGUEZ, F., SHASTRY, B.S., RODRIGUEZ, A., SIEVING, P.A. AND TAMAYO, M.L.** (1999) A Colombian family with X-linked juvenile retinoschisis is with three affected females. Finding of a frameshift mutation. *Ophthalmic Genet.* **20**: 37-43.
- MIKI, Y., SWENSEN, J., SHATTUCK-EIDENS, D., FUTREAL, P.A., HARSHMAN, K., TAVTIGIAN, S., LIU, Q., COCHRAN, C., BENNETT, L.M., DING, W., BELL, R., ROSENTHAL, J., HUSSEY, C., TRAN, T., MCCLURE, M., FRYE, C., HATTIER, T., PHELPS, R., HAUGEN-STRANO, A., KATCHER, H., YAKUMO, K., GHOLAMI, Z., SHAFFER, D., STONE, S. *et al.*** (1994) A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* **266**: 66-71.
- MILLER, R.F. AND DOWLING, J.E.** (1970) Intracellular responses of the Muller (glial) cells of mudpuppy retina: their relation to b-wave of the electroretinogram. *J. Neurophysiol.* **33**: 323-341.
- MILLER, S.A., DYKES, D.D. AND POLESKY, H.F.** (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* **16**: 1215.
- MIYAKE, YAGASAKI, K., HORIGUCHI, M., KAWASE, Y. AND KANDA, T.** (1986) Congenital stationary night blindness with negative electroretinogram. A new classification. *Arch. Ophthalmol.* **104**: 1013-1020.
- MOLDAY, LL, HICKS, D., SAUER, C.G., WEBER, B.H.F. AND MOLDAY, R.S. (2001)** X-linked juvenile retinoschisis protein RS1 is expressed in photoreceptor and bipolar cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **42**: 816-825.
- MORROW, E.M., BELLIVEAU, J. AND CEPKO, C.L.** (1998) Two phases of rod photoreceptor differentiation during rat retinal development. *J. Neurosci.* **18**: 3738-3748.
- MUSARELLA, M.A., WELEBER, R.G., MURPHEY, W.H., YOUNG, R.S.L., ANSON-CARTWRIGHT, L., METS, M., KRAFT, S.P., POLEMENO, R., LITT, M. AND WORTON, R.G.** (1989) Assignment of the gene for complete X-linked congenital stationary night blindness (CSNB1) to human chromosome Xp11.3. *Genomics* **5**: 727-737.
- NATHANS, J. AND HOGNESS, D.S.** (1983) Isolation, sequence analysis, and intron-exon arrangement of the gene encoding bovine rhodopsin. *Cell* **34**: 807-814.
- NEHLS, M., PFEIFER, D. AND BOEHM, T.** (1994) Exon amplification from complete libraries of genomic DNA using a novel phage vector with automatic plasmid excision facility: application to the mouse neurofibromatosis-1 locus. *Oncogene* **9**: 2169-2175.
- OGURA, K., NARA, K., WATANABE, Y., KOHNO, K., TAI, T. AND SANAI, Y.** (1996) Cloning and expression of cDNA for O-acetylation of GD3 ganglioside. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **225**: 932-938.
- ORITA, M., SUZUKI, Y., SEKIYA, T. AND HAYASHI, K.** (1989) Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* **5**: 874-879.
- OTT, J.** (1991) Analysis of Human Genetic Linkage, überarbeitete Ausgabe. Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- OZAKI, T, KONDO, K., NAKAMURA, Y., ICHIMIYA, S., NAKAGAWARA, A. AND SAKIYAMA, S.** (1997a) Interaction of DA41, a DAN-binding protein, with the epidermal growth factor-like protein, S(1-5). *Biochem. Biophys. Res. Com.* **237**: 245-250.

- OZAKI, T., HISHIKI, T., TOYAMA, Y., YUASA, S., NAKAGAWARA, A. AND SAKIYAMA, S.** (1997b) Identification of a new cellular protein that can interact specifically with DAN. *DNA Cell. Biol.* **16**: 985-991.
- OZAKI, T., NAKAMURA, Y., HANAOKA, E., NAKAGAWARA, A. AND SAKIYAMA, S.** (2000) Overexpression of DA41 in v-Ha-ras-3Y1 cells cause growth suppression. *Jpn. J. Cancer Res.* **91**: 987-993.
- PARK, J.-H.C., OTT, S.H., WANG, X., APPUKUTTAN, B., PATEL, R.J., VAN BOEMEL, G.B. AND STOUT, J.T.** (2000) Clinical phenotype associated with the Arg141His mutation in the X-linked retinoschisis gene. *Arch. Ophthalmol.* **118**: 127-129.
- PAULEIKHOFF, D., SAUER, C.G., MÜLLER, C.R., RADERMACHER, M., MERZ, A. AND WEBER, B.H.F.** (1997) Clinical and genetic evidence for autosomal dominant North Carolina Macular Dystrophy in a german family. *Am. J. Ophthalmol.* **124**: 412-415.
- PENOTTI, F.E.** (1991) Human pre-mRNA splicing signals. *J. Theor. Biol.* **150**: 385-420.
- PEREZ, J.L., SHEN, X., HNKERNAGEL, S., SCIORRA, L., JENKINS, N.A., GILBERT, D.J., COPELAND, N.G. AND WONG, T.W.** (1994) Identification and chromosomal mapping of a receptor tyrosine kinase with a putative phospholipid binding sequence in its ectodomain. *Oncogene* **9**: 211-219.
- PERSSON, E., SELANDER, M., LINSE, S., DRAKENBERG, T., OHLIN, A.K. AND STENFLO, J.** (1989) Calcium binding to the isolated  $\beta$ -hydroxyaspartic acid-containing epidermal growth factor-like domain of bovine factor X. *J. Biol. Chem.* **264**: 16897-16904.
- PETRUKHIN, K., KOISTI, M.J., BAKALL, B., LI, W., XIE, G., MARKNELL, T., SANDGREN, O., FORSMAN, K., HOLMGREN, G., ANDREASSON, S., VUJIC, M., BERGEN, A.A.B., MCGARTY-DUGAN, V., FIGUEROA, D., AUSTIN, C.P., METZKER, M.L., CASKEY, C.T. AND WADELIUS, C.** (1998) Identification of the gene responsible for Best macular dystrophy. *Nat. Genet.* **19**: 241-247.
- PHELAN, J.K. AND BOK, D.** (2000) A brief review of retinitis pigmentosa and the identified pigmentosa genes. *Mol. Vis.* **6**: 116-124.
- PIERCE, J.C., SAUER, B. AND STERNBERG, N.** (1992) A positive selection vector for cloning high molecular weight DNA by the bacteriophage P1 system: Improved cloning efficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 2056-2060.
- PIGUET, B., HAIMOVICI, R. AND BIRD, A.C.** (1995) Dominantly inherited drusen represent more than one disorder: A historical review. *Eye* **9**: 34-41.
- PITTLER, S.J. AND BAEHR, W.** (1991) Identification of a nonsense mutation in the rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase  $\beta$ -subunit gene of the *rd* mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 8322-8326.
- PORTER, M.T., CAVALLERANO, A.A. AND GUTNER, R.K.** (1997) Fundus Fluorescein Angiography. In *Macular disorders, an illustrated diagnostic guide*. (Hrsg. Cavallerano, A.A., Gutner, R.K. und Oshinskie, L.J.), Butterworth-Heinemann, Boston, 41-64.
- PRIMO, S.A.** (1997) Hereditary Macular Disorders. In *Macular disorders, an illustrated diagnostic guide*. (Hrsg. Cavallerano, A.A., Gutner, R.K. und Oshinskie, L.J.), Butterworth-Heinemann, Boston, 231-241.
- PUSCH, C.M., ZEITZ, C., BRANDAU, O., PESCH, K., ACHATZ, H., BEIL, S., SCHARFE, C., MAURER, J., JACOBI, F.K., PINCKERS, A., ANDREASSON, S., HARDCASTLE, A., WISSINGER, B., BERGER, W. AND MEINDL, A.** (2000) The complete form of X-linked congenital stationary night blindness is caused by mutations in a gene encoding a leucine-rich repeat protein. *Nat. Genet.* **26**: 324-327.

- RAO, Z., HANDFORD, P., MAYHEW, M., KNOTT, V., BROWNLEE, G.G. AND STUART, D.** (1995) The structure of a Ca<sup>2+</sup>-binding epidermal growth factor-like domain : its role in protein-protein interactions. *Cell* **82**: 131-141.
- REES, D.J.G., JONES, I.M., HANDFORD, P.A., WALTER, S.J., ESNOUF, M.P., SMITH, K.J. AND BROWNLEE, G.G.** (1988) The role of  $\beta$ -hydroxy-aspartate and adjacent carboxylate residues in the first EGF-domain of human factor IX. *EMBO J.* **7**: 2053-2061.
- REICHENBACH, A. AND ROBINSON, S.R.** (1995) The involvement of Müller cells in the outer retina. in *Neurobiology and clinical aspects of the outer retina* (Hrsg. Djamgoz, M.B.A., Archer, S.N. und Vallergera, S.), Chapman and Hall, London, 395-415.
- REID, S.N., AKHMEDOV, N.B., PRIEV, N.I., KOZAK, C.A., DANCIGER, M. AND FARBER, D.B.** (1999) The mouse X-linked juvenile retinoschisis cDNA: expression in photoreceptors. *Gene* **227**: 257-266.
- RICE, C.M. AND CAMERON, G.N.** (1994) Submission of nucleotide sequence data to EMBL/GenBank/DBJ. *Methods Mol. Biol.* **25**: 413-424.
- RIVERA, A., WHITE, K., STÖHR, H., STEINER, K., HEMMICH, N., GRIMM, T., JURKLIES, B., LORENZ, B., SCHOLL, H.P.N., APFELSTEDT-SYLLA, E. AND WEBER, B.H.F.** (2000) A comprehensive survey of sequence variation in the ABCA4 (ABCR) gene in Stargardt disease and age-related macular degeneration. *Am. J. Hum. Genet.* **67**: 800-813.
- ROBERTS, R.J.** (1988) Restriction and modification enzymes and their recognition sequences. *Nucleic Acids Res.* **11**: r135-r167.
- RODRIGUEZ, I.R., MAZURUK, K., AWORSKI, C., WATA, F., MOREIRA, E.F. AND KAISER-KUPFER, M.I.** (1998) Novel mutations in the XLR51 gene may be caused by early Okazaki fragment sequence replacement. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **39**: 1736-1739.
- ROMMENS, J. M., IANNUZZI, M. C., KEREM, B., DRUMM, M. L., MELMER, G., DEAN, M., ROZMAHEL, R., COLE, J. L., KENNEDY, D., HIDAKA, N., ZSIGA, M., BUCHWALD, M., RIORDAN, J. R., TSUI, L.C. AND COLLINS, F. S.** (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* **245**: 1059-1065.
- ROMMENS, J.M. LIN, B., HUTCHINSON, G.B., ANDREW, S.E., GOLDBERG, Y.P., GLAVES, M.L, LAI, V., MCARTHUR, J., NASIR, J., THEILMANN, J., McDONALD, H., KALCHMAN, M., CLARKE, L.A., SCHAPPERT, K. AND HAYDEN, M.R.** (1993) A transcription map of the region containing the Huntington disease gene. *Hum. Mol. Genet.* **2**: 901-907.
- RYCHLIK, W. AND RHOADS, R.E.** (1989) A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* **17**: 8543-8551.
- SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B. AND ERLICH, H.A.** (1988) Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- SAMBROOK, J., BRITSCH, E.F., AND MANIATIS, T.** (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- SANCHEZ, M.P., TAPLEY, P., SAINI, S.S., HE, B., PULIDO, D. AND BARBACID, M.** (1994) Multiple tyrosine protein kinases in rat hippocampal neurons: isolation of Ptk-3, a receptor expressed in proliferative zones of the developing brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 1819-1823.
- SANGER, F., NICKLEN, S., AND COULSON, A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating-inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.



- SAUER, C.G., CEHRIG, A., WARNECKE-WITTSTOCK, R., MARQUARDT, A., EWING, C.C., GIBSON, A., LORENZ, B., JURKLIES, B. AND WEBER B.H.F.** (1997) Positional cloning of the gene associated with X-linked juvenile retinoschisis. *Nat. Genet.* **17**: 164-170.
- SAUER, C.G., WHITE, K., KELLNER, U., RUDOLPH, G., JURKLIES, B., PAULEIKHOFF, D. AND WEBER, B.H.F.** (2001) EFEMP1 is not associated with early onset sporadic drusen. *Ophthalmic Genet.* **22**: 27-34.
- SAUER, C.G., WHITE, K., STÖHR, H., BERNSTEIN, P.S., HOLZ, F., LEWIS, R.A., PAULEIKHOFF, D., SCHÜTT, F., SIMONELLI, F., ALLIKMETS, R. AND WEBER, B.H.F.** Evaluation of the G protein-coupled receptor-75 (GPR75) in age-related macular degeneration (AMD). *Br. J. Ophthalmol.*, submitted.
- SCHUBERT, G. UND BORNSTEIN, H.** (1952) Beitrag zur Analyse des menschlichen Electroretiogramms. *Ophthalmologica* **123**: 396-413.
- SCHULER, G.D., BOGUSKI, M.S., STEWART, E.A., STEIN, L.D., GYAPAY, G., RICE, K., WHITE, R.E., RODRIGUEZ-THOME, P., AGGARWAL, A., BAJOREK, E. BENTOLILA, S., BIRREN, B.B., BUTLER, A., CASTLE, A.B. CHIANNILKULCHAL, N., CHU, A., CLEE, C., COWLES, S., DAY, P.J., DIBLING, T., DROUOT, N., DUNHAM, I., DUPRAT, S., EAST, C., HUDSON, T.J. et al.** (1996) A gene map of the human genome. *Science* **274**: 540-546.
- SCHMIDT, S., SAUNDERS, A.M., DE LA PAZ, M.A., POSTEL, E.A., HEINIS, R.M., AGARWAL, A., SCOTT, W.K., GILBERT, J.R., MCDOWELL, J.G., BAZYK, A., GAS, D.M., HAINES, J.L. AND PERICAK-VANCE, M.A.** (2000) Association of the Apolipoprotein E gene with age-related macular degeneration: Possible effect modification by family history, age, and gender. *Mol. Vis.* **6**: 287-293.
- SCHWORM, H.D., ULBIG, M.W., HOOPS, J., RUDOLPH, G., WEBER, B.H.F., EHRT, O. UND BOERGEN, K.P.** (1998) North-Carolina-Makuladystrophie; Hereditäre Makulaerkrankung mit guter funktioneller Prognose. *Ophthalmologe* **95**: 13-18.
- SEDDON, J.M., AJANI, U.A., SPERDUTO, R.D. HILLER, R., BLAIR, N., BURTON, T.C., FARBER, M.D., AGOUDAS, E.S., HALLER, J., MILLER, D.D., YANNUZZI, L.A. AND WILLET, W.** (1994) Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. Eye Disease Case-Control Study Group. *JAMA* **272**: 1413-1420.
- SEDDON, J.M., WILLETT, W.C., SPEIZER, F.E. AND HANKINSON, S.E.** (1996) A prospective study of cigarette smoking and age-related maculopathy. The Blue Mountains Eye Study. *Arch. Ophthalmol.* **114**: 1518-1523.
- SEDDON, J.M., AJANI, U.A. AND MITCHELL, B.D.** (1997) Familial aggregation of age-related maculopathy. *Am. J. Ophthalmol.* **123**: 199-206.
- SHASTRY, B.S., HEJTMANCIK, F.J. AND TRESE, M.T.** (1999) Recurrent missense (R197C) and nonsense (Y89X) mutations in the XLR51 gene in families with X-linked retinoschisis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **256**: 317-319.
- SHEFFIELD, J.B. AND LI, H.P.** (1987) Interactions among cells of the developing neural retina in vitro. *Am. Zool.* **27**: 145-159.
- SHINODA, K., MASHIMA, Y., ISHIDA, S. AND OGUCHI, Y.** (1999) Severe juvenile retinoschisis associated with a 33-bp deletion in the XLR51 gene. *Ophthalmic Genet.* **20**: 57-61.
- SILVESTRI, G.** (1997) Age-related macular degeneration: genetics and implications for detection and treatment. *Mol. Med. Today* **3**: 84-91.
- SIEVING, P.A., BINGHAM, E.L., KEMP, J., RICHARDS, J. AND HIRIYANNA, K.** (1999) Juvenile X-linked retinoschisis from XLR51 Arg213Trp mutation with preservation of the electroretinogram scotopic b-wave. *Am. J. Ophthalmol.* **128**: 179-184.

- SMALL, K.W.** (1989) North Carolina macular dystrophy, revisited. *Ophthalmology* **96**: 1747-1754.
- SMALL, K.W., KILLIAN, J. AND MCLEAN, W.L.** (1991) North Carolina's dominant progressive foveal dystrophy : how progressive is it ? *Br. J. Ophthalmol.* **75**: 401-406.
- SMALL, K.W., HERMSEN, V., GUERNEY, N., FETKENHOUR, C.L. AND FOLK, J.C.** (1992a) North Carolina macular dystrophy and central areolar pigment epithelial dystrophy. One family, one disease. *Arch. Ophthalmol.* **110**: 515-518.
- SMALL, K.W., WEBER, J.L., ROSES, A., IENNON, F., VANCE, J.M. AND PERICAK-VANCE, M.A.** (1992b) North Carolina macular dystrophy is assigned to chromosome 6. *Genomics* **13**: 681-685.
- SMALL, K.W., WEBER, J.L., ROSES, A. AND PERICAK-VANCE, M.A.** (1993) North Carolina macular dystrophy (MCDR1). A review and refined mapping to 6q14-q16.2. *Ophthalmol. Paediatr. Genet.* **14**: 143-150.
- SMALL, K.W., PUECH, B., MULLEN, L. AND YELCHITS, S.** (1997) North Carolina macular dystrophy phenotype in France maps to the MCDR1 locus. *Mol. Vis.* **3**: 1-6.
- SMITH, R.F., WIESE, B.A., WOJZYNSKI, M.K., DAVISON, D.B. AND WORLEY, K.C.** (1996) BCM Search Launcher--An Integrated Interface to Molecular Biology Data Base Search and Analysis Services Available on the World Wide Web. *Genome Res.* **6**:454-62.
- SPALTON, D.J., HITCHINGS, R.A. AND HOLDER, G.E.** (1993) Methods of ocular examination. In *Atlas of clinical Ophthalmology, 2<sup>d</sup> edition* (Hrsg. Spalton, D.J., Hitchings, R.A. und Hunter, P.A.), Mosby-Year Book Europe Limited, London, 1-30.
- SPIELMAN, R.S., MCGINNIS, R.E. AND EWENS, W.J.** (1993) Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependant diabetes mellitus (IDDM). *Am. J. Hum. Genet.* **52**: 506-516.
- SPRINGER, W.R., COOPER, D.N. AND BARONDES, S.H.** (1984) Discoidin I is implicated in cell-substratum attachment and ordered cell migration of Dictyostelium discoideum and resembles fibronectin. *Cell* **39**: 557-564.
- SOUIED, E.H., BENLIAN, P., AMOUYEL, P., FEINGOLD, J., IAGARDE, J.P., MUNNICH, A., KAPLAN, J., COSCAS, G. AND SOUBRANE, G.** (1998) The epsilon4 allele of the apolipoprotein E gene as a potential protective factor for exudative age-related macular degeneration. *Am. J. Ophthalmol.* **125**: 353-359.
- SOUTHERN, E.M.** (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- SORSBY, A., MASON, M.E.J. AND GARDENER, N.** (1949) A fundus dystrophy with unusual features. *Br. J. Ophthalmol.* **33**: 67-97.
- SUNNESS, J.S.** (1999) The natural history of geographic atrophy, the advanced atrophic form of age-related macular degeneration. *Mol. Vis.* **5**: 25.
- STEINBERG, R.H., LINSSENMEIER, R.A. AND GRIFF, E.R.** (1983) Three light-evoked responses of the retinal pigment epithelium. *Vision Res.* **23**: 1315-1323.
- STÖHR, H.** (1998) Die Bestsche Makuladystrophie (VMD2): Molekulargenetische Untersuchungen zur Identifizierung des genetischen Defekts. *Dissertation*, Universität Würzburg, Fakultät für Biologie.

- STONE, E.M. AND SHEFFIELD, V.C.** (1994) The molecular genetic approach to macular degeneration. In *Molecular genetics of inherited eye disorders*. (Hrsg. Wright, A.F. und Jay, B.), Harwood Academic Publishers, Chur, Schweiz, 173-195.
- STONE, E.M., WEBSTER, A.R., VANDENBURGH, K., STREB, L.M., HOCKEY, R.R., LOTERY, A.J. AND SHEFFIELD, V.C.** (1998) Allelic variation in ABCR associated with Stargardt disease but not age-related macular degeneration. *Nat. Genet.* **20**: 328-329.
- STONE, E.M., LOTERY, A.J., MUNIER, F.L., HÉON, E., RIGUET, B., GUYMER, R.H., VANDENBURGH, K., COUSIN, P., NISHIMURA, D., SWIDERSKI, R.E., SILVESTRI, G., MACKEY, D.A., HAGEMAN, G.S., BIRD, A.C., SHEFFIELD, V.C. AND SCHORDERET, D.F.** (1999) A single EFEMP1 mutation associated with both Malattia Leventinese and Doyme honeycomb retinal dystrophy. *Nat. Genet.* **22**: 199-202.
- STRADER, C.D., FONG, T.M., TOTA, M.R. AND UNDERWOOD, D.** (1994) Structure and function of G-protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **63**: 101-132.
- STROM, T.M., NYAKATURA, G., APFELSTEDT-SYLLA, E., HELLEBRAND, H., LORENZ, B., WEBER, B.H.F., WUTZ, K., GUTWILLINGER, N., RÜTHER, K., DRESCHER, B., SAUER, C., ZRENNER, E., MEITINGER, T., ROSENTHAL, A. AND MEINDL, A.** (1998) An L-type calcium-channel gene mutated in incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nature Genet.* **19**: 260-263.
- STUBBS, J.D., IEKUTIS, C., SINGER, K.L., BUI, A., YUZUKI, D., SRINIVASAN, U. AND PARRY, G.** (1990) cDNA cloning of a mouse mammary epithelial cell surface protein reveals the existence of epidermal growth factor-like domains linked to factor VIII-like sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 8417-8421.
- SUNNESS, J.S., GONZALEZ-BARON, J., BRESSLER, N.M, HAWKINS, B AND APPEGATE, C.A.** (1999) The Development of Choroidal Neovascularization in Eyes with the Geographic Atrophy Form of Age-related Macular Degeneration. *Ophthalmology* **106**: 910-919.
- TAKAGI, S., HIRATA, T., AGATA, K., MOCHII, M., EGUCHI, G. AND FUJISAWA, H.** (1991) The A5 antigen, a candidate for the neuronal recognition molecule, has homologies to complement components and coagulation factors. *Neuron* **7**: 295-307.
- TAKAGI, S., KASUYA, Y., SHIMIZU, M., MATSUURA, T., TSUBOI, M., KAWAKAMI, A. AND FUJISAWA, H.** (1995) Expression of a cell adhesion molecule, neuropilin, in the developing chick nervous system. *Dev. Biol.* **170**: 207-222.
- TAKETANI, R., YOKOYAMA, T., HOTTA, Y., IWATA, F., YAZAWA, K., FUJIKI, K. AND KANAI, A.** (1999) A case of juvenile retinoschisis diagnosed by analysis of the XLR51 gene. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* **103**: 817-820.
- TARTTELIN, E.E., KIRSCHNER, L.S., BELLINGHAM, J., BAFFI, J., TAYMANS, S.E., GREGORY-EVANS, K., CSAKY, K., STRATAKIS, C.A. AND GREGORY-EVANS, C.Y.** (1999) Cloning and characterization of a novel orphan G-protein-coupled receptor localized to human chromosome 2p16. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **260**: 174-80.
- TELENIUS, H., CARTER, N.P., BEBB, C.E., NORDENSKJOLD, M., PONDER, B.A. AND TUNNAcliffe, A.** (1992) Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* **13**: 718-725.
- THE RETINOSCHISIS CONSORTIUM** (1998) Functional implications of the spectrum of mutations found in 234 cases with X-linked juvenile retinoschisis (XLR5). *Hum. Mol. Genet.* **7**: 1185-1192.

- TRUETT, M.A., BLACHER, R., BURKE, R.L., CAPUT, D., CHU, C., DINA, D., HARTOG, K., KUO, C.H., MASIARZ, F.R., MERRYWEATHER, J.P. NAJARIAN, R., PACHL, C., POTTER, S.J., PUMA, J., QUIROGA, M., RALL, L.B., RANDOLPH, A., URDEA, M.S., VALENZUELA, P., DAHL, H.-H.M., FAVALARO, J., HANSEN, J., NORDFANG, O. AND EZBAN, M.** (1985) Characterization of the polypeptide composition of human factor VIII:C and the nucleotide sequence and expression of the human kidney cDNA. *DNA* **4**: 333-349.
- UBERBACHER, E.C. AND MURAL, R.J.** (1991) Locating protein-coding regions in human DNA sequences by a multiple sensor-neural network approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 11261-11265.
- VALDES, J.M., TAGLE, D.A. AND COLLINS, F.S.** (1994) Island rescue PCR: a rapid and efficient method for isolating transcribed sequences from yeast artificial chromosomes and cosmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 5377-5381.
- VAN DE VOSSE, E., BERGEN, A.A., MEERSHOEK, E.J., OOSTERWIJK, J.C., GREGORY, S., BAKKER, B., WEISENBACH, J., COFFEY, A.J., VAN OMMEN, G.J. AND DEN DUNNEN, J.T.** (1996) An Xp22.1-p22.2 YAC contig encompassing the disease loci for RS, KFSD, CLS, HYP and RP15: refined localization of RS. *Eur. J. Hum. Genet.* **4**: 101-104.
- VOGELSTEIN, B. AND GILLESPIE, D.** (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 615-619.
- VOGELSTEIN, B. AND FEINBERG, A.** (1984) A technique for radiolabeling DNA restriction fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **137**: 266-267.
- VOGT, A.** (1925) Die Ophthalmoskopie im rotfreien Licht. In *Graefe Saemisch Handbuch der gesamten Augenheilkunde*. 3. Ausgabe, Berlin; Springer, 1-118.
- WALPOLE, S.M., NCOLAOU, A., HOWELL, G.R., WHITTAKER, A., BENTLEY, D.R., ROSS, M.T., YATES, J.R.W. AND TRUMP, D.** (1997) High-resolution physical map of the X-linked retinoschisis interval in Xp22. *Genomics* **44**: 300-308.
- WARNEKE-WITTSTOCK, R., MARQUARDT, A., GEHRIG, A., SAUER, C.G., GESSLER, M. AND WEBER, B.H.F.** (1998) Transcript amp of a 900-kb genomic region in Xp22.1-p22.2: Identification of 12 novel genes. *Genomics* **51**: 59-67.
- WEBER, B.H., VOGT, G., PRUETT, R.C., STÖHR, H. AND FELBOR, U.** (1994) Mutations in the tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3) in patients with Sorsby's fundus dystrophy. *Nat. Genet.* **8**: 352-356.
- WEBER, B.H.F., JANOCHA, S., VOGT, G., SANDER, S., EWING, C.C., ROESCH, M. AND GIBSON, A.** (1995) X-linked juvenile retinoschisis (RS) maps between DXS987 and DXS443. *Cytogenet. Cell. Genet.* **69**: 35-37.
- WEBER, B.H.F.** (1997) Die Genetik der Makuladegenerationen. *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* **210**: 9-17.
- WEEKS, D.E., CONLEY, Y.P., MAH, T.S., PAUL, O., MORSE, L., NGO-CHANG, J., DAILEY, J.P., FERRELL, R.E. AND GORIN, M.B.** (2000) A full genome scan for age-related maculopathy. *Hum. Mol. Genet.* **9**: 1329-1349.
- WERNER, J.M., KNOTT, V., HANDFORD, P.A., CAMPELL, I.D. AND DOWNING, A.K.** (2000) Backbone dynamics of a cbEGF domain pair in the presence of calcium. *J. Mol. Biol.* **296**: 1065-1078.
- WETZEL, R.K., ARYSTARKHOVA AND SWEADNER, K.J.** (1999) Cellular and subcellular specification of Na,K-ATPase  $\alpha$  and  $\beta$  isoforms in the postnatal development of mouse retina. *J. Neurosci.* **19**: 9878-9889.

- WIEACKER, P., WIENKER, T.F., DALLAPICCOLA, B., BENDER, K., DAVIES, K.E. AND ROPERS, H.H.** (1983) Linkage relationships between Retinoschisis, Xg, and a cloned DNA sequence from the distal short arm of the X chromosome. *Hum. Genet.* **64**: 143-145.
- WINSHIP, P.R. AND DRAGON A.C.** (1991) Identification of haemophilia B patients with mutations in the two calcium binding domains of factor IX: importance of a  $\beta$ -OH Asp-64 $\rightarrow$ Asn change. *Br. J. Haematol.* **77**: 102-109.
- WOOSTER, R., BIGNELL, G., LANCASTER, J., SWIFT, S., SEAL, S., MANGION, J., COLLINS, N., GREGORY, S., GUMBS, C., MICKLEM, G., BARFOOT, R., HAMOUDI, R., PATEL, S., RICE, C., BIGGS, P., HASHIM, Y., SMITH, A., CONNOR, F., ARASON, A., GUDMUNDSSON, J., HCENEC, D., KEISELL, D., FORD, D., TONIN, P., BISHIP D. T., SPURR, N. K., PONDER, B.A.J., EELES, R., PETO, J., DEVILEE, P., CORNELISSE, C., LYNCH, H., NAROD, S., LENOIR, G., EGILSSON, V., BARKADOTTIR, R.B., EASTON, D.F., BENTLEY, D.R. FUTREAL, P.A., ASHWORTH, A. AND STRATTON, M.R.** (1995) Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* **378**: 789-792.
- WU, A.L., WANG, J., ZHELEZNYAK, A. AND BROWN, E.J.** (1999) Ubiquitin-related proteins regulate interaction of vimentin intermediate filaments with the plasma membrane. *Mol. Cell* **4**: 619-625.
- WU, C., ZHU, S., SIMPSON, S. AND DEJONG, P.** (1996) DOP-vector PCR: A method for rapid isolation and sequencing of insert termini from PAC clones. *Nucleic Acids Res.* **24**: 2614-2615.
- YANG, X., CHUNG, D. AND CEPKO, C.L.** (1993) Molecular cloning of the murine JAK1 protein tyrosine kinase and its expression in the mouse central nervous system. *J. Neurosci.* **13**: 3006-3017.

## VII. Publikationen

### 1. Begutachtete bzw. eingereichte Veröffentlichungen

- SAUER, C.G., GEHRIG, A., WARNEKE-WITTSTOCK, R., MARQUARDT, A., EWING, C.C., GIBSON, A., LORENZ, B., JURKLIES, B. AND WEBER B.H.F.** (1997) Positional cloning of the gene associated with X-linked juvenile retinoschisis. *Nat. Genet.* **17**: 164-170.
- SAUER, C.G., SCHWORM, H.D., ULBIG, M., BLANKENAGEL, A., ROHRSCHEIDER, K., PAULEIKHOFF, D., GRIMM, T. AND WEBER B.H.F.** (1997) An ancestral core haplotype defines the critical region harbouring the North Carolina macular dystrophy gene (MCDR1). *J. Med. Genet.* **34**: 961-966.
- PAULEIKHOFF, D., SAUER, C.G., MÜLLER, C.R., RADEMACHER, M., MERZ, A. AND WEBER, B.H.F.** (1997) Clinical and Genetic Evidence for Autosomal Dominant North Carolina Macular Dystrophy in a German Family. *Am. J. Ophthalmol.* **124**: 412-415.
- KOEHLER, M.R., SAUER, C.G., REISMANN, N., STEINLEIN, C., WEBER, B.H.F., WILL, H. AND SCHMID, M.** (1998) Localization of the human membrane-type 2 matrix metalloproteinase gene (MMP15) to 16q12.1 near DNA elements that are part of the centromeric and non-centromeric heterochromatin of 11 human chromosomes. *Chromosome Research* **6**: 199-203.
- STROM, T.M., NYAKATURA, G., APFELSTEDT-SYLLA, E., HELLEBRAND, H., LORENZ, B., WEBER, B.H.F., WUTZ, K., GUTWILLINGER, N., RÜTHER, K., DRESCHER, B., SAUER, C., ZRENNER, E., MEITINGER, T., ROSENTHAL, A. AND MEINDL, A.** (1998) An L-type calcium-channel gene mutated in incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat. Genet.* **19**: 260-263.
- WARNEKE-WITTSTOCK, R. MARQUARDT, A., GEHRIG, A., SAUER, C.G., GESSLER, M. AND WEBER, B.H.F.** (1998) Transcript map of a 900-kb Genomic Region in Xp22.1-p22.2: Identification of 12 Novel Genes. *Genomics* **51**: 59-67.
- FELBOR, U., GEHRIG, A., SAUER, C.G., MARQUARDT, A., KÖHLER, M., SCHMID, M. AND WEBER, B.H.F.** (1998) Genomic organization and chromosomal localization of the interphotoreceptor matrix proteoglycan-1 (IMPG1) gene: a candidate for 6q-linked retinopathies. *Cytogenet. Cell Genet.* **81**: 12-17.
- GEHRIG, A.E., WARNEKE-WITTSTOCK, R., SAUER, C.G. AND WEBER, B.H.F.** (1999) Isolation and characterization of the murine X-linked juvenile retinoschisis (*Rs1h*) gene. *Mamm. Genome* **10**, 303-307.
- SAUER, C.G., WHITE, K., KELLNER, U., RUDOLPH, G., JURKLIES, B., PAULEIKHOFF, D. AND WEBER, B.H.F.** (2001) EFEMP1 is not associated with sporadic early onset drusen. *Ophthalmic Genet.* **22**: 27-34.
- MOLDAY, LL, HICKS, D., SAUER, C.G., WEBER, B.H.F. AND MOLDAY, R.S.** (2001) X-linked juvenile retinoschisis protein RS1 is expressed in photoreceptor and bipolar cells. *Invest. Ophthalmol. Vis Sci.* **42**: 816-825.

**SAUER, C.G., WHITE, K., STÖHR, H., BERNSTEIN, P.S., HOLZ, F., LEWIS, R.A., PAULEIKHOFF, D., SCHÜTT, F., SIMONELLI, F., ALLIKMETS, R. AND WEBER, B.H.F.** Evaluation of the G protein-coupled receptor-75 (GPR75) in age-related macular degeneration (AMD). *Br. J. Ophthalmol.*, submitted.

## 2. Kongreßbeiträge

**SAUER, C. AND WEBER, B.H.F.** (1996) The search for new members of the TIMP gene family. *8. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik in Göttingen. Posterpräsentation.*

**PAULEIKHOFF, D., WEBER, B.H.F., SAUER, C., RADEMACHER, M., JURKLIES, C., LAINK, A. AND BIRD, A.C.** (1996) Dominant macular dystrophy similar to North Carolina macular dystrophy in a german family. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **37**: 998. *Annual meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology in Fort Lauderdale (USA).*

**SAUER, C.G., PAULEIKHOFF, D., ULBIG, M., SCHWORM, H.D., BLANKENAGEL, A., ROHRSCHEIDER, K. AND WEBER, B.H.F.** (1997) Genetic linkage analysis in German pedigrees with clinical features suggestive of NCMD and CAPED. *9. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik in Innsbruck. Posterpräsentation (Posterpreis).*

**WARNEKE, R., SAUER, C.G. AND WEBER, B.H.F.** (1997) X-linked juvenile retinoschisis: Construction of a P1/PAC contig in the DXS418-DXS999 interval and generation of a transcription map by exon trapping. *9. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik in Innsbruck.*

**WEBER, B.H.F., SAUER, C., PAULEIKHOFF, D., ULBIG, M., SCHWORM, H.D., BLANKENAGEL, A. AND ROHRSCHEIDER, K.** (1997) Genetic linkage analysis in German pedigrees with clinical features suggestive of NCMD and CAPED. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **38**: 794. *Annual meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology in Fort Lauderdale (USA).*

**WEBER, B.H.F., GEHRIG, A., WARNEKE-WITTSTOCK, R. AND SAUER, C.G.** (1997) Towards cloning the gene causing X-linked juvenile retinoschisis (RS): Generation of a transcript map of the RS locus in Xp22.2 and analysis of candidate genes. *47. Annual Meeting of The American Society of Human Genetics in Baltimore (USA).*

**SAUER, C.G., GEHRIG, A., STUHRMANN, M., BHATTACHARYA, S.S. AND WEBER, B.H.F.** (1998) Cloning and characterization of a retina-specific gene from 2p16: A candidate gene for Doyme honeycomb retinal dystrophy and Malattia leventinese. *10. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik in Jena. Posterpräsentation.*

**WARNEKE-WITTSTOCK, R., MARQUARDT, A., SAUER, C., GEHRIG, A. AND WEBER, B.H.F.** (1998) Transcription map of a 900 kb region around the X-linked juvenile retinoschisis gene locus. *10. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik in Jena.*

**BECKER, S., BUCHNER, S., HUMMEL, T., KÖHLER, M., KURZ, B., REICH, J., REISCH, D., SAUER, C., SCHAUPP, M., SCHMID, M., WEBER, B.H.F. AND BUCHNER, E.** (1998) HSAP47 and HBLP are human members of two novel protein families defined by genes cloned in *Drosophila*. *Projektleitertreffen des DHGP.*

- SAUER, C.G. AND WEBER, B.H.F.** (1999) Assessment of a novel retinal gene, pNEU60, in age related macular degeneration (AMD). *11. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik in Nürnberg. Posterpräsentation.*
- BECKER, S., HUBER, S., BRUNNER, M., SAUER, C., WEBER, B.H.F., KÖHLER, M., SCHMID, M., REIN, K., BROSE, N., SCHMIDT, A., LESCH, K.P., RUMP, A., ROSENTHAL, A. AND BUCHNER, E.** (1999) Characterization of HSAP47 and HBLP, human members of two novel conserved protein families identified in *Drosophila*. „German Human Genome Project – Implications, Progress, and the Future” in Neuherberg.
- SAUER, C.G. AND WEBER, B.H.F.** (2000) Assessment of EFEMP1 in non-familial cases of dominant drusen and Doyme honeycomb retinal dystrophy (DHRD). *12. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik in Lübeck. Posterpräsentation.*
- WUTZ, K., ALITALO, T., APFELSTEDT-SYLLA, E., DE LA CHAPELLE, A., LORENZ, B., MEINDL, A., SAUER, C. AND WEBER, B.H.F.** (2000) High prevalence of CACNA1F mutations in families with incomplete XLCSNB but not in related eye diseases. *European Human Genetics Conference in Amsterdam.*
- MOLDAY, R.S., MOLDAY, L.L., SAUER, C.G., HICKS, D. AND WEBER, B.H.F.** (2000) Characterization and localization of RS1, the protein encoded by the gene for X-linked juvenile retinoschisis. *Invest. Ophthalmol. Vis Sci.* **41**: 330. *Annual meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology in Fort Lauderdale (USA).*



## VIII. Anhang

### A. Chemikalien und Enzyme

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen:

**Amersham Pharmacia Biotech**, Freiburg; **BioRad**, München; **Biomol**, Hamburg; **Biozym**, Hameln; **Difco**, Detroit, USA; **Eurogentec**, Seraing, Belgien; **Fluka**, Neu-Ulm; **Life Technologies**, Eggenstein; **Merck**, Darmstadt; **New England Biolabs**, Schwalbach; **Roche**, Mannheim; **Roth**, Karlsruhe; **Serva**, Heidelberg; **Sigma**, München.

Radiochemikalien lieferten die Firmen **Amersham Pharmacia Biotech**, Freiburg und **Hartmann**, Braunschweig.

### B. Synthetische Nukleinsäuren und Nukleotide

dNTPs	Pharmacia, Freiburg
pd(N) <sub>6</sub>	Pharmacia, Freiburg

#### *synthetische Oligonukleotide*

Die Oligonukleotide wurden am **Institut für Biochemie**, Universität Würzburg; bei **Interactiva Biotechnologie**, Ulm; **Life Technologies**, Eggenstein; **Metabion**, Martinsried und **MWG-Biotech AG**, Eberstadt synthetisiert.

#### Allgemeine Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5' @ 3')
3'RACEAP	GGCCACGCGTCTGACTAGTACT(TTT) <sub>8</sub> (AGC)
5'AAP	GGCCACGCGTCTGACTAGTACGGGII GGGII GGGII G
5'AUAP	GGCCACGCGTCTGACTAGTAC
6-MW	CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG

#### Human-spezifische Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5' @ 3')
245263-f	CCCGATGTGATGGTGACAGG
245263-r	CTTTGTTCTGACTTTCTCTGGC
245638-f	GAGAGCCAGCACCTGCGG
245638-r	GGGTGCGAGCTGAAGTTGG
418(-CA)-F	GTGAGGAAACTCAACAGTC
418(-CA)-R	GAAAAGACATCTCATGCTAA
9orf1rev	GAAGAATACCAGCCACATAC
91.int-F	GGGGAATGGGGTTGAAG
91.int-R	TGCACCACCAACAGCTC
A002T41-F	GTACAAGGGATAGACAGCACAG
A002T41-R	TAGGTGTAATGAGAGACCATG
A006B27-F	TGATACGTGAATGTTAGTCC
A006B27-R	AAACTAATGCCTAATAAGGG
AA025692-F	TTACATTCATAAACTGCTG
AA025692-R	CTTACTATTTCTGTCACTTGG
AFM059xh8a	GTGAAACCCTGTCTCACTGC
AFM059xh8m	GGATTTATAGGACCATGCCA
AFM079XG9.a	AAGGTGCCAGGTAGAATCCC
AFM079XG9.m	TGGGCAGTCTCTCAAAAAGC
AFM183yh4a	GGGACTTCTAGCCTCCATA
AFM183yh4m	AAGGGTCTTTGGTATTAGAGTTC
AFM212zf10a	AGAGAAITGCTTGAGCCC

Bezeichnung	Sequenz (5' @ 3')
AFM212zf10m	GGTGTGAAGTCTCCAACCTG
AFM220zf6a	CACAATCATATGTNCCAATT
AFM220zf6m	ATTAATGTGCATACGCAAA
AFMa223wd9a	GCCATTACAGTAAAGTCTCCC
AFMa223wd9m	TCTGGGGTGGAAAACATC
AFMb031ye9a	AGGAAGACTCCACCTCATTT
AFMb031ye9m	AGGTAACACCNACAGCAAAT
AFMc012yd5a	GATCCACCTCACCCCTC
AFMc012yd5m	CACCCGCATGTGTATG
Alu1	GGATTACAGGYRTGAGCCA
Alu2	RCCAYTGCACTCCAGCCTG
BCD1993-F	TTTGCCAAAATAAAGTTTCAGC
BCD1993-R	GTCTTTGCCCTTTGAATTCGC
Cda10d06-F	CTTCAGCATAGAGTCTGTGGG
Cda10d06-R	ATGGCAAGGGCAAAGGAC
D2S2153-F	CCTCAGGGACTTGGTTAACAG
D2S2153-R	CCTTTGGGAAATGCTGATTG
D2S2156-F	GGGTATCCACTTCAAGTTC
D2S2156-R	AGCCATAATAAATAAGCAACTGAG
D2S2251-F	AATGGATCTTTACGAAAAGG
D2S2251-R	AACTACCCTCTGTGAGTGA
D2S2352-F	TCACCGTCTGGACTC
D2S2352-R	GGGCAAAATTCGACTATTA
D2S2739-F	CTGGTGTTTAGAATATCTGTCTAGG
D2S2739-R	ATCTGTATTCACTTTAACTGAGGC
D2S378-F	TGTGGCTGTGCAGATATTC
D6S1043-F	CAAGGATGGGTGGATCAATA
D6S1043-R	TTGTATGAGCCACTTCCCAT
D6S1543-F	CTGAGATAGAGTAGTACCACGCG
D6S1543-R	GTGGAACATAAAGCAGCCC
D6S1565-F	GTAAGGCAAAATCATCTGGC
D6S1565-R	TGTGCCAGGGCAAGATC
D6S1671-F	TTTGCTCAATTTCAATCTGTAG

Bezeichnung	Sequenz (5' @ 3')
D6S1671-R	ATCCTCCAGGGGTGCT
D6S1716-F	TTGTTTGGGTTTGTCTCTCC
D6S1716-R	GCACCTCAGCCCAAAATAGAT
D6S1717-F	GGGATGTTGAGAATGTTGTC
D6S1717-R	GGGGGCTCTATCTCTAAAATT
D6S261-F	GTGAAACCCCTGTCTCACTGC
D6S261-R	GGATTTATAGGACCATGCCA
D6S262-1	ATTCTTACTGCTGAAAACCAT
D6S262-2	GGAGCATAGTTACCCTTAAAATC
D6S286-1	GGCCCGCATCACCCCTAAT
D6S286-2	CCAATCGTGCATCCAAAGA
D6S300-F	AGATACATTGACATTTCTCCGC
D6S300-R	TCAAAAGCCAAAAGCCTACT
DXS999-a	TAACAACCTAGACTTCAACC
DXS999-m	CAGTTTCACAATCTCTGCC
DHRD-3UTR-F	AAGTGGAAATGGGCAGAAA
DHRD-3UTR-R	TTACGCAAAAGGAACAAA
DHRD-91.r1	ATCTTCACTCCACACAGCCAC
DHRD-91.r10	AACTGGAGCCTGAAAAAAC
DHRD-91.r12	GCATCATCCAGAGCGGCA
DHRD-91.r13	GGTCCGGAATGGCAGATG
DHRD-91.r2	CCAGTTCAAGGCTTCACTAC
DHRD-91.r3	TGTAGCAGGAGGTTGGAGAT
DHRD-91.r4	GTCTGTGTGCTGCTCTCC
DHRD-91.r5	CAGAAAACAAATCCTCCATC
DHRD-91.r6	CTTTCTGTTTCTGGTGGTG
DHRD-91.r7	TAATCCCTTTCTGTTTCTGG
DHRD-91.r8	CTCTGGCCGGCTCTTGC
DHRD-91.r9	AACTCTTTGGATTTGCC
DHRD-91.s1	TCTGCTTGGCTGANGTGCTG
DHRD-91.s10	TGCCGCTCTGGATGATGC
DHRD-91.s11	GAAAGAAAACATAACTGCC
DHRD-91.s12	TGAGGTGACGGTAAGGAGGC
DHRD-91.s2	CTNTGGCTTTGGAGATAACA
DHRD-91.s3	AGGTTGATGGCTGATACGAG
DHRD-91.s4	AGGACAAGAGACAATGAAG
DHRD-91.s5	TGCTCCCAAAAATACTCAG
DHRD-91.s6	AAACTGGTAAAGAAATGAAG
DHRD-91.s7	CCGGCATGGCACACTGGAT
DHRD-91.s8	CGATCACTGCCACTGTCTTC
DHRD-91.s9	GGGTTTGTCTCTCTCCAG
DXS257-f	ACACAACAAAATATCTAGGC
DXS257-r	TCTTCATGCTAGATGGTTTC
EFEMP1_ex10-F	CTTGCAAAAGAAATCTGCCA
EFEMP1_ex10-R	TCCTCACTTTCAAAGTTCTGATT
EFEMP1_ex11A-F	ACCAAGCCAAACTGCTGAAT
EFEMP1_ex11A-R	AAAAGTATTGATGGTGGGCA
EFEMP1_ex11B-F	TGCCATCAGACATCTTCCAG
EFEMP1_ex11B-R	AATGTTGCTTCTCTCCACA
EFEMP1_ex12-F	GCATAGAACTCCAATCCAAGAA
EFEMP1_ex12-R	TGCCCTGTGGTTGACTCTTAGAA
EFEMP1_ex3-F	GTTTTGTTACTTTCCCGGCA
EFEMP1_ex3-R	ACTGGCAGGGGTGTGTAAG
EFEMP1_ex4-F	CCAATTAAGTGTCTCTGGC
EFEMP1_ex4-R	AAGGCAATGATCACATGGAAG
EFEMP1_ex5A-F	CATGTTTGATTTTCCCTCTTAGAA
EFEMP1_ex5A-R	ATGCTGTGGCAGCTACAACC
EFEMP1_ex5B-F	AACTCAGGGGCAACCAC
EFEMP1_ex5B-R	TTCAATGGTTAGGAAAAGTATTCT
EFEMP1_ex6-F	TGACAATTTCTTCTGTGTGCAT
EFEMP1_ex6-R	CTCAAAGCAGGACCCGTGCTC
EFEMP1_ex7-F	TTCTCTTTGTGTGTGTGCTG
EFEMP1_ex7-R	TGGGGTTTCTTTTGTGAAG
EFEMP1_ex8-F	CAAAAAGATAAGGATATGTTAAAGTC
EFEMP1_ex8-R	GGCTTTATTCCATACTCTGGG
EFEMP1_ex9-F	TGGTCACAAAATTTCAACTC
EFEMP1_ex9-R	TCCTCTGTCTCTCTCTGGC
EFEMP1mut-F1	AATGAGTGTGAGACCAAAATG
EFEMP1mut-R	TGACAAGGATTTCTGTGATAAC
GATA-P6995-F	GCTGGAACTGATAAGGGCT
GATA-P6995-R	GCCACCCTGGCTAAGTTACT
GATA-P9365-F	TTCTACAGAAAACAGAACCAATAG
GATA-P9365-R	AGGTGAGCCAATGGCCATAT
GUS B6F	GATCCACCTCTGATGTTAC
GUS B7R	CCTTTAGTGTCCCTGCTAG
Mfd 171-1	TGAAAAGAAAGTCTGCTTCT
Mfd 171-2	ATGGCTCAGGATTACATTTG
Mfd 97-1	TTCTATTTCTGAAGTGAACCTA
Mfd 97-2	ATAGTTACCATCAGTCACTG
N26021-F	AAGAGACTCCGACAACAAGC
N26021-R	ATCATTGTTTCTGTTGGG
N34878-F	GGTACATGTGAACACATCCC
N34878-R	ATTGTTTTGAGTGATGACGC
N50531-F	TAAAATTTGTTGTTGGTGG
N50531-R	CAGAGGGAAGATGCTAAGTC
rsc4F	GGTTTCCAGTCAGGGGAGGT
rsc5R	CTGCTCTTTGARTADATCCA
rsc6R	GACGCACTCCAGCAGTCCAT
rshn4r-Sal/Spe	CGCTCGACTAGTACCTCCCTGACTCGAAACC
rstu12-1f	CTCAGCCAAAGACCTAAGAAC
rstu12-1r	GTATGCAATGAATGTCAATGG
rstu12-2f	GTGATGCTGTTGGATTTCTC
rstu12-2r	CAAAGTGATAGTCTCTATG
rstu12-3f	CTGCCCTGCCTCTCTGGTTG
rstu12-3r	GGTGTCCCAATGACTGTCTC

Bezeichnung	Sequenz (5' @ 3')
rstu12-f	GGTGCTTGTGAGTATTGAG
R1-EcoRI-F	CCGGAATTCATCTATCCACAGCCAC
S8-BamHI-R	CGCGGATCCCGATCACTGCCACTGCTTC
SG8564-F	GTTTTGACTGTAGCAAATGTTG
SG8564-R	CCTCTGTGATTTTATTCTAAC
SGC35870-F	AAAACATCCCTCGCTCCAC
SGC35870-R	CCATACTGTGCCTCACTC
stSG16444-F	TAGCTCTGTCTCGCTGG
stSG16444-R	CCCTTGAGAAAGGCTCAC
stSG21421-F	TACACCTTGACACAGAGCAG
stSG21421-R	TGTTTTACAGACTCCATAGG
stSG31419-F	TGACACAATGAGGGCAAAGC
stSG31419-R	TCCCTGCCTACTTTTCTGTC
stSG4145-F	ATATGCATTCCTTTAAGGC
stSG4145-R	ATGGGGTAGTAATAATGTATACC
stSG4331-F	GTTCAGAAAACAAATATACAGCC
stSG4331-R	ACAACAGATACAGCCATGCC
stSG447-F	AAAGTTGAACAGCCAGTGCC
stSG447-R	TCAAATGAAGTCTCAGTGAGAC
stSG8460-F	GCAGATGTGTTTTGTTGGC
stSG8460-R	CTTGAGGACTCGCTCACTC
stSG9653-F	CTTTATTTGATGTCTCGCC
stSG9653-R	CGCAGTAGGGTGAAAAGG
tu12ex4-rev	AAAATCCCGGGCCCTGC
WI-11560-F	CTTTATACAGGGATTACGCC
WI-11560-R	TTGCAACACACCCCTGTACAG
WI-16857-F	ATTATAATCCATCTCCAACAC
WI-16857-R	TTGTTTCTGATGGTTCC
ys86-f	TTGGATAGAAATGCCTGAAC
ys86-r	TGACAAAAGTTTCAAACATG
9orf1-rev	GAAGAATACCAGCCACATAC

**Maus-spezifische Oligonukleotide**

Bezeichnung	Sequenz (5' @ 3')
Crx-F	GTCCCCACCTCCTGTGTCAG
Crx-R	CCTCAAGTTCACAGCAATCC
Jak1-F	ATGTCCACCCAACCTGTCTG
Jak1-R	AAGGGAGAGTGTGAGCCAAG
jm8Mus-c44F1	GGGTTTTATGTTCACTATCCCG
jm8Mus-c44F2	GGAACCTCAAGGGCAGGACAATCAG
jm8Mus-c48R1	CATCTCCAGGCTCTTCTATCA
jm8Mus-c48R2	ATCACTGTAAAGGGAGGTGTTCT
opsin-f	TTACACCACCCTCTACAC
opsin-r	GTGAGGGTGGTCTTGGTGG
Pdeb(genom)-F	TGCAAGCATTCACTTCTTCC
Pdeb(genom)-R	TGGGCAAAGTGAACAGCATC
rsm3F	TACCTCTTAGACTGTATTCC
rsm6R	GATGAAGCGGGAATGATGG
XAHR17	CGGAACCGCTCATTGCC
XAHR20	ACCCACTGTGCCATCTA

**Rind-spezifische Oligonukleotide**

Bezeichnung	Sequenz (5' @ 3')
DA41_TH_EcoRI-F	GGAATTCGGAGGAGGACTTGCAGTCTGAGTAGC
DA41_TH_XhoI-R	GCCGCTCGAGCTCATCTCTTGCATCAT
EFEMP1_1A_R	GATGGTTTCTTCACTGTCTCT
EFEMP1_1F	CTCAACTATGCTGACTCTGCG
EFEMP1_1R	GCACCTGCTATGTCTTGGC
EFEMP1_2F	CCGATCCAGTGTGACAGCAG
EFEMP1_2R	CGGCATTCAATTTGTTGCTC
EFEMP1_3F	ATGAATGCAGAACCTCAAGC
EFEMP1_3R	GAGCTTGTGCGGAAGTCCC
EFEMP1_TH_EcoRI-F	GGAATTCGGAGGAGGACAGGACACTGAAGAAACCATC
EFEMP1_TH_Mut/BsaI-F	AATGAGTGTGAGACCAAAATGATGTTGGGA
EFEMP1_TH_Mut/Drd1-R	ACAGGACTTGTGTTCTTAGAGTCAACTCTCC
EFEMP1_TH_SalII-R	GGCGGTGCGACTAAATGCCTACAGTGGACGC

**Vektor-spezifische Oligonukleotide**

Bezeichnung	Sequenz (5' @ 3')
gt10_F new	TCTGGTAAAAAGCGTGGTCCG
gt10_R new	GGGTAATAACAGAGGTGGC
LIS1	CGCGTGACCCGGGAGATCTGAATTC
LIS2	GAATTCAGATC
LS2	TCTCGGTAGCCAAAGTTGTTAAGG
M13-5	CGCCAGGGTTTCCACAGCAGC
M13-6	AGCGGATAACAATTTACACAGGA
PCR-f	CTCGGATCCACTAGTAACGG
PCR-r	GCCCGCAGTGTGATGGATAT
pCYPAC2-01	TGACTGGGTTGAAGGCTCTC
pCYPAC2-02	TTCAATGTTTCTGCTCTTCTC
RA2	TGCAACCCCGGATCTCAAGATTAC
SA2	ATCTCAGTGTATTTGTGAGC
SD6	TCTGAGTCACTGGACAACC
SP6new	CGACATTTAGGTGACACTAT
T3	ATTAACCTCTCAATAAG
T7new	GCCGCTAATACGACTCACTA
UL	CACCCGTTCTCGGAGCACTGTCCGACCGC
UR	ATATAGGCGCCAGCAACCCGACCTGTGGCC

*Längenstandards*

100 bp Leiter	Life Technologies, Eggenstein
1 kb Leiter	Life Technologies, Eggenstein
1kb+ Leiter	Life Technologies, Eggenstein
<i>low mass</i> DNA-Leiter	Life Technologies, Eggenstein
RNA Längenstandard (G399)	Promega, Mannheim

*Vektoren*

pBluescript® II KS (+)	Stratagene, Heidelberg
pCR™II	Invitrogen, DeSchelp, Niederlande
pCR™2.1	Invitrogen, DeSchelp, Niederlande
pCRScript™ Amp SK(+)	Stratagene, Heidelberg
pGADT7	Clontech, Palo Alto, USA
pGBKT7	Clontech, Palo Alto, USA

**C. Geräte**

Feinwaage	Mettler, Giessen
Gefrierschrank (-20°C)	Quelle, Fürth
Gefrierschrank (-80°C)	Revco, Asheville, USA
Geiger-Müller-Zählrohr	Mini-Instruments, Maldon, UK
Geldokumentationssystem	Intas, Göttingen
Gelkammern Agarose	Pharmacia, Freiburg
	Life Technologies, Eggenstein
Gelkammern Polyacrylamid	Life Technologies, Eggenstein
GenePulser, Pulse Controller	BioRad, München
Hybridisierungsöfen	Bachofer, Reutlingen
	GFL, Wertheim a.M.
Inkubator Certomat R	B. Braun, Melsungen
Lichtmikroskop	Leitz Aristoplan
Kameraaufsatz	Leitz
Belichtungssteuerung	Leitz Orthomat E
Magnetrührer Ikamag® RH	Janke & Kunkel, Staufen
Mikrowellengerät	Neff, Bretten
Mikrotom Modell 1400	Leitz, Wetzlar
Pipetten	Gilson, Frankreich
	Eppendorf, Hamburg
Polyacrylamid-Geltrockner Modell 583	BioRad, München
pH-Meter pH 537	WTW, Weilheim

Röntgenfilmentwicklermaschine	Protec Gerätebau
Schüttler	GFL, Wertheim a.M.
Spannungsgeräte	Life Technologies, Eggenstein
	Pharmacia, Freiburg
Speed Vac Concentrator	Servant, Farmingdale, USA
Sterilbänke	Heraeus Sepatech, Osterode
Thermocycler	Biometra, Göttingen
	Bio-Med, Theres
	Perkin-Elmer, Norwalk, USA
Thermoheizblock	Liebisch, Bielefeld
Ultra-Turrax T25	IKA-Labortechnik, Staufen
UV-Lampe 365 nm	Schleicher & Schüll, Dassel
UV-Spektrophotometer Ultrospec III	Pharmacia, Freiburg
UV-Stratalinker 1800	Stratagene, Heidelberg
UV-Transilluminator (312 nm)	Bachofer, Reutlingen
Vakuumblot-Apparatur VacuGene™	Pharmacia, Freiburg
Vortex L46	GLW, Würzburg
Waage	Chyo, Japan
Wasserbäder	GFL, Wertheim a.M.
Zentrifugen	Du Pont, Bad Homburg
	Eppendorf, Hamburg
	Heraeus Sepatech, Osterode
	Hettich, Tuttlingen

#### **D. Verbrauchsmaterialien**

Bio-Assay Dish (24 × 24 cm)	Nunc, Wiesbaden
Diafilm Fujichrome 64T, TypeII, Tungsten	Fujifilm, Tokyo, Japan
Einbett-Kassetten	Roth, Karlsruhe
Einbett-Schälchen	Medim, Giessen
Einmalspritzen Omnifix® (1ml)	B. Braun, Melsungen
Einweghandschuhe Skinsense™	Regent Medical, Norcross, USA
Falcon-Röhrchen (50 ml/15 ml)	Greiner, Frickenhausen
Filmexponierungskassetten	Kodak, Rochester, USA
Fluoreszenzmarkierungen	Stratagene, Heidelberg
Gel-Blotting Papier	Schleicher & Schüll, Dassel
Glaskugeln, säurebehandelt (Ø 0,7-1,2 mm)	Sigma, München
Glaswolle	Roche, Mannheim
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden

Mikrotiterplatte (60 wells, 10 µl)	Nunc, Wiesbaden
Mikrotiterplatte (96 wells, 300 µl)	Nunc, Wiesbaden
Mini-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Objektträger Polylysine™	Menzel, Braunschweig
Parafilm "M"®	American National Can, Chicago, USA
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Nylonmembran (rund) Ø132 mm	Du Pont, Bad Homburg
Nylonmembran Hybond N <sup>+</sup>	Amersham, Cleveland, USA
Paraplast Plus	Sherwood Medical, St. Louis, USA
QuadriPERM® plus	Heraeus, Osterode
Replikator	Nunc, Wiesbaden
Röntgenfilme x-ray RETINA XBD	Fotochemische Werke, Berlin
Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm)	Life Technologies, Eggenstein
Sterilfilter (Porengröße 0,45 µm)	Millipore, Molsheim, Frankreich
Verstärkerfolie	Du Pont, Bad Homburg
Zellkulturflaschen	Nunc, Wiesbaden

### *Kits*

Sequenase™ 2.0 DNA Sequencing Kit	Amersham, Cleveland, USA
Thermo Sequenase radiolabeled terminator cycle sequencing kit	Amersham, Cleveland, USA
NucleoSpin® Extract	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel, Düren
pCR-Script™ Amp SK (+) Kit	Stratagene, Heidelberg
RNAClean LS™	Hybaid, Heidelberg
Rotiphorese® DNA-Sequenzierungssystem	Roth, Karlsruhe
SequaGel®-6	BioRad, München
TA Cloning® Kit	Invitrogen, De Schelp, Niederlande
Lambda Midi Kit	Qiagen, Hilden
QIAexII	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Plasmid Kit	Qiagen, Hilden
MATCHMAKER Two-Hybrid System 3	Clontech, Palo Alto, USA

### **E. Mauslinien**

CD-1® (ICR)BR	Charles River, Sulzfeld
CFW® (SW) BR-Swiss Webster	Charles River, Sulzfeld
C3H/HeJ CRL BR	Charles River, Sulzfeld
CRL NMRI BR	Charles River, Sulzfeld

## F. Hefestamm

### *S. cerevisiae* AH109 (Clontech)

MATa trp1-901 leu2-3 112 ura3-52 his3-200 gal4 gal80 LYS2::Gal1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3  
GAL2<sub>UAS</sub>-GAL2<sub>TATA</sub>-ADE2 ura3::MEL1<sub>UAS</sub>-MEL1<sub>TATA</sub>-lacZ

## G. Bakterienstämme

### *E. coli* DH5a (Life Technologies)

F'  $\phi$ 80dlacZ M15 (*lacZYA-argF*) U169 *endA1 recA1 hsdR17*(r<sub>K</sub>.m<sub>K+</sub>) *deoR thi-1 supE44  $\lambda$  gyrA96*  
*relA1*,

### *E. coli* INV a F' (Invitrogen)

F' *endA1 recA1 hsdR17*(r<sub>K</sub>.m<sub>K+</sub>) *supE44 thi-1 gyrA96 relA1  $\phi$ 80lacZ M15* (*lacZYA-argF*) U169

### *E. coli* JM-109 (Stratagene)

e14<sup>r</sup>(McrA) *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17*(r<sub>K</sub>.m<sub>K+</sub>) *supE44 relA1* (*lac-proAB*) [F' *traD36 proAB*  
*lac<sup>r</sup>Z M15*]

### *E. coli* XL1-Blue (Stratagene)

*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lac<sup>r</sup>Z M15 Tn10* (Tet<sup>r</sup>)]<sup>c</sup>

### *E. coli* Y1090<sup>r</sup>

D(*lac*)U169 (*lon*)? *araD139 strA supF mcrA trpC22* ::Tn10 (Tet<sup>r</sup>)[pMC9 Amp<sup>r</sup> Tet<sup>r</sup>] *mcrB hsdR*

## H. Medien

### Für Bakterienkulturen

#### LB Medium (Luria-Bertani Medium)

Bacto-Trypton	10 g/l
Bacto-Yeast-Extract	5g/l
NaCl	10 g/l

LB Medium wird vor Gebrauch 20 min bei 120°C autoklaviert.

Agarplatten enthalten 15 g Agar pro l.

Für die Kultivierung von Phagenrezipientenzellen (*E. coli* Y1090<sup>r</sup>) werden vor dem Autoklavieren zum LB Medium 0,2% Maltose und 10 mM MgSO<sub>4</sub> gegeben.

Agaroseplatten enthalten 15 g Agarose pro l Medium.

Topagar enthält 7 g Agarose pro l Medium.

**SOC Medium** (Life Technologies)

Bacto-Trypton	20,0 g/l
Hefeextrakt	5,0 g/l
NaCl	0,5 g/l

SOC Medium wird vor Gebrauch 20 min bei 120°C autoklaviert.

Nach Abkühlen auf unter 60°C wird 50 ml/l steril filtrierte 40% (w/v) Glukose zugegeben.

**Für Hefekulturen**

**AHC Medium**

YNB ( <i>yeast nitrogen base w/o aa</i> )	1,7 mg/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5,0 mg/l
Casein	10,0 mg/l
Adeninhemisulfat	20,0 mg/l

AHC Medium wird auf pH 5,8 eingestellt und 20 min bei 120°C autoklaviert.

Nach Abkühlen auf unter 60°C wird 50 ml/l steril filtrierte 40% (w/v) Glukose zugegeben.

Agarplatten enthalten 15 g Agar pro l.

**YPD Medium**

Select-Pepton	20,0 g/l
Hefeextrakt	10,0 g/l

YPD Medium wird auf pH 5,8 eingestellt und 20 min bei 120°C autoklaviert.

Nach Abkühlen auf unter 60°C wird 50 ml/l steril filtrierte 40% (w/v) Glukose zugegeben. Für YPDA Medium werden zusätzlich 15 ml/l steril filtrierte 0,2% (w/v) Adeninhemisulfat zugegeben. Agarplatten enthalten 15 g Agar pro l.

**SD Medium**

YNB ( <i>yeast nitrogen base w/o aa</i> )	6,7 g/l
10× Dropout(DO)-Lösung	100 ml/l

SD Medium wird auf pH 5,8 eingestellt und 20 min bei 120°C autoklaviert.

Nach Abkühlen auf unter 60°C wird 50 ml/l steril filtrierte 40% (w/v) Glukose zugegeben. Bei Bedarf werden zusätzlich 2,5 ml/l steril filtrierte 1M 3-AT zugegeben. Agarplatten enthalten 15 g Agar pro l.

---

<i>10× DO-Lösung:</i>	L-Isoleucin	300 mg/l
	L-Valin	1.500 mg/l
	L-Adenin	200 mg/l
	L-Arginin	200 mg/l
	L-Histidin	200 mg/l
	L-Leucin	1.000 mg/l
	L-Lysin	300 mg/l
	L-Methionin	200 mg/l
	L-Phenylalanin	500 mg/l
	L-Threonine	2.000 mg/l
	L-Tryptophan	200 mg/l

Die in der jeweiligen DO-Lösung nicht benötigten Aminosäuren werden weggelassen.

## **I. Antibiotika**

### **Ampicillin**

Stock-Lösung: 50 mg/ml (in H<sub>2</sub>O)

Konzentration im Medium: 100 µg/ml

### **Kanamycin**

Stock-Lösung: 25 mg/ml (in H<sub>2</sub>O)

Konzentration im Medium: 50 µg/ml

### **Penicillin/Streptomycin-Lösung** (Life Technologies)

Stock-Lösung: 5.000 U Penicillin/5.000 µg/ml Streptomycin

Konzentration im Medium: 50 U Penicillin/50 µg/ml Streptomycin

### **Tetrazyklin**

Stock-Lösung: 10 mg/ml (in EtOH)

Konzentration im Medium: 15 µg/ml



## J. PCR-Bedingungen

### *polymorphe STS-Marker*

Lokus	Primerpaar	Genbank-Zugangsnummer	Größe (bp)	Reaktionsbedingungen		
				T <sub>A</sub> (°C)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Formamid
D2S2153	D2S2153-F D2S2153-R	Z52091	146-170	55	1,5	+
D2S2251	D2S2251-F D2S2251-R	Z51141	237-255	56	1,0	+
D2S2352	D2S2352-F D2S2352-R	Z51590	262-282	61/58/55	1,0	+
D2S2739	D2S2739-F D2S2739-R	G08142	281-329	55	1,5	+
D2S378	D2S378-F D2S378-R	Z24365	203-217	55	1,0	+
D6S1043	D6S1043-F D6S1043-R	G08539	103-143	55	1,0	-
D6S1543	D6S1543-F D6S1543-R	Z52076	101-125	55	1,0	-
D6S1570	AFMa223wd9a AFMa223wd9m	Z52576	121-145	55	1,0	-
D6S1580	AFM183yh4a AFM183yh4m	Z51089	141-157	56	1,5	-
D6S1613	AFMb031ye9a AFMb031ye9m	Z53157	92-119	54	1,0	-
D6S1639	D6S1639-F D6S1639-R	Z53531	161-197	60	1,0	-
D6S1664	AFMc012yd5a AFMc012yd5m	Z53986	198-214	55	1,5	-
D6S1671	D6S1671-F D6S1671-R	Z51269	266-290	55	1,5	-
D6S1716	D6S1716-F D6S1716-R	Z51943	199-211	55	1,5	-
D6S1717	D6S1717-F D6S1717-R	Z50990	112-132	54	1,5	-
D6S249	Mfd 97-1 Mfd 97-2	L01004	146-164	52	1,0	-
D6S252	Mfd 171-1 Mfd 171-2	L01000	142-166	52	10	-
D6S261	AFM059xh8a AFM059xh8a	Z16498	101-129	55	1,5	-
D6S262	D6S262-1 D6S262-2	Z16500	167-183	55	1,5	+
D6S283	D6S283-1 D6S283-2	Z16818	255-291	57	1,5	-
D6S286	D6S286-1 D6S286-2	Z16857	206-232	55	1,5	+
D6S300	D6S300-F D6S300-R	Z16991	189-207	56	1,5	+
D6S301	AFM220zf6a AFM220zf6m	Z17009	221-251	55	1,5	-
D6S417	AFM212zf10a AFM212zf10m	Z23623	237-253	55	1,0	+
D6S475	GATA-P9365-F GATA-P9365-R	G08546	144-180	58	1,0	-
D6S501	GATA-P6995-F GATA-P6995-R	G08551	166-182	58	1,5	-
DXS999	DXS999-a DXS999-m	Z17059	260-276	52	1,0	+

### *nicht-polymorphe STS-Marker*

Lokus	Primerpaar	Genbank-Zugangsnummer	Größe (bp)	Reaktionsbedingungen		
				T <sub>A</sub> (°C)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Formamid
DXS257	DXS257-f DXS257-r	G02052	355	53	1,5	+
DXS418	418(-CA)-F 418(-CA)-R	Z22550	114	54	1,5	+

*EST-Marker auf Chromosom 2p16*

Lokus	Primerpaar	Genbank-Zugangsnummer	Größe (bp)	Reaktionsbedingungen		
				T <sub>A</sub> (°C)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Formamid
A002T41	A002T41-F A002T41-R	AA910955	333	56	1,0	+
A006B27	A006B27-F A006B27-R	H00978	179	53	1,0	+
AA025692	AA025692-F AA025692-R	AA025692	172	53	1,0	+
BCD1993	BCD1993-F BCD1993-R	M78764	125	60	1,0	-
Cda10d06	Cda10d06-F Cda10d06-R	H29478	276	59	1,0	+
N26021	N26021-F N26021-R	AA497122	258	56	1,0	+
N34878	N34878-F N34878-R	N94387	229	56	1,0	+
N50531	N50531-F N50531-R	AA058557	142	55	1,5	-
SG8564	SG8564-F SG8564-R	H72600	218	55	1,0	+
SGC35870	SGC35870-F SGC35870-R	H18090	113	58	1,0	-
stSG16444	stSG16444-F stSG16444-R	T97717	241	56	1,5	+
stSG21421	stSG21421-F stSG21421-R	N46848	157	56	1,0	+
stSG31419	stSG31419-F stSG31419-R	AA187672	325	60	1,0	+
stSG4145	stSG4145-F stSG4145-R	H29614	219	54	1,5	+
stSG4331	stSG4331-F stSG4331-R	R53314	315	56	1,0	+
stSG447	stSG447-F stSG447-R	AA018136	164	57	1,0	+
stSG8460	stSG8460-F stSG8460-R	H65771	227	57	1,0	+
stSG9653	stSG9653-F stSG9653-R	H40557	248	54	1,0	+
WI-11560	WI-11560-F WI-11560-R	AA581624	153	56	1,0	+
WI-16857	WI-16857-F WI-16857-R	AA569246	307	55	1,5	+

*Diverse PCR-Fragmente*

Lokus	Primerpaar	Genbank-Zugangsnummer	Größe (bp)	Reaktionsbedingungen		
				T <sub>A</sub> (°C)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Formamid
Alu	Alu1 Alu2	-	variabel	55	1,5	-
RS1 (3'-UTR)	ys86-f ys86-r	AF014459	216	58	1,5	+
EFEMP1	EFEMP1mut-F1 EFEMP1mutR	AY004328	91	58	1,0	-
GUSB	GUS B6F GUS B7R	NM_000181	454	58	1,5	+
pNEU60	DHRD-91.r13 DHRD-91.s4	AF303576 / AF101472	357 (cDNA)	57	1,5	-
pNEU60	R1-EcoRI-F S8-BamHI-R	AF101472	333	59	1,0	+
pNEU60	DHRD-91.r4 DHRD-91.s1	AF101472	615	56	1,0	+
pNEU60 (3'-UTR)	DHRD-3UTR-F DHRD-3UTR-R	-	270	55	1,5	+

*Maus-spezifische PCR-Fragmente*

Lokus	Primerpaar	Genbank-Zugangsnummer	Größe (bp)	Reaktionsbedingungen		
				T <sub>A</sub> (°C)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Formamid
<i>β-Aktin</i>	XAHR20 XAHR17	X03765	289	58	1,5	+
<i>Crx</i>	Crx-F Crx-R	U77615	625	60	1,5	+
<i>Jak1</i>	Jak1-F Jak1-R	S63728	496	58	1,5	-
<i>jnB</i>	jm8Mus-c44F2 jm8Mus-c48R2	-	650	60	1,5	-
<i>jnB</i>	jm8Mus-c44F1 jm8Mus-c48R1	-	740	60	1,5	-
<i>Opsin</i>	opsin-F opsin-R	M55171	992	58	1,5	-
<i>Pdeb</i>	Pdeb(genom)-F Pdeb(genom)-R	X55968	215	60	1,5	+
<i>Rs1h</i>	rsm3F rsm6R	AF084561	436	59	1,5	+

*PCR-Fragmente für das Hefe Zwei-Hybrid System*

Lokus	Primerpaar	Größe (bp)	Reaktionsbedingungen		
			T <sub>A</sub> (°C)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Formamid
<i>DA41</i>	DA41_TH_EcoRI-F DA41_TH_XhoI-R	299	53	1,5	-
<i>EFEMP1</i>	EFEMP1_1F EFEMP1_1R	529	55	1,0	+
<i>EFEMP1</i>	EFEMP1_2F EFEMP1_2R	570	56	1,5	-
<i>EFEMP1</i>	EFEMP1_3F EFEMP1_3R	553	56	1,5	-
<i>EFEMP1</i>	EFEMP1_TH_EcoRI-F EFEMP1_TH_Sall-R	1501	58	1,5	-
<i>EFEMP1</i>	EFEMP1_TH_EcoRI-F EFEMP1_TH_Mut/Drd1-R	1312	58	1,5	-
<i>EFEMP1</i>	EFEMP1_TH_Mut/Bsa1-F EFEMP1_TH_Sall-R	516	58	1,5	-

*RS1 Mutationsanalyse*

Exon	Primerpaar	Größe (bp)	Reaktionsbedingungen		
			T <sub>A</sub> (°C)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Formamid
1	rstu12-1f rstu12-1r	216	58	1,0	+
2	rstu12-2f rstu12-2r	176	56	1,5	+
3	rstu12-3f rstu12-3r	178	60	1,0	+
4	rstu12-f tu12ex4-rev	219	56	1,5	+
5	245638-f 245638-r	311	65	1,5	+
6	245263-f 245263-r	414	62	1,0	+

*pNEU60 Mutationsanalyse*

Amplicon	Primerpaar	Größe (bp)	Reaktionsbedingungen		
			T <sub>A</sub> (°C)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Formamid
1	DHRD-91.r7 DHRD-91.s4	348	53	1,0	-
2	DHRD-91.r1 DHRD-91.s8	318	59	1,0	+
3	DHRD-91.r2 DHRD-91.s7	439	60	1,0	+
4	DHRD-91.r3 DHRD-91.s6	303	60	1,0	-
5	DHRD-91.r4 DHRD-91.s2	327	56	1,0	+
6	DHRD-91.r5 DHRD-91.s1	349	60	1,0	+
7	DHRD-91.r9 DHRD-91.s11	248	54	1,0	+

*EFEMP1 Mutationsanalyse*

Exon	Primerpaar	Größe (bp)	Reaktionsbedingungen		
			T <sub>A</sub> (°C)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Formamid
3	EFEMP1_ex3-F EFEMP1_ex3-R	228	60	1,5	+
4	EFEMP1_ex4-F EFEMP1_ex4-R	133	60	1,5	+
5	EFEMP1_ex5A-F EFEMP1_ex5A-R	246	60	1,5	+
	EFEMP1_ex5B-F EFEMP1_ex5B-R	270	59	1,5	+
6	EFEMP1_ex6-F EFEMP1_ex6-R	196	60	1,5	+
7	EFEMP1_ex7-F EFEMP1_ex7-R	201	60	1,5	+
8	EFEMP1_ex8-F EFEMP1_ex8-R	246	60	1,5	+
9	EFEMP1_ex9-F EFEMP1_ex9-R	232	60	1,5	+
10	EFEMP1_ex10-F EFEMP1_ex10-R	244	60	1,5	+
11	EFEMP1_ex11A-F EFEMP1_ex11A-R	194	60	1,5	+
	EFEMP1_ex11B-F EFEMP1_ex11B-R	213	60	1,5	+
12	EFEMP1_ex12-F EFEMP1_ex12-R	248	60	1,5	+

## K. Verwendete Abkürzungen

A	Adenosin
aa	Aminosäure(n) ( <i>amino acid</i> )
ABC	ATP-binding cassette
ABCA4	netzhautspezifischer ABC-Transporter
Acc. No.	Zugangsnummer ( <i>accession number</i> )
AMD	Altersbedingte Makuladegeneration
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
3-AT	3-Amino-1,2,4-triazol
A <sub>x</sub>	Lichtabsorbtion bei der Wellenlänge x nm
BAC	Künstliches Bakterienchromosom ( <i>bacterial artificial chromosome</i> )
<i>B. mori</i>	<i>Bombyx mori</i> (Seidenspinner)
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
<i>B. taurus</i>	<i>Bos taurus</i> (Rind)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytidin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CACNAF1	retinaspezifische Kalziumkanal alpha-1 Untereinheit ( <i>retina-specific calcium channel alpha-1-subunit</i> )
CAPED	Zentral areoläre Pigmentepitheldystrophie
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
CHLC	<i>Cooperative Human Linkage Center</i>
Ci	Curie
CIAP	Alkalische Phosphatase aus Kalb ( <i>calf intestine alkaline phosphatase</i> )
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
cM	Centimorgan
CNV	choroidale Neovaskularisation
cps	Gezählte radioaktive Zerfallsereignisse pro Sekunde ( <i>counts per second</i> )
CRX	retinaspezifischer Transkriptionsfaktor ( <i>cone-rod homeobox-containing gene</i> )
Crx	murines Ortholog zu CRX
CSNB	kongenitale stationäre Nachtblindheit
DDBJ	<i>DNA Data Bank of Japan</i>
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
<i>D. discoideum</i>	<i>Dicytiostelium discoideum</i> (Schleimpilz)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGGE	denaturierende Gradienten Gelelektrophorese
DHPLC	denaturierende Hochdruck Flüssigkeits Chromatographie ( <i>denaturing high pressure liquid chromatography</i> )
DHRD	Doynsche Honigwaben Dystrophie ( <i>Doyne honeycomb retinal dystrophy</i> )
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
d.h.	das heißt
DOP	Degenerierte Oligonukleotidprimer
DTT	Dithiothreitol
EBI	<i>European Bioinformatics Institute</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFEMP1	<i>EGF-containing fibulin like extracellular matrix protein 1</i>

EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratories</i>
EOG	Elektrookulogramm
ERG	Elektroretinogramm
EST	exprimierte sequenzmarkierte Stelle ( <i>expressed sequence tag</i> )
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
f	Femto ( $\times 10^{-15}$ )
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> -Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
G	Guanosin
GA	Geographische Atrophie
GCG9	<i>Genetics Computer Group</i> Version 9
GDB	<i>Genome Data Base</i>
<i>G. gallus</i>	<i>Gallus gallus</i> (Huhn)
GPR75	G-Protein gekoppelter Rezeptor 75
GUSB	$\beta$ -Glucuronidase
h	Stunde(n) ( <i>hour</i> )
HBSS	Hank' gepufferte Salzlösung ( <i>Hank's buffered saline solution</i> )
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i> (Mensch)
HUSAR	<i>Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources</i>
I	Inosin
i.d.R.	in der Regel
INRA	<i>Institut Nationale de la Recherche Acronomique</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
Jak1	Janus Kinase 1
k	Kilo ( $\times 10^3$ )
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
l	Liter
LINE	Langes, verstreutes Kernelement ( <i>long interspersed nuclear element</i> )
LMA	Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt ( <i>low melting point agarose</i> )
lod	Logarithmus des Wahrscheinlichkeits-Quotienten ( <i>logarithm of odds</i> )
M	Molar (mol/l)
m	Milli ( $\times 10^{-3}$ )
$\mu$	Mikro ( $\times 10^{-6}$ )
mA	Milliampere
Mb	Megabasenpaar(e)
MCDR1	NCMD-Lokus auf Chromosom 6 ( <i>1<sup>st</sup> macular degeneration genetically mapped</i> )
min	Minute(n)
MLVT	Malattia Leventinese
mm	Millimeter
<i>M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i> (Maus)
mol	Mol
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
N	Normal
n	Nano ( $\times 10^{-9}$ )
NCBI	<i>US National Center for Biotechnology Information</i>
NCMD	North Carolina Macular Dystrophie
nm	Nanometer
OAc	Azetat
OLB	Puffer für <i>random-labeling</i> ( <i>oligo labeling buffer</i> )
ORF	Offenes Leseraster ( <i>open reading frame</i> )

p	Piko ( $\times 10^{-12}$ )
<sup>32</sup> P	radioaktives Phosphor-Isotop 32
<sup>33</sup> P	radioaktives Phosphor-Isotop 33
PAA	Polyacrylamid
PAC	P1-abgeleitetes künstliches Chromosom ( <i>P1-derived artificial chromosome</i> )
PBCRA	progressive bifokale chorioretinale Atrophie
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
pfu	Plaque erzeugende Einheiten ( <i>plaque forming units</i> )
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pNEU60	Neuronales Protein mit einem Molekulargewicht von 60 kDa
PNK	Polynukleotidkinase
PTT	<i>protein truncation test</i>
RACE	schnelle Vervielfältigung von cDNA Enden ( <i>rapid amplification of cDNA ends</i> )
RDS	<i>retinal degeneration slow</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
<i>R. norvegicus</i>	<i>Rattus norvegicus</i> (Ratte)
RPCI	<i>Roswell Park Cancer Institute</i>
RP	Retinitis Pigmentosa
RPE	retinales Pigmentepithel
RS	Retinoschisis
RS1	Retinoschisis assoziiertes Gen (Alias: XLR51)
Rs1h	murines <i>RS1</i> Ortholog
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
RZPD	Ressourcen Zentrum–Primär Datenbank
<sup>35</sup> S	radioaktives Schwefel-Isotop 35
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n) ( <i>second</i> )
SFD	Sorsby Fundus Dystrophie
SINE	Kurzes, verstreutes Kernelement ( <i>short interspersed nuclear element</i> )
SNP	<i>single nucleotid polymorphism</i>
SSCP	Einzelstrang Konformations Polymorphismus ( <i>single strand conformational polymorphism</i> )
<i>S. scrofa</i>	<i>Sus scrofa</i> (Schwein)
STGD1	autosomal rezessive Form des Morbus Stargardt
STR	kurze tandemartige Wiederholung von Nukleotiden ( <i>short tandem repeat</i> )
STS	sequenzmarkierte Stelle ( <i>sequenced tag site</i> )
T	Thymidin
T <sub>A</sub>	Anlagerungstemperatur
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TdT	Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase
TDT	<i>transmission disequilibrium test</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetrazyklin
TIMP3	Gewebsinhibitor der Metalloproteinasen 3 ( <i>tissue inhibitor of metalloproteinases-3</i> )
TIGR	<i>The Institute for Genomic Research</i>
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>in Verbindung mit Ziffern</i> : Einheit(en) ( <i>unit</i> ); <i>in Sequenzen</i> : Uracil
u.a.	unter anderem
UpM	Umdrehungen pro Minute

UTR	Nichttranslatierte Region ( <i>untranslated region</i> )
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
VMD2	Vitelliforme Makuladystrophie 2 ( <i>Morbus Best</i> )
Vol	Volumen
v/v	Volumenanteil einer Flüssigkeit in einer Lösung ( <i>volume per volume</i> )
W	Watt
w/o	ohne ( <i>without</i> )
w/v	Massenanteil eines festen Stoffes in einer Lösung ( <i>weight per volume</i> )
X-Gal	5-Brom,4-Chlor,3-Indoxyl- $\beta$ -D-Galactosid
<i>X. laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i> (Krallenfrosch)
XLRS1	Alias zu RS1
YAC	künstliches Hefechromosom ( <i>yeast artificial chromosome</i> )
z.B.	zum Beispiel

**L. Genetischer Code**

		Zweite Position				
		U	C	A	G	
Erste Position (5'-Ende)	U	UUU	UCU	UAU	UGU	Dritte Position (3'-Ende)
		UUC	UCC	UAC	UGC	
		UUA	UCA	UAA	UGA	
		UUG	UCG	UAG	UGG	
	C	CUU	CCU	CAU	CGU	
		CUC	CCC	CAC	CGC	
		CUA	CCA	CAA	CGA	
		CUG	CCG	CAG	CGG	
	A	AUU	ACU	AAU	AGU	
		AUC	ACC	AAC	AGC	
		AUA	ACA	AAA	AGA	
		AUG	ACG	AAG	AGG	
	G	GUU	GCU	GAU	GGU	
		GUC	GCC	GAC	GGC	
		GUA	GCA	GAA	GGA	
		GUG	GCG	GAG	GGG	

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

**M. Bezeichnung degenerierter Nukleotide**

R	A/G	S	C/G	V	A/C/G
Y	C/T	W	A/T	D	A/G/T
M	A/C	H	A/C/T	N	A/C/G/T
K	G/T	B	C/G/T		



# CURRICULUM VITAE

## Persönliche Daten

Name	<u>Christian</u> Georg Sauer
Geburtsdatum	15.12.1968
Geburtsort	Aschaffenburg
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	deutsch

## Schulbildung

1975-1979	Grundschule, Hösbach
1979-1989	Hanns-Seidel-Gymnasium, Hösbach
Juni 1989	Abitur

## Wehrdienst

1989-1990	Sanitätsbataillon 12, Veitshöchheim
-----------	-------------------------------------

## Studium

1990-1996	Studium der Biologie (Diplom) an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
April 1996	Diplom Thema der Diplomarbeit: „Die Suche nach neuen Mitgliedern der TIMP Genfamilie“

## Promotion

Mai 1996-Februar 2001	Institut für Humangenetik in der Arbeitsgruppe Molekulare Ophthalmologie und Onkologie unter der Leitung von Prof. Dr. Bernhard Weber
-----------------------	---