

Masterarbeit

Next Generation Sequencing zur genetischen Analyse seltener monogener ophthalmologischer Erkrankungen anhand einer großen konsanguinen pakistanischen Familie

(Next generation sequencing for the genetic analysis of rare monogenic
ophthalmological diseases using a large consanguineous Pakistani
family)

eingereicht von
Gerald Malli BSc

zur Erlangung des akademischen Grades
**Master of Science
(MSc)**

an der
Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am
Institut für Humangenetik

unter der Anleitung von
Assoz. Prof. Priv.-Doz. Mag. Dr. Christian Windpassinger

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 31. Juli 2024

Gerald Malli eh

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Masterarbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt Assoz. Prof. Priv.-Doz. Mag. Dr. Christian Windpassinger für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung meiner Masterarbeit.

Ein großes Dankeschön geht an Johann Semmler-Bruckner und Anita Harb für ihre wertvolle Hilfe bei der Sequenzierung am Neurogenetik-Institut. Ohne ihre Unterstützung wäre die Durchführung der experimentellen Arbeiten nicht möglich gewesen. Ihre Expertise bei der Auswertung der Daten und ihre Geduld haben maßgeblich zur Qualität dieser Arbeit beigetragen.

Abschließend bedanke ich mich besonders bei Dr. Alexander Heidekum für seine durchgehende Unterstützung, sowie bei allen weiteren Personen, die mich während dieser Zeit begleitet haben.

Zusammenfassung

Ziel der Studie ist die Identifikation einer möglichen genetischen Ursache für Augenerkrankungen, die über mehrere Generationen in einer Familie mit konsanguinen Familienverhältnissen aufgetreten sind. Dabei fokussiert sich die Arbeit unter anderem auf die ophthalmologische Erkrankung Retinitis pigmentosa (RP), eine vererbte Netzhauterkrankung, die oft zur Erblindung führt und häufig mit einer Mutation in einem Transkript des *RPGR*-Gens assoziiert wird, welches in den Verbindungscilien der Photorezeptoren essenziell ist.

Für die genetische Analyse wurden Blutproben von Mitgliedern besagter Familie aus Pakistan entnommen, in welcher mehrere Fälle einer nicht näher beschriebenen „Retinalen degeneration“ über Generationen hinweg dokumentiert sind. Nach der DNA-Extraktion wurde zunächst eine Stammbaumanalyse durchgeführt, um die Vererbungsmuster zu untersuchen. Anschließend kamen verschiedene molekulargenetische Techniken zum Einsatz, darunter Sanger-Sequenzierungen und Whole-Exome-Sequencing (WES). Zur Präzisierung der Sequenzierungen wurden spezifische Primer um eine gefundene potenziell ursächliche Variante der Erkrankungen in der Familie designt und eine Gradienten-PCR durchgeführt, um die optimalen Bedingungen für die folgende Sanger-Sequenzierung zu schaffen.

Die Sequenzierungsanalyse des WES zeigte eine Frameshift-Mutation (c.2420_2435del (p.Glu807Glyfs*3)) im Exon 15 des *RPGR*-Gens, die eine Verschiebung des Leserasters und somit eine vorzeitige Terminierung der Proteinsynthese verursacht. Diese Mutation führt zu einer verkürzten und möglicherweise funktionslosen Variante des *RPGR*-Proteins. Diese genetische Veränderung konnte in allen betroffenen männlichen Familienmitgliedern nachgewiesen werden, was zur vermuteten X-chromosomal rezessiven Vererbung, der nicht näher beschriebenen Erkrankung in der Familie, als auch zum Vererbungsmuster der RP passen würde.

Auch wenn die gefundene Variante bereits in den Supplementary Materials einer Arbeit von Zampaglione et al. (2022) mit PR assoziiert wurde, lässt sich aufgrund der begrenzten phänotypischen Informationen der behandelten Familie keine endgültige Diagnose ableiten. In zukünftigen Studien sollten daher die funktionellen Auswirkungen dieser Mutation weiter untersucht und evaluiert werden.

Abstract

The aim of the study is to identify a possible genetic cause for eye diseases that have occurred over several generations in a consanguineous family. Among other, this work focuses on the ophthalmological disease retinitis pigmentosa (RP), an inherited retinal disease that often leads to blindness and is frequently associated with a mutation in a transcript of the *RPGR* gene, which is essential in the photoreceptor connecting cilia.

For the genetic analysis, blood samples of the affected family from Pakistan were taken, in which several cases of an unspecified "retinal degeneration" have been documented over generations. After DNA extraction, a family tree analysis was carried out first, to analyse the inheritance patterns. Different molecular genetic techniques were used, including Sanger sequencing and Whole-Exome-Sequencing (WES). To optimize the sequencing, specific primers were designed, around a potentially causative variant of the disease of the family and a gradient PCR was performed, to create the optimal conditions for the subsequent Sanger sequencing.

The sequencing analyses of the WES revealed a frameshift mutation (c.2420_2435del (p.Glu807Glyfs*3)) in exon 15 of the *RPGR* gene, which causes a shift in the reading frame and thus premature termination of protein synthesis. This mutation leads to a shortened and potentially non-functional variant of the RPGR protein. This genetic change could be detected in all affected male family members, which fits the presumed X-linked recessive inheritance of the unspecified disease in the family, as well as the inheritance pattern of RP.

Even though the found variant was already associated with PR in the Supplementary Materials of a paper by Zampaglione et al. (2022), no final diagnosis can be derived due to the limited phenotypic information of the affected family. The functional effects of this mutation should therefore be further investigated and evaluated in future studies.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Auge	1
1.2	Funktion des Auges	4
1.3	Genetische Erkrankungen des Auges	5
1.4	Retinitis pigmentosa GTPase-Regulator-Gen / (<i>RPGR</i>)-Gen	9
1.5	Fallbeschreibung	12
2	Ziel / Hypothesenbeschreibung	13
3	Material und Methoden	13
3.1	Stammbaumanalyse	13
3.2	Probenaufreinigung & DNA-Extraktion	13
3.3	Quality-Check-PCR	17
3.4	Agarosegel-Elektrophorese	18
3.5	<i>RPGR</i> -Exon 15 Primerdesign	19
3.6	Sanger-Sequenzierung	24
3.7	Whole-Exome-Sequencing (WES)	30
3.8	Segregationsanalyse	31
3.9	Geräte	32
3.10	Verbrauchsutensilien	33
3.11	Reagenzien	33
3.12	Programme	36
4	Ergebnisse	37
4.1	Stammbaum	37
4.2	Ergebnisse der Quality-Check-PCR	39
4.3	Whole-Exome-Sequencing (WGS) Ergebnisse	40
4.4	Sanger-Sequenzierung	48
4.5	Pathophysiologische Relevanz von Exon 15 (<i>RPGR</i>)	65
4.6	Aktualisierter Stammbaum	68
5	Diskussion	69
5.1	Phänotyp-Genotyp Korrelation	69
5.2	Probenqualität	70
5.3	Primerdesign	70
5.4	Konservierung und Relevanz des Exon 15 (<i>RPGR</i>)	70
5.5	Erhöhte Genexpression von <i>RPGR</i> in Nervengewebe	71
5.6	Pathophysiologische Bedeutung von Mutationen im <i>RPGR</i> -Gen Exon 15..	72

6	Conclusio und Ausblick	82
7	Abbildungsverzeichnis.....	83
8	Tabellenverzeichnis	85
9	Literaturverzeichnis	85
10	Abkürzungsverzeichnis	87

1 Einleitung

1.1 Das Auge

Das Auge ist eines der wichtigsten Sinnesorgane des Menschen. Obwohl das Gehirn höchsten 60 Bit pro Sekunde verarbeiten kann, erreichen dennoch in jeder Sekunde 10 Millionen Bit an Informationen unser Sehorgan. In Summe stammen mehr als 90 % aller Informationsreize, die das Gehirn erreichen, von den Sinnesorganen Augen und Ohren. (1,2)

1.1.1 Die Anatomie und Physiologie des Auges

Mit ungefähr 2,4 cm Kugeldurchmesser ist der Augapfel (Bulbus oculi) ein wichtiger Bestandteil des Sehorgans. In ihm befinden sich die Sinneszellen, die Reize aufnehmen und die Informationen über den Sehnerv (N. opticus, II. Hirnnerv) an das Gehirn weiterleiten. Neben dem Bulbus oculi, zählen auch Augenlider, die äußeren Augenmuskeln und der Tränenapparat zum Sehapparat.(2)

Durch seine Lage ist der Augapfel durch einen kräftigen Fettkörper in der knöchernen Augenhöhle (Orbita), in welchem er eingebettet ist, gut geschützt. Das Auge kann sich wie ein Kugelgelenk durch 3 innere und 6 äußere Augenmuskeln in allen drei Raumachsen bewegen. (2)

1.1.2 Aufbau des Augapfels

Die äußere, mittlere und innere Augenhaut bilden die drei Schichten, aus welchen die Wand des Augapfels besteht. Sie übernehmen im vorderen und hinteren Bereich des Augapfels jeweils unterschiedliche Aufgaben. (2)

Die äußere Augenhaut setzt sich vorne aus der Hornhaut (Kornea) und der Bindehaut (Konjunktiva) sowie hinten aus der Lederhaut (Sklera) zusammen. Die unter dem klinischen Begriff bekannte „Uvea“ oder mittlere Augenhaut, äußert sich im vorderen Teil des Augapfels als Regenbogenhaut (Iris) mit Ziliarkörper, während sie im hinteren Teil die Aderhaut (Choroidea) bildet. Ähnlich der mittleren Augenhaut, beteiligt sich die innere Augenhaut vorne am Aufbau des Ziliarkörpers. Im hinteren Bereich enthält sie die Netzhaut (Retina) sowie die Sinneszellen. (2)

Eine lichtbrechende Linse befindet sich im vorderen Bereich des Augapfels, welche hinter der vorderen Augenkammer liegt. Weitere abgrenzbare Räume sind die hintere Augenkammer und der Glaskörper. Der Sehnerv verlässt den Augapfel an dessen Rückseite. Abbildung 1 zeigt eine schematische Übersicht vom Aufbau des Auges. Die äußere Schicht umfasst die Lederhaut sowie die Binde- und Hornhaut. Die mittlere Schicht besteht aus der Aderhaut und der Regenbogenhaut. Die Netzhaut bildet die innere Schicht, wobei der Sehnerv mit dieser verbunden ist und das Auge in Richtung der Orbitaspitze verlässt. (2)

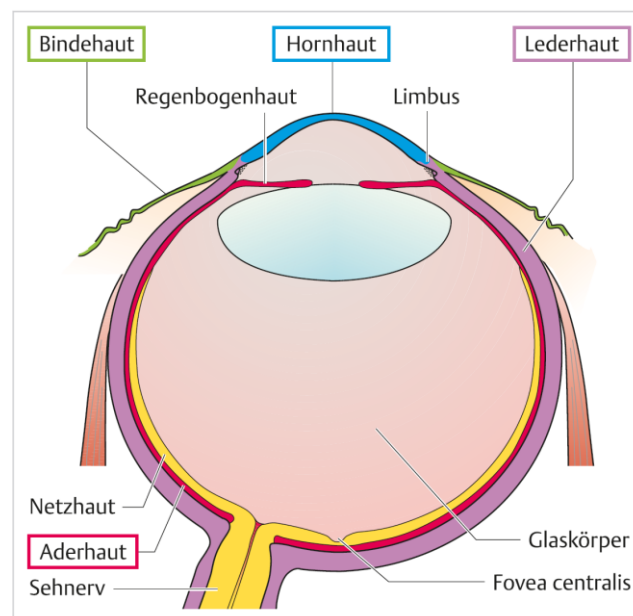


Abbildung 1: Wandschichten des Auges; Mit Genehmigung der Georg Thieme Verlag KG, Lizenz: 5816370556963 (2)

1.1.3 Netzhaut (Retina)

Ein hinsichtlich des Gewebes zum Gehirn zugehöriger Teil, die Netzhaut (Retina), kleidet den hinteren Abschnitt des Augapfels aus. Insbesondere bei Wirbeltieren und Säugetieren, aber auch bei den meisten anderen mehrzelligen Lebewesen, haben sich im Laufe der Evolution spezifische Rezeptoren für spezielle Sinnesorgane entwickelt, um Licht, Geräusche, Geschmack und Duftstoffe wahrzunehmen und darauf reagieren zu können. Im menschlichen Auge existieren in den spezialisierten Zellen der Netzhaut zwei Typen von Photorezeptoren. (3)

So enthält die Netzhaut etwa 110 Millionen Stäbchenzellen, welche für das Sehen im Dunkeln verantwortlich sind, während rund 6 Millionen Zapfenzellen das Farbsehen

ermöglichen. Ein lichtempfindliches Protein namens Rhodopsin, das in den Stäbchenzellen vorkommt, spielt dabei eine zentrale Rolle, da es auf geringe Lichtreize reagieren und sich an Unterschiede in der Lichtintensität anpassen kann. (3)

Obwohl die optische Schicht der Netzhaut nur etwa eine Dicke von 0,2 mm aufweist, besteht sie aus einer komplexen Architektur verschiedener Nervenzellschichten (Abbildung 2). Entgegen der Erwartung befinden sich die Sinneszellen (Zapfen und Stäbchen) nicht dem Licht zugewandt, sondern sind nach innen orientiert, zum Pigmentepithel hin, welches an die Aderhaut grenzt. Zwischen den Lichtsensoren und dem einfallenden Licht liegen acht verschiedene Netzhautschichten sowie die Blutgefäße der Netzhaut, die alle vollständig durchsichtig sind. (2)

Die Gefäßversorgung erfolgt durch die Sehnervenscheibe (Papille, Discus nervi optici), wo Blutgefäße und Nervenfasern ins Auge eintreten bzw. austreten (Abbildung 3). Diese Stelle wird auch als blinder Fleck bezeichnet, da es dort keine Sinneszellen gibt. Über die gesamte optische Schicht der Netzhaut verteilen sich Arterien und Venen. Der zentrale Bereich, die Fovea (Fovea centralis, Sehgrube), ist jedoch frei von Blutgefäßen. Hier befindet sich auch die Stelle des schärfsten Sehens, umgeben vom gelben Fleck (Makula, Macula lutea).(1,2)

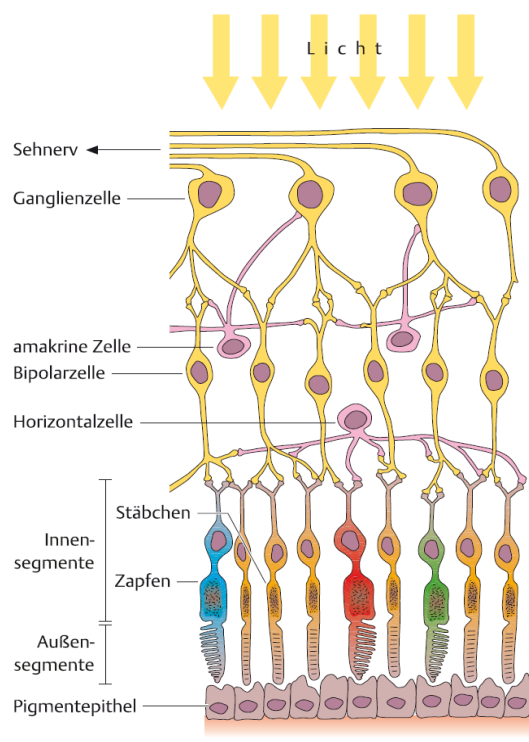


Abbildung 2: Schematische Darstellung und Aufbau der Netzhaut im Randbereich der Fovea; Mit Genehmigung der Georg Thieme Verlag KG, Lizenz: 5816370556963 (2)

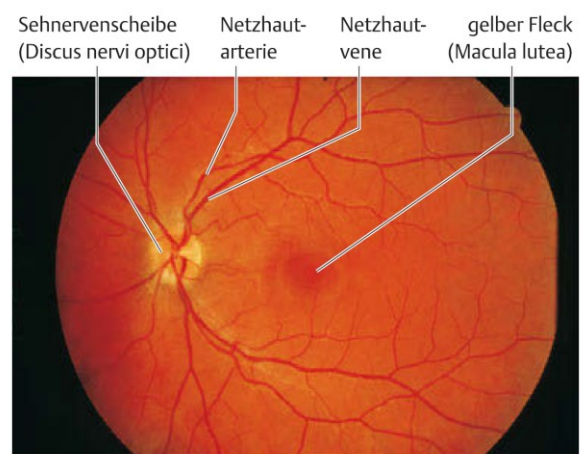


Abbildung 3: Hinterer Pol der Netzhaut; Mit Genehmigung der Georg Thieme Verlag KG, Lizenz: 5816370556963 (2,24)

Der Augenhintergrund zeigt bei Betrachtung mit dem Augenspiegel den Austritt des Sehnervs auf der nasal Seite der Netzhaut (hier des linken Auges). Diese Stelle, bekannt als blinder Fleck, ist der Eintrittspunkt der arteriellen Gefäße ins Auge, die sich dann baumkronenartig, mit Ausnahme der Fovea centralis (Sehgrube), über die gesamte Netzhaut verteilen. Die Fovea centralis wird von einer wulstartigen Aufwerfung der Netzhaut, der Macula lutea, umgeben.

Wie bereits erwähnt, bilden lichtempfindliche Rezeptoren, die Stäbchen und Zapfen, die Zellschichten, aus welchen die Netzhaut besteht. Es gibt drei verschiedene Zapfentypen, die jeweils für unterschiedliche Farben (rot, grün und blau) empfindungsfähig sind. Der Sehnerv leitet die teilweise schon verarbeiteten Informationen weiter, da innerhalb der Netzhaut bereits eine erste Signalverarbeitung stattfindet. (1,2)

1.1.4 Macula lutea und Fovea centralis

Temporal der Papille, in der optischen Achse des Auges, liegt die pigmentierte und daher gelbliche Macula lutea (gelber Fleck), deren Zentrum eine kleine Vertiefung, die Fovea centralis, bildet. In der Fovea centralis, die einen Durchmesser von etwa 1–1,5 mm hat, sind die vorhandenen Rezeptoren, ausschließlich Zapfen, am dichtesten gepackt. Wie bereits erwähnt fehlen hier Blutgefäße und die darüber liegenden Netzhautschichten sind zur Seite gedrängt. Diese besondere Architektur hat zur Folge, dass Objekte optimal scharf und mit minimaler Verzerrung gesehen werden, wenn sie in der Fovea abgebildet werden. Der restliche Teil der Netzhaut dient hauptsächlich dazu, Bewegungen wahrzunehmen, während jedes Objekt, welches gezielt fokussiert wird, in der Fovea abgebildet wird. (1,2)

1.2 Funktion des Auges

Bevor das Licht die Rezeptoren erreicht, durchdringt es zunächst alle (durchsichtigen) Schichten der Netzhaut. Durch die Belichtung der Fotorezeptoren wird ein fotochemischer Prozess ausgelöst, der zur Hyperpolarisation der Rezeptormembran führt. Diese Veränderung des Potentials wird über bipolare Zellen, Horizontalzellen und amakrine Zellen (innere Körnerschicht) an die Ganglienzellen weitergeleitet. Ihre Axone verlaufen zur Papille und bilden von dort an den Sehnerv.(1,2)

In den Ganglienzellen entstehen aus diesen „langsamen“ Potentialen frequenzmodulierte Aktionspotenziale, welche über die Axone der Ganglienzellen alias. den Sehnerv (N. opticus) an das Gehirn weitergeleitet werden.(1)

1.2.1 Verlauf der Sehbahn

Der Verlauf der Sehbahn beginnt mit den Axonen der retinalen Ganglienzellen, die sich zum Sehnerv (N. opticus) vereinigen und durch die Lamina cribrosa der Sklera

das Auge verlassen. Außerhalb des Augapfels erhalten diese Axone eine Myelinscheide und sind von Dura, Pia mater und Arachnoidea umgeben, die als Optikus-scheide bezeichnet werden. (1)

Der Sehnerv verläuft in einer leichten Windung zum Foramen opticum und gelangt in das Schädelinnere zum Chiasma opticum, wo die Sehnerven beider Augen zusammentreffen und sich die Fasern der nasalen Netzhauthälften kreuzen. Die Axone der retinalen Ganglienzellen enden im Corpus geniculatum laterale des Thalamus, das in sechs Schichten gegliedert ist. Von dort verlaufen die Axone als Sehstrahlung zur Sehrinde, wo sie enden und die Grundlage des binokularen Sehens bilden. (1)

1.3 Genetische Erkrankungen des Auges

Die Bedeutung der Genetik bei Augenkrankheiten nimmt stetig zu. Augenkrankheiten wie Retinoblastom, Leber-Optikusatrophie und viele retinale Erkrankungen dienen häufig als Modelle für die genetische Vererbung. Es wird geschätzt, dass etwa ein Drittel der Blindheitsfälle in Europa auf erbliche Augenkrankheiten zurückzuführen sind. (1)

1.3.1 Vererbte Netzhautdystrophien

Vererbte Netzhauterkrankungen sind eine häufige Ursache für Sehbehinderungen und umfassen eine heterogene Gruppe von Zuständen, die durch Funktionsstörungen, Degenerationen der Netzhaut oder des retinalen Pigmentepithels hervorgerufen werden. (4)

Zuallererst muss der Augenarzt/die Augenärztin den Phänotyp klassifizieren. Nicht nur der Erbgang, auch die Penetranz (Manifestationsrate bei Genträgern), die mögliche Expressivität (Ausprägungsgrade) und die durch genetisch bedingte Erkrankungen verursachte Sehbehinderung spielen eine entscheidende Rolle für die Diagnose. Eine eindeutige humangenetische Beratung setzt voraus, dass der Augenarzt den Phänotyp der vererbten Erkrankung korrekt erfasst und einordnet. Dazu kann es nötig sein, dass auch betroffene und angeblich gesunde Verwandte untersucht werden müssen, um festzustellen, ob eine rezessive, dominante oder x-chromosomale Vererbung wahrscheinlich ist oder ob es sich um einen sporadischen Fall in der Familie handelt. (1)

1.3.1.1 Rezessiv vererbte Erkrankungen

Bei der Diagnose von rezessiven Erkrankungen ist zu beachten, dass beide Elternteile Träger desselben Gens sind, diese allerdings jeweils nur heterozygot, weshalb die Eltern selbst meist asymptomatisch sind. Die Wahrscheinlichkeit, dass Kinder von der Genvariante der Eltern betroffen sind (Wiederholungswahrscheinlichkeit), beträgt bei jeder Schwangerschaft 25 %.(1)

Die Wiederholungswahrscheinlichkeit und somit das Risiko für das Auftreten eines erblichen rezessiven Krankheitsbildes, erhöht sich drastisch bei Blutsverwandtschaften (Verwandtenehen), da identische rezessive Genvarianten innerhalb derselben Familie bei konsanguinen Familienverhältnissen häufiger kombiniert werden. (1)

Entscheidend für die Einschätzung des Risikos sind eine genaue Familienanamnese über mehrere Generationen, der eventuelle Verwandtschaftsgrad der beiden Ehepartner und ob es sich um ein sehr seltenes oder ein relativ häufiges genetisches Erkrankungsbild handelt. Beispiele für rezessiv vererbte Augenerkrankungen umfassen die häufigste Form der Retinopathia pigmentosa (Retinitis pigmentosa), das kongenitale Glaukom, Tritanopie, den Morbus Stargardt (juvenile Makuladegeneration, Fundus flavimaculatus), die kongenitale Amaurose (Leber) und das Usher-Syndrom. (1)

1.3.1.2 X-Chromosomal vererbte Erkrankungen

Ein X-chromosomalen Erbgang zeichnet sich dadurch aus, dass Männer phänotypisch betroffen und Frauen bei Trägerschaft der Variante Überträgerinnen (Konduktorinnen) sind. Merkmalsfrei sind alle Söhne betroffener Männer, denn sie erhalten vom Vater nur das Y-Chromosom, während alle Töchter durch das X-Chromosom des Vaters Konduktorinnen werden. 50 % der männlichen Nachkommen von Konduktorinnen erkranken, bzw. sind Hemizygot Variantenträger und die Hälfte der weiblichen Nachkommen werden selbst wieder zu Überträgerinnen. Erkrankungen wie Hämophilie oder die Rot-Grün-Blindheit sind klassische Beispiele hierfür. (1)

Bei einigen Erkrankungen wie beispielsweise der Chorioideremie, einem erblichen Schwund der Aderhaut, kann es jedoch vorkommen, dass auch Konduktorinnen manifest erkranken oder zumindest rudimentäre Krankheitszeichen aufweisen. Bei Männern führt dieser Erkrankung zur Erblindung, während bei Frauen trotz normalem Sehvermögen eine unregelmäßige Pigmentierung in der Fundusperipherie möglich

ist. Dieses Muster der möglichen phänotypischen Ausprägungen gilt auch für die X-chromosomal vererbte Form der Retinopathia pigmentosa (intermediär geschlechtsgebundener Erbgang) oder okulären Albinismus. (1)

1.3.1.3 Progressive Retinal Degeneration

Die progressive Retina-Degeneration beschreibt eine Gruppe von genetischen Erkrankungen, die allmählich die Netzhaut des Auges schädigen. Diese Erkrankungen führen zu einem schrittweisen Verlust des Sehvermögens und können letztendlich zur Blindheit führen. Beispiele hierfür sind Retinitis pigmentosa, Stargardt-Krankheit und Usher-Syndrom. Die Symptome beginnen oft mit Schwierigkeiten beim Sehen in der Dunkelheit und peripheren Sehverlust, der sich dann auf das zentrale Sehvermögen ausdehnt. Es gibt derzeit keine Heilung, aber fortschreitende Forschung und klinische Studien bieten Hoffnung auf zukünftige Behandlungen. (5)

1.3.1.4 Retinopathia pigmentosa/Retinitis pigmentosa

Retinopathia pigmentosa ist eine Erkrankung der Netzhaut/Aderhaut, die in verschiedenen Formen auftritt und das Sehvermögen schrittweise beeinträchtigt. Die pigmentäre Degeneration der Retina (Retinitis pigmentosa) umfasst über 30 genetisch und klinisch unterschiedliche Formen von fortschreitender Blindheit, die durch die Degeneration des Pigmentepithels der Retina verursacht werden. Diese Erkrankung entsteht unter anderem aufgrund von Mutationen in Genen, die Proteine kodieren, die an der Lichtsignalübertragung beteiligt sind. (3)

Insbesondere im Erwachsenenalter ist, mit einer Häufigkeit von 1:3500, die RP (Retinitis pigmentosa) eine der Hauptursachen für Blindheit, obwohl es auch juvenile Formen gibt. Die Erkrankung äußert sich im Auge durch eine zunehmende Pigmentierung der Netzhaut, die von zahlreichen weiteren Manifestationen und sekundären Veränderungen begleitet wird. Ausgehend von der Peripherie bis zum Zentrum schreitet die Pigmentdegeneration voran und endet mit einem sehr kleinen, auf die Makula begrenzten Gesichtsfeld, das als „Röhrensehen“ bezeichnet wird. Eben diese Pigmentverschiebungen in der Netzhaut führen teilweise zur langsamen Erblindung, durch eine Mutation in einem der vielen bereits beschriebenen dafür in Frage kommenden Genorten.(3,6)

1.3.1.4.1 Vererbungsformen der Retinitis pigmentosa

Der Verlauf der autosomal dominanten Retinopathia pigmentosa (mindestens 14 verschiedene Gene sind bekannt) ist meist relativ mild. Eine allelische genetische Heterogenität konnte durch verschiedene Punktmutationen sowie Deletionen von DNA-Basen im Rhodopsin-Gen, durch molekulargenetische Untersuchungen nachgewiesen werden. (1,3)

Die Heterozygotenfrequenz der autosomal rezessive Retinopathia pigmentosa liegt bei etwa 1:42, wobei eine Pseudodominanz möglich ist. (1)

Konduktorinnen X-chromosomaler rezessive Retinopathia pigmentosa können gelegentlich Mikrosymptome zeigen, welche jedoch sehr variabel ausfallen können. Die Mehrheit der von X-chromosomaler RP betroffenen Personen ist auf eine Mutation im Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator (RPGR) Protein zurückzuführen. Zusätzlich konnten noch mehrere weitere ursächliche Genorte identifiziert werden (Heterogenität). Inzwischen ist auch eine pränatale molekulargenetische Diagnostik möglich. (1,7)

Die autosomal dominanten Formen, autosomal rezessiven und X-chromosomale Formen, sind klinisch praktisch nicht unterscheidbar. RP kann auch in Kombination mit angeborener Taubheit als autosomal rezessives Usher-Syndrom auftreten, das durch Mutationen in 11 verschiedenen Genen verursacht wird. (6)

Die verschiedenen Vererbungsformen der Retinitis pigmentosa treten mit unterschiedlicher Häufigkeit auf. Etwa 25 % der Fälle sind autosomal dominant, ungefähr 20 % sind autosomal rezessiv, nur 8 % sind X-chromosomal vererbt und bei etwa 47 % ist der Erbgang im Einzelfall unklar. (3)

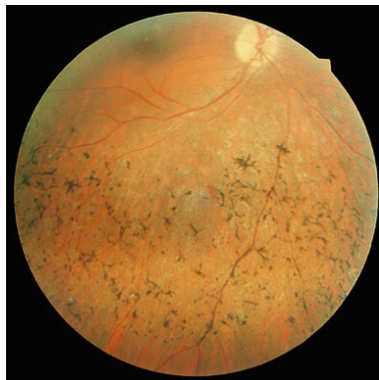


Abbildung 4: Retinopathia pigmentosa, fortgeschrittenes Stadium. Die Pigmentierung der Netzhautperipherie zeigt sich in Form von "Knochenkörperchen", begleitet von einer wachsgelben Atrophie der Papille, die am oberen Rand des Bildes zu sehen ist, sowie fadenengen Netzhautarterien. Das Krankheitsbild lässt sich am Augenhintergrund anhand der Pigmentverklumpungen in der mittleren und äußeren Netzhautperipherie erkennen, die treffend als "Knochenkörperchen" oder "Knochenbälkchen" beschrieben werden. Mit Genehmigung des Springer Verlags, Lizenz: 5815971439645 (1)

1.3.1.4.2 Phänotypische Merkmale der Retinitis pigmentosa

Zu den wichtigen diagnostischen Zeichen der RP gehören Veränderungen des Augenhintergrundes wie Gefäßverengungen, eine wachsgelbe Papille, Makulaveränderungen, eine Verbreiterung der Reflexe sowie Veränderungen des Pigmentepithels. Auch das Elektoretinogramm zeigt charakteristische Veränderungen. Zusätzlich treten bei der Retinitis pigmentosa häufig sekundäre Erscheinungen im vorderen Augenabschnitt auf, darunter Veränderungen des Glaskörpers, Linsentrübung (Katarakt) und Kurzsichtigkeit (Myopie). (3)



Abbildung 5: Unauffälliger Fundus (Fundusbild eines Patienten mit Retinopathia); Mit Genehmigung des Springer Verlags, Lizenz: 5815971439645 (1)



Abbildung 6: Auffälliger Fundus (Autofluoreszenzbild des Fundus eines Patienten mit Retinopathia pigmentosa sine pigmento) mit korniger Pigmentierung des Pigmentepithels der mittleren Netzhautperipherie; Mit Genehmigung des Springer Verlags, Lizenz: 5815971439645 (1)

1.4 Retinitis pigmentosa GTPase-Regulator-Gen / (RPGR)-Gen

RPGR-pathogene Varianten sind die Hauptursache für X-chromosomale Retinitis pigmentosa. Die X-chromosomale RP ist die schwerste Form der RP, mit frühem Beginn und schneller Progression bei Männern. (7,8)

Die X-chromosomale RP wird hauptsächlich durch pathogene Varianten in zwei Genen verursacht: *RP2* (10 %–20 % der Fälle) und *RPGR* (70 %–90 % der Fälle). Es wurde berichtet, dass pathogene Varianten im *RPGR* auch andere nicht-syndromale Netzhautdystrophien wie Zapfendystrophie, Zapfen-Stäbchen-Dystrophie und Makuladystrophie verursachen können. Weibliche heterozygote Fälle für *RPGR*-pathogene Varianten können eine Vielzahl von asymptomatischen bis schweren Symptomen zeigen. Die meisten Frauen sind jedoch im Vergleich zu Männern nur leicht betroffen.

Das Retinitis pigmentosa GTPase-Regulator (RPGR)-Protein befindet sich in den Verbindungscilien der Stäbchen- als auch der Zapfenphotorezeptoren. Unter anderem ist das vom *RPGR*-Gen codierte Protein für den Transport von Eiweißen und anderen Biomolekülen innerhalb der Netzhaut verantwortlich. Es wird vermutet, dass das Protein weiters an der Organisation der Mikrotubuli und/oder der Transportregulation in den Cilien beteiligt ist. (7,8)

RPGR hat zwei Haupt-Transkripte (Abbildung 8), die durch alternatives Spleißen produziert werden. Ein 19-Exon-Transkript, welches in den meisten Geweben vorkommt und ein 15-Exon-Transkript, welches in der Netzhaut gefunden wird. (8)

Das 15-Exon-Transkript von RPGR (Abbildung 7) ist das einzige Transkript, von dem bekannt ist, dass es an der X-chromosomalen RP beteiligt ist. Über 650 pathogene Varianten wurden bislang im 15-Exon-Transkript gefunden und gemeldet (Human Gene Mutation Database (HGMD)). Die Mehrheit (etwa 88 %) der gemeldeten pathogenen Varianten sind Funktionsverlustvarianten, insbesondere Nonsense- und Frameshift-Varianten. (8)

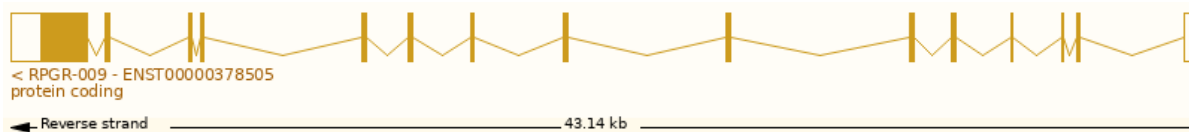


Abbildung 7: Auszug aus Ensembl.org *RPGR* Transkript NM_001034853.1, Exons: 15, Coding exons: 15

1.4.1 Open Reading Frame 15 (ORF 15) des *RPGR*-Gens

Das *RPGR*-Gen enthält die stark repetitive ORF15-Region, welche einen Mutations-Hotspot darstellt und eine der häufigsten Ursachen für X-chromosomale Retinitis pigmentosa ist. (4)

Es handelt sich dabei um das letzte Exon im 15-Exon-Transkript des *RPGR*-Gens (üblicherweise ORF15 genannt) des Transkriptes NM_001034853.2. Es ist relativ groß, extrem reich an Purinen im codierenden Strang und enthält die Mehrheit der pathogenen *RPGR*-Varianten. ORF15 ist viel länger als Exon 15 im 19-Exon-Transkript des *RPGR*-Gens. Es stellt eine Herausforderung dar, ORF15 mit Standardsequenzierungsmethoden zu sequenzieren, da die DNA-Sequenz dort eine hohe Repe-

tivität aufweist. Dadurch kommt es zu Schwierigkeiten bei der eindeutigen Zuordnung der Sequenzierungen zu den Genomregionen, was dazu führt, dass diese Region auch in WGS-Datenanalysen oft schlecht abgedeckt wird. (4,8,9)

Es gibt unterschiedliche Ansätze zur Sequenzierung des ORF15, wie Sanger-Sequenzierung, long-range Polymerase-Kettenreaktion (PCR) gefolgt von short-read-Next Generation Sequencing (NGS) der PCR-Produkte, sowie NGS allein. Aktuelle Studien zeigen, dass die Verwendung von WGS, gepaart mit spezifisch angepassten Algorithmen zur Identifikation struktureller Varianten, die Präzision bei der Erkennung und Charakterisierung von pathogenen Mutationen in stark repetitiven Regionen wie *RPGR* ORF15 erheblich verbessern können. (4,8)

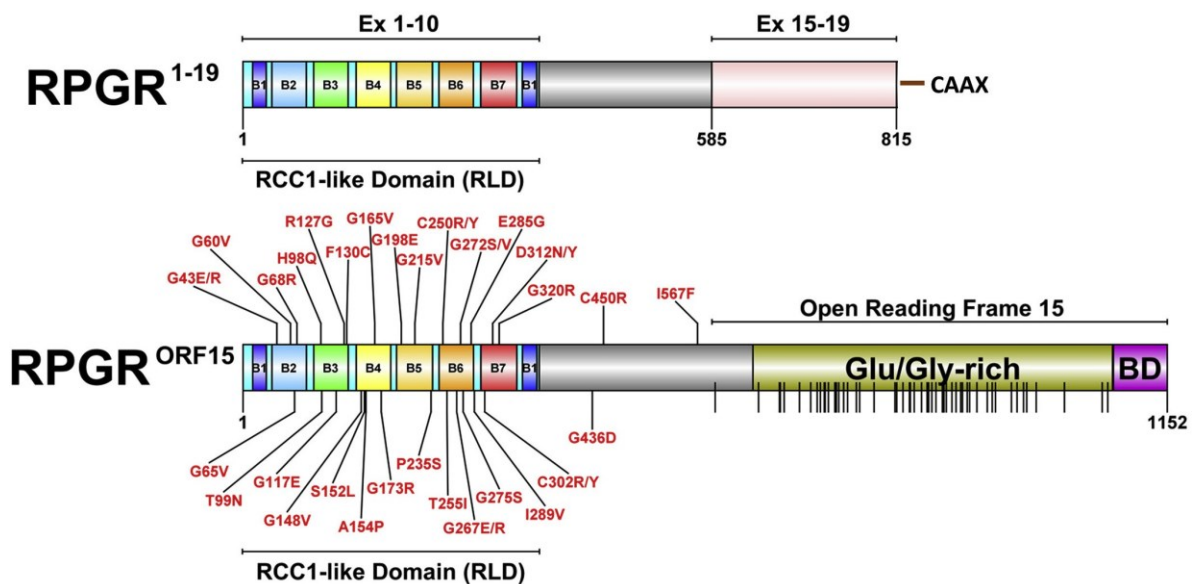


Abbildung 8: Schematische Darstellung der wichtigsten RPGR-Protein-Isoformen (konstitutives RPGR Ex1-19 und RPGRORF15) (7)

Die schematische Darstellung der Domänenarchitektur beider Hauptisoformen ist maßstabsgetreu gezeichnet. Die Segmente B1 bis B7 und die Beta-Propeller-RCC1-ähnliche Domäne (RLD) bilden die innerhalb der Exons 1-10 in beiden Hauptisoformen kodierten Bereiche. Die C-terminale Isoprenylierungsstelle (CAAX) von RPGR^{Ex1-19} ist ebenfalls eingezeichnet. Die Position der Glutamat/Glycin-reichen Domäne und der Basischen Domäne (BD) von RPGR^{ORF15} innerhalb des Offenen Leserahmens 15 ist hervorgehoben. Einige bekannte krankheitsverursachenden Missense-Mutationen (beschriftet) und insgesamt 52 weitere bekannte Nonsense-Mutationen, die speziell im Offenen Leserahmen 15 lokalisiert sind (vertikale Linien auf der schematischen Darstellung der Domäne), sind angegeben. Die Mutationsdaten wurden aus der Human Gene Mutation Database (Stenson et al., 2014) (zugegriffen am 27. Mai 2015) kartiert. (7)

1.5 Fallbeschreibung

Diese Arbeit befasst sich mit einer konsanguinen Familie (OPH 48) aus Pakistan, in welcher Augenerkrankungen über mehrere Generationen hinweg aufgetreten sind. Die Familie OPH48 wurde von Dr. Muzammil Ahmasd Khan (Gomal University, Dera Ismail Khan, Pakistan) rekrutiert. Die in Kooperation durchgeführten Studien wurden von den Ethikkommissionen der Gomal University, Dera Ismail Khan, Pakistan, genehmigt (Genehmigungsnummern: 04/ERB/GU und 32/DQA/GU).

Das Probenmaterial wurde in Form von Blut mit einer anschließenden DNA-Extraktion von betroffenen und nicht betroffenen Familienmitgliedern entnommen (Stammbaum Abbildung 13). Die Patienten haben eine Einverständniserklärung für die Verwendung ihrer klinischen Daten und des Stammbaums unterzeichnet, diese liegen bei Dr. Muzammil Ahmad Khan, Hamad Medical Corporation Doha in Katar auf.

Der handgezeichnete Stammbaum, welcher von Dr. Muzammil Ahmad Khan mit den eingezeichneten Probenmaterialien in anonymisierter Form erstellt wurde, enthielt ebenfalls den Phänotyp „progressive Retinal degeneration“, kurz Retinal degeneration genannt. Insgesamt sind 9 Personen phänotypisch betroffen, wobei es sich ausschließlich um männliche Probanden handelt.

Die Informationen über den Phänotyp der untersuchten Familie sind begrenzt. Bekannt ist lediglich die Information, dass ein 17/18-jähriges Familienmitglied seit dem Alter von 6-7 Jahren an Nachtblindheit leidet, sowie die allgemeine Tatsache, dass in der Familie die vollständige Erblindung im Alter von 45-50 Jahren eintritt, wobei nur noch Lichtwahrnehmung erhalten bleibt. Es gibt eine innerfamiliäre phänotypische Variabilität und eine verzögerte Dunkeladaptation.

Weitere Phänotypische Merkmale und Informationen sind nicht bekannt, daher wurde ein breites Spektrum von Augenkrankheiten für die Analyse einer eventuellen ursächlichen Mutation in Betracht gezogen. Neben dem Phänotyp Retinal degeneration (HP:0000546), wurden mittels eines Genpanels spezifisch für Augenerkrankungen weitere Phänotypen wie Abnormality of ophthalmic artery (HP:0410006), Ophthalmic artery occlusion (HP:0020164), External ophthalmoplegia (HP:0000544), Ophthalmoparesis (HP:0000597), Ophthalmoplegia (HP:0000602), Congenital ophthalmoplegia (HP:0001491) und Retinal disease (HP:0000479) in Betracht gezogen und analysiert.

2 Ziel / Hypothesenbeschreibung

Ziel dieser Arbeit ist es, trotz fehlender ausführlicher phänotypischer Beschreibung des Krankheitsbildes, eine mögliche Mutation in der Familie OPH48 zu identifizieren, die für die auftretenden Augenerkrankungen ursächlich sein könnte. Im weiteren Verlauf soll die gefundene Variante mit bekannten Mutationen abgeglichen werden, um ihren möglichen Einfluss besser abschätzen zu können.

3 Material und Methoden

3.1 Stammbaumanalyse

Bei der Stammbaumanalyse wurde die mögliche Vererbung genetischer Merkmale innerhalb einer Familie untersucht. Dazu wurden mehrere Generationen erfasst und systematisch ausgewertet. Durch die Erstellung und Analyse des Stammbaums können Muster der Vererbung identifiziert und Rückschlüsse auf mögliche genetische Ursachen gezogen werden. Zudem ermöglicht die Untersuchung abzuwägen, welche der verschiedenen Vererbungsmodelle, wie autosomal-dominant, autosomal-rezessiv oder X-chromosomal rezessiv/dominant etc., am wahrscheinlichsten erscheinen, um folgende Analyseschritte zu erleichtern.

3.2 Probenaufreinigung & DNA-Extraktion

Die Aufreinigung und Extraktion der DNA wurde die genomische DNA aus den erhaltenen EDTA-Vollblut-Proben der Familie OPH48-1 bis OPH48-11 durchgeführt. Ausgenommen davon ist die Probe OPH48-7. Die Probe von OPH48-7 wurde nicht ins Labor versandt und konnte auch nachträglich, aufgrund der teils schwierigen Probengewinnung in Pakistan, nicht nachgefordert werden. Daher wird OPH48-7 zwar wie im handgezeichneten Stammbaum auch im digitalen Stammbaum vermerkt, weitere Analysen konnten mit dieser Probe jedoch nicht durchgeführt werden.

3.2.1 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion wurde mittels einer modifizierten Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Die einzelnen Schritte sind im Folgenden beschrieben:

Teil 1:

1. EDTA-Vollblut wurde 1:1 mit TKM1-Puffer in 15 ml Zentrifugenröhrchen verdünnt und 10 x geschwenkt. (Pro Röhrchen maximal 8 ml EDTA-Vollblut plus 7 ml TKM1. Befindet sich weniger als 8 ml Blut im Zentrifugenröhrchen, 1:1 (z.B.: 5 ml EDTA-Vollblut + 5 ml TKM1) mischen.)
2. Das Gemisch wurde 10 x geschwenkt und anschließend für 10 Minuten bei Raumtemperatur und 2000 g zentrifugiert.
3. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 2,5 ml TKM1 versetzt. Das Gemisch wurde anschließend durch Schütteln gemischt. Anschließend wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur und 2000 g zentrifugiert.
4. Der Waschschritt (Schritt 3) wurde so lange wiederholt, bis das Pellet weiß bzw. der Überstand farblos ist. Der Überstand zwischen den einzelnen Waschvorgängen wurde jeweils vorsichtig abgegossen.
5. Ist das Pellet weiß bzw. der Überstand farblos, wird der Rest vom Überstand vorsichtig abpipettiert.
6. Für jedes EDTA-Vollblutröhrchen wurde ein Eppendorf-Tube (1,5 ml) mit TKM2-Puffer, Proteinase K und SDS vorbereitet

pro ml Vollblut: 160µl TKM2
 20µl 10 mg/ml Proteinase K
 20µl 10 % SDS

MOCK (Blank): 160µl TKM2
 20µl 10 mg/ml Proteinase K
 20µl 10 % SDS

ab 5 ml Vollblut: 800µl TKM2
 100µl 10 mg/ml Proteinase K
 100µl 10 % SDS

7. Das Pellet wurde in die vorbereitete Lösung überführt und bei 48 °C für 16–22 Stunden in einem Thermomixer bei 950 rpm inkubiert. Für den MOCK (Blank) wurden 100 µl TKM1 (anstelle des Pellets) eingesetzt.

Teil 2:

1. Nach der Inkubation wurde Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) unter einer Werkbank zugegeben. Jedes Eppendorf-Tube wurde ca. 20 sec gevortext und 5 min bei Raumtemperatur bei 13.000 rpm (16.100g) zentrifugiert.
2. Der Überstand wurde vorsichtig in ein neues Eppendorf-Tube überführt, ohne die Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Schicht zu berühren.
3. 500µl Chloroform wurden hinzupipettiert, anschließend für ca. 20 sec gevortext und für 5 min bei Raumtemperatur und 13000 rpm (16.100 g) zentrifugiert.
4. Der wässrige Überstand (ohne Chloroform) wurde abgehoben und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Der Überstand des Mock/Blank wird in ein Eppendorf-Tube überführt.
5. Das 6-fache Überstandsvolumen von 100 %EtOH (bei -20 °C gelagert) wurde zum Überstand in das 15 ml Zentrifugenröhrchen zugeben und die DNA, durch mehrmaliges (mind. 10 x), vorsichtiges Schwenken präzipitiert.
(Falls keine DNA sichtbar wäre, würde die gesamte Lösung in Eppendorf-Tubes überführt, über Nacht bei -20 °C inkubiert. Danach würde 5min bei Raumtemperatur und 13000 rpm (16100 g) zentrifugiert. Der Überstand würde abgegossen, das Pellet mit 70 % EtOH versetzt und mit Schritt 9 fortgefahren.
6. Für jedes 15 ml Zentrifugenröhrchen wurden Eppendorf-Tubes mit 500µl 70 % EtOH vorbereitet.
7. Die ausgefällte DNA wurde in das vorbereitete Eppendorf-Tubes mit 70 % EtOH überführt.
8. Zum Mock-Überstand im Eppendorf-Tube wurde das 6fache Volumen 100 % EtOH dazu pipettiert, geschwenkt und 1min bei Raumtemperatur und 13000rpm (16.100g) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und die vermutete DNA mit 500µl 70 % EtOH versetzt.
9. Alle Eppendorf-Tubes (inklusive Mock/Blank) wurden 4–5x geschwenkt und anschließend 1 min bei Raumtemperatur und 13000 rpm (16.100 g) zentrifugiert.
10. Der Überstand von allen Eppendorf-Tubes wurde erneut abgegossen und das Pellet nochmals mit 500 µl 70 % EtOH versetzt, 4–5x geschwenkt, damit das Pellet in der Lösung schwimmt.

11. Alle Eppendorf-Tubes (inklusive Mock/Blank) wurden für 1 min bei Raumtemperatur und 13000 rpm (16.100 g) zentrifugiert.
12. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet mit 500µl 100 % EtOH versetzt. Es wurde erneut geschwenkt und wieder 1 min bei Raumtemperatur und 13000 rpm (16.100 g) zentrifugiert.
13. Der Überstand wurde abgegossen und die Restflüssigkeit vorsichtig abpipettiert. Das DNA-Pellet wurde für 30 min bei Raumtemperatur getrocknet.
14. Das getrocknete DNA-Pellet wurde in 10 mM TE-Puffer pH 8,8 resuspendiert und über Nacht bei 4 °C gelöst.

Teil 3:

1. Die Proben wurden bei 37 °C für 30 min in einem Thermomixer inkubiert.
2. Die DNA wurde durch Pipettieren und Zugabe von 10mM TE-Puffer pH 8,8 vollständig gelöst. Die Proben wurden anschließend nochmals für 10 min bei 37 °C und 950 rpm inkubiert.

3.2.2 Extrahierte DNA-Konzentration und Reinheit

Tabelle 1: DNA-Ratio der extrahierten DNA der Proben von Familie OPH48

Bezeichnung	Extraktionsdatum	Vorhandene Probenmenge EDTA-VB	Konzentration ng/µl	Ratio 260/280	Extrahiertes Probenvolumen µl
OPH48-1	28.08.2023	1,1	78,3	1,3	200
OPH48-2	28.08.2023	1,1	219,1	1,53	100
OPH48-3	28.08.2023	1,6	98,6	1,15	100
OPH48-4	28.08.2023	1,5	70,6	1,57	100
OPH48-5	28.08.2023	1,1	133	1,19	100
OPH48-6	28.08.2023	0,8	93,4	1,22	100
OPH48-8	28.08.2023	0,7	41,4	1,45	100
OPH48-9	28.08.2023	0,9	89,5	1,09	100
OPH48-10	28.08.2023	0,6	62,8	1,57	100
OPH48-11	28.08.2023	0,6	66	1,88	100

Lagerung der extrahierten DNA: -20 °C

3.3 Quality-Check-PCR

Zur Überprüfung der Qualität der extrahierten DNA und deren Eignung für eine PCR bzw. spätere Sequenzierungen wurde der Genabschnitt LAMA2-Exon30 (Exon Größe 125bp) von den extrahierten genomischen DNA-Proben der Familie OPH48 amplifiziert.

Folgende Proben wurden auf ihre PCR-Funktionalität getestet:

Tabelle 2: Auf molekularanalytische Eignung getestete Proben der Familie OPH48

OPH48-1	OPH48-2	OPH48-3	OPH48-4	OPH48-5
OPH48-6	OPH48-8	OPH48-9	OPH48-10	OPH48-11

Tabelle 3: Reaktionsansatz Mastermix (25µl) Quality-Check-PCR

Nuclease freies Wasser (NFW)	18,550µl
100 pmol/µl forward-Primer	0,125 µl
100 pmol/µl reverse-Primer	0,125 µl
25 mM je Base dNTP-Mix	0,100 µl
5x Colorless GoTaq® Reaction Buffer	5,000 µl
5 U/µl GoTaq® Polymerase	0,100 µl
+ 100 ng/µl DNA	+ 1,000 µl
Gesamt	25,000 µl

Primer-Sequenzen: LAMA2 Exon30

- Forward: TTCTCTGTCAGTGATAAAgtgtgtg TM: 58.51 °C
- Reverse: CATGTGCTAGACAGATGGCG TM: 60.44 °C
- Größe des Amplifikationsprodukts: 338 bp

Kontrollreaktionen:

- Positiv-Kontrolle: Laborinterne Test-DNA 692NL
- Non-template-Control (NTC)/Blank: Nuklease freies Wasser

Thermocycler-Programm für LAMA2 Exon30:

Pro-gramm:	Step 1	Step 2	Step 3*	Step 4	Step 6	Step 7
	96 °C	96 °C	62,5 °C	72 °C	72 °C	8 °C
	5 Minu- ten	10 Se- kunden +2 °C/sec R. Temp	10 Se- kunden	15 Se- kunden +2 °C/sec R. Temp	5 Minu- ten	∞
35x Cycles						

3.4 Agarosegel-Elektrophorese

Die Qualität der extrahierten DNA wurde mittels Agarosegel-Elektrophorese überprüft. 2 µl der verdünnten DNA (100 ng/µl) wurden mit 2 µl TBE-Ladepuffer gemischt und auf ein 1,5 % Agarosegel aufgetragen. Als Größenstandard diente in Abbildung 9 ersichtliche 100 bp DNA-Leiter von Invitrogen.

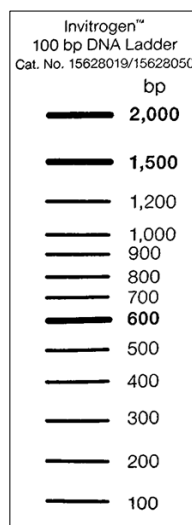


Abbildung 9: 100 bp DNA Ladder von invitrogen by Thermo Fisher Scientific (0,5µg/µl) (For Research Use Only)

Die Elektrophorese wurde bei 100 V für 20 Minuten durchgeführt. Das Agarosegel wurde unter UV-Licht visualisiert und fotografiert.

3.5 RPGR-Exon 15 Primerdesign

Um den betroffenen Genabschnitt, der eine mögliche Indel-Frameshift-Mutation des *RPGR*-Gens im Exon 15 aufweist, bei allen vorhandenen Proben mittels Sanger-Sequenzierung überprüfen zu können, wurden Primer für eine PCR sowie die nachfolgende Sanger-Sequenzierung entworfen. Diese Primer, als auch die PCR sind notwendig, um die Vervielfältigung des Genabschnitts vor der Sanger-Sequenzierung durchführen zu können.

Der Genom Browser der Online-Datenbank UCSC (Referenzgenom GRCh38/hg38) wurde für die Referenz der Sequenz des *RPGR*-Gens verwendet. Ausgewählt wurde das Transkript NM_001034853.2 aufgrund der mittels Franklin by genoox gefundenen Genvariante.

```

tgatogcttg tcagAGATCC CAGAGGAGAA GGAAGGAGCA GAGGATTCAA 38287210
AAGGAAATGG AATAGAGGAG CAAGAGGTAG AAGCAAATGA GGAAATGTG 38287160
AAGGTGCATG GAGGAAGAAA GGAGAAAACA GAGATCCTAT CAGATGACCT 38287110
TACAGACAAA GCAGAGGTGA GTGAAGGCCAA GGCAAAATCA GTGGGAGAAG 38287060
CAGAGGATGG CCCTGAAGGT AGAGGGGATG GAACCTGTGA GGAAGGTAGT 38287010
TCAGGAGCAG AACACTGGCA AGATGAGGAG AGGGAGAAGG GGGAGAAAGA 38286960
CAAGGGTAGA GGAGAAATGG AGAGGCCAGG AGAGGGAGAG AAGGAACTAG 38286910
CAGAGAAGGA AGAATGGAAG AAGAGGGATG GGGAAAGCA GGAGCAAAG 38286860
GAGAGGGAGC AGGGCCATCA GAAGGAAAGA AACCAAGAGA TGGAGGAGGG 38286810
AGGGGAGGAG GAGCATGGAG AAGGAGAAGA AGAGGAGGGA GACAGAGAAG 38286760
AGGAAGAAGA GAAGGAGGGA GAAGGGAAGG AGGAGGAGA AGGGGAGAAG 38286710
GTGGAGGGAG AACGTGAAA GGAGGAAGGA GAGAGGAAA AGGAGGAAAG 38286660
ACGGGGGAGG GAGGAGAAG GAGAGGAAGA AGGAGACCAA GGAGAGGGGG 38286610
AAGAGGAGGA AACACAGGGG AGAGGGGAGG AAAAAAGGA GGGAGGGGAA 38286560
GTAGAGGGAG GGGAAAGTAG GGAGGGGAAA GGAGAGAGGG AAGAGGAAAG 38286510
GGAGAGGGGT GAGGGGGGAG AGGAGGAAGG GGAGGGGAAA GAGGAGGAAG 38286460
GGGAGGGGGA AGAGGAGGAA GGAGAAGGGA AAGGGGAGGA AGAAGGGGAA 38286410
GAAGGAGAAG GGGAGGAAGA AGGGGAGGAA GGAGAAGGGG AGGGGGAAAG 38286360
GGAGGAAGGA GAAGGGGAGG GAGAAGAGGA AGGAGAAGGG GAGGGAGAAG 38286310
AGGAGGAAGG AGAAGGGGAG GGAGAAGAGG AAGGAGAAGG GGAGGGAGAA 38286260
GAGGAGGAAG GAGAAGGGAA AGGGGAGGAG GAAGGAGAGG AAGGAGAAGG 38286210
GGAGGGGGGA GAGGAGGAAG GAGAAGGGGA AGGGGAGGAT GGAGAAGGGG 38286160
AGGGGGAAGA GGAGGAAGGA GAATGGGAGG GGGAGAGGGA GGAAGGAGAA 38286110
GGGGAGGGGG AAGAGGAAGG AGAAGGGGAA GGGGAGGGAAG GAGAAGGGGA 38286060
GGGGGAAGAG GAGGAAGGAG AAGGGGAGGG GGAAGGAGAG GAAGGGGAAAG 38286010
AAGAAGGGGA GGAAGAAGGA GAGGGAGAGG AAGAAGGGGA GGGAGAAGGG 38285960
GAGGAAGGAG AGGAAGGGGA AGTGAAGGG GAGGTGAAG GGGAGGAAGG 38285910
AGAGGGGGGA GGAGAGGAAG AGGAAGGAGA GGAGGAAGGA GAAGAAAGGG 38285860
AAAAGGAGGG GGAAGGAGAA GAAAACAGGA GGAACAGAGA AGAGGAGGAG 38285810
GAAGAAGAGG GGAAGTATCA GGAGACAGGC GAAGAAGAGA ATGAAAGGCA 38285760
GGATGGAGAG GAGTACAAAA AAGTGAGCAA AATAAAAGGA TCTGTGAAAT 38285710
ATGGCAACA TAAACATAT CAAAAAAGT CAGTTACTAA CACACAGGGA 38285660
AATGGGAAG AGCAGAGGTC CAAAATGCCA TCCAGTCAA AACGACTTTT 38285610
AAAAACGGG CCATCAGGTT CCAAAAAGTT CTGGAATAAT GTATTACCAC 38285560
ATTACTTGGG ATTGAAGTAA CAARCCTTAA ATGTGACCCG ATTAATGGCCA 38285510
GTCAGACAAT TTAATGCCT TGCAATAAAC GGGCACTCAT TACGTGTTAT 38285460
TAAATTGATT TTATGTCAAT TATTTTATGT GTAGTAAAAA AAAAAGCAAC 38285410
TGATGCAGCT GTGTTAAGGA GCCAAAGACA ATAGGAGGCA CTGGTAAATT 38285360
TTGGCCTCTC TCAAACTAAA ATTTTCGTGT ATTTCCCCCC CAAATTATAA 38285310
AAACATRACT AGAAAATATT AAAAGGTCAT ATCAGATTAT TAACATTATA 38285260
TATTCATTAA AGGCAGCTTT AGGAACAGG AATATACTAC AAGAGTGTTT 38285210
TGTTTGTA TACAAATCAT TCCATTTTA AATGGCAGAG ATGCTTAAAG 38285160
GCTATAAAAA CTTCTAATTT CTTATAAATA TGTTAGCACT TTTTTAAGT 38285110
TAGTGATTAC AGTTTACCTA CTGTATAGAA TAATTTTCTA ATAATGGATG 38285060
GTATTTCTAAA ACTCAATTGA GGCATTCACA TTTTAAAGAA AGTATTGICT 38285010
TTCACCTTTT ATGTGTTCTT TTTGCAAAAA TCTACAAGT GACAGCTGTG 38284960
TTCAGAGCTT AGATCCCAA AACGTGATCT CTTTTAGTTA CTATCTGGGC 38284910
AGATGGTAGT ATATCTAATG AAATGGTAT TAATTTAAAT GTATAATCTG 38284860
GAAATATGTA AAACCTGAAG TATTTTTTGT CCAGGCAAGG TACTCAATTG 38284810
GGCCTCAGTT TCTTCATCTC TAAAATGGAG TGGATGAGAT GATGTGATAA 38284760
CTGCAGTCCC TTCTAACTCT TAAATCTTT TCATCTCAC AGATTCACCTC 38284710
TATCATTATT GTTATTCATG TAAGAAACGT TTTAGGGAGA AAAATTACAC 38284660
TTTTAAATTA ATTTAGTTTT CTATACAGTT GTTTTCTTTA CTCTTGAANA 38284610
GTTATGACAG CTTTAACTG TCITGCTTTC TGTAATTTTT TATTCTTAAA 38284560
CICCIATCAT TTCCAAGCTT TAACTGACT TTATCAGAGC CTTCAATTTCT 38284510
GGTATGTTT ATATGCCCTC AATGATTCA CTGACTGTTT TGTAAATTTA 38284460
GTTTGTCTGT TCCTTTCAG AATGTTTCAA GTAAAATAAA AAATTAATATG 38284410
TAcatagctca gaaattcttt atgaaaagat aaactgtcta gtattagata 38284360

```

Abbildung 10: Vollständige Sequenz *RPGR*-Gen Exon 15, Genom Browser der Online-Datenbank UCSC

In der Sequenz in Abbildung 10 repräsentieren Kleinbuchstaben die Introns (nicht-codierenden Abschnitte der DNA-Sequenz), während blaue Großbuchstaben die Exons darstellen (codierenden Abschnitte der DNA-Sequenz).

Die weitere farbliche Differenzierung sieht wie folgt aus: türkis/Cyan markierte Bereiche zeigen die Exon-Intron-Übergänge an, rote Bereiche kennzeichnen die 5'-UTR (untranslated region), die Teil der cDNA ist, aber nicht in Protein translatiert wird.

Der codierende Bereich von Exom 15, in welchem die Variante NM_001034853.2(*RPGR*):c.2420_2435del (p.Glu807Glyfs*3) liegt, umfasst 1705 bp. Für die Primerfindung wurde der Bereich auf 1092 bp eingegrenzt.

```
GAAAGAAACCAAGAGATGGAGGAGGGAGGGGAGGAGGCATGGAGAAGGAGAAGAAGAGGAGGGAGACAGAGAA
GAGGAAGAAGAGAAGGAGGGAGAAGGGAAAGAGGAAGGAGAAGGGGAAGAAGTGGAGGGAGAACGTGAAAAGGAG
GAAGGAGAGAGGAAAAAGGAGGAAAAGAGCGGGGAAGGAGGAGAAAAGGAGAGGAAGAAGGAGACCAAGGAGAGGGG
GAAGAGGAGGAAAACAGAGGGGAGAGGGGAGGAAAAAGAGGAGGGGAGGGAAGTAAAGTAGAGGGAGGGGAAGTAGAGGAG
GGGAAAGGAGAGAGGGAAAGAGGAAGAGGAGGAGGGTGGAGGGGAAGAGGACGGAAGGGGAGGGGGAAAGAGGAGGA
AGGGGAGGGGGAAAGAGGAGGAAGGAGAAGGGAAAGGGGAGGAAGAAGGGGAAGAAGGAGAAGGGGAGGAAGAAGG
GGAGGAAGGAGAAGGGGAGGGGGAAAGAGGAGGAAGGAGAAGGGGAGGGGAGAAGAGGAAGGAGAAGGGGAGGGAGA
AGAGGAGGAAGGAGAAGGGGAGGGGAGAAGAGGAAGGAGAAGGGGAGGGGAGAAGAGGAGGAAGGAGAAGGGAAAGG
GGAGGAGGAAGGAGAGGAAGGAGAAGGGGAGGGGGAAAGAGGAGGAAGGAGAAGGGGAAGGGGAGGATGGAGAAGG
GGAGGGGGAAAGAGGAGGAAGGAGAATGGGAGGGGGAAAGAGGAGGAAGGAGAAGGGGAGGGGGAAAGAGGAAGGAGA
AGGGGAAGGGGAGGAAGGAGAAGGGGAGGGGGAAAGAGGAGGAAGGAGAAGGGGAGGGGGAAAGAGGAGGAAGGGGA
AGAAGAAGGGGAGGAAGGAGAAGGGGAGGGGAGGAAGAAGGGGAGGGGAGAAGGGGAGGAAGAAGAGGAAGGGGAAGT
GGAAAGGGGAGGTGGAAGGGGAGGAAGGAGAGGGGGAAAGGAGAGGAAGAGGAAGGAGAGGAGGAAGGAGAAGAAAG
GGAAAAGGAGGGGAAAGGAGAAGAAAACAGGAGGAACAGAGAAGAGGAGGAGGAAGAAGAGGGGAAGTATCAGGA
GACAGGCCAAGAAGAGAATGAAAGGCAGGATGGAGAGGAGTA
```

Abbildung 11: Eingegrenzter Bereich des Exon 15 (*RPGR*) für das Primerdesign.

Abbildung 11 zeigt den eingegrenzten Bereich in der Größe von 1092 bp für die Primerfindung. Die von der Variante NM_001034853.2(*RPGR*):c.2420_2435del (p.Glu807Glyfs*3) betroffenen Basen sind gelb markiert.

Es wurde ein größerer Bereich des Exons um die Mutationsstelle gewählt, da sich in diesem Exon viele repetitive Sequenzen befinden, welche das Primerdesign erschweren.

Aufgrund der vielfältigen stark repetitiven Sequenzen in diesem Bereich des Exon 15, konnte kein Primer Paar gefunden werden, welches einen kleineren Abschnitt als das in Abbildung 12 dargestellte Amplifikationsprodukt (939 bp) zur Folge hat.

3.5.2 UCSC In-Silico PCR

Mittels UCSC In-Silico PCR wurde mit den generierten Primern eine In-Silico PCR durchgeführt, um sicherzustellen, dass die Primer spezifisch und unikal an der genomischen DNA im gewünschten Abschnitt des *RPGR*-Gens binden. Durch ein einzelnes Amplifikationsprodukt mit diesen Primer-Paaren als Ergebnis, mit einer Produktgröße von 939bp, konnte dies bestätigt werden.

3.5.3 Common SNPs in der Primerbinderegion

Mittels UCSC Genome Browser wurde auf dem X-Chromosom im Bereich chrX:38285773-38286711, die Binderegion der Primer auf etwaige häufige Single Nucleotide Polymorphismen bzw. „common SNPs“ untersucht, um sicherzustellen, dass die Primer in der Region auch bei unterschiedlichen Proben mit einer hohen Wahrscheinlichkeit korrekt binden und durch häufige Polymorphismen nicht beeinträchtigt werden. Wäre ein häufiger Polymorphismus in den Primer-Sequenzen lokalisiert, so könnte dies unter Umständen zu einem sogenannten „Allelic drop-out“ (Allelausfall) führen.

Im Zentrum des Reverse-Primers (CTTCTTCGCCTGTCTCCTGA) konnte ein common SNP entdeckt werden. Der Single-Nucleotide Polymorphism (SNP) rs111787313 befindet sich auf Chromosom X an der Position 38285780. Aufgrund einer dennoch geringen Allelfrequenz von unter 10 % in jenen Datenbanken, welche für die aus Pakistan stammenden Proben relevant sind, sowie der Lage des Mismatches im Zentrum des Reverse-Primers, anstatt am 3'-Ende, wurde davon ausgegangen, dass der Reverse-Primer dennoch effizient binden und die DNA-Polymerase die Verlängerung des Stranges fortsetzen kann.

3.5.4 Gradienten PCR

Um eine optimierte PCR-Amplifikation des gewünschten 939bp großen Produktes mit den für den mutationsumfassenden Abschnitt des 15ten Exons des *RPGR*-Gens mit den dafür designten Primern zu garantieren, wurde mittels einer Gradienten-PCR die optimale Schmelztemperatur (TM) der Primer ermittelt, da die Angaben der Schmelztemperatur des Primer3web Tool Version 4.1.0, sowie der Synthesereport der Primer-Herstellerfirma Merck sich deutlich unterschieden.

Primer Vorbereitung: Die bei der Firma Merck bestellten Primer wurden mit 10mM TrisHCL, pH 8.8 lt. Packungsanleitung resuspendiert.

Schmelztemperatur lt. Primer3web Tool Version 4.1.0:

- Forward-Primer (AAGTGGAGGGAGAACGTGAA): TM 58,58 °C
- Reverse-Primer (CTTCTTCGCCTGTCTCCTGA): TM 59,11 °C

Schmelztemperatur lt. Synthesereport von Merck:

- Forward-Primer (AAGTGGAGGGAGAACGTGAA) TM 63,6 °C
- Reverse-Primer (CTTCTTCGCCTGTCTCCTGA) TM 64,7 °C

Für das Annealing der Gradienten-PCR wurde der Temperaturbereich 55–68 °C gewählt.

Tabelle 4: Reaktionsansatz Mastermix Gradienten PCR (25µl):

Nuclease freies Wasser	18,550 µl
Forward-Primer 100pmol/µl	0,125 µl
Reverse-Primer 100pmol/µl	0,125 µl
dNTP-Mix 25mM je Base	0,100 µl
5x GoTaq® Reaction Buffer	5,000 µl
GoTaq® Polymerase 5U/µl	0,100 µl
Master-Mix Volumen	24,00 µl
+ DNA 100ng/µl *	1,000 µl
Reaktionsvolumen	25,000 µl

**Da nur eine sehr limitierte Menge an extrahierter DNA vorhanden ist, wurde, um Material zu sparen, bei den PCRs universell 1µl extrahierte und aufgereinigte DNA eingesetzt, unabhängig von dessen Konzentration.*

Aufgrund des erhöhten GC-Gehaltes der Primer-Paare wurde ein weitere Reaktionsansatz mit Dimethylsulfoxid (DSMO) angesetzt.

Tabelle 5: Reaktionsansatz Mastermix Gradienten PCR (25µl) mit DSMO für GC-reiche Sequenzbereiche:

Nuclease freies Wasser	16,550 µl
Forward-Primer 100pmol/µl	0,125 µl
Reverse-Primer 100pmol/µl	0,125 µl
dNTP-Mix 25mM je Base	0,100 µl
5x GoTaq® Reaction Buffer	5,000 µl
DMSO	2,500 µl
GoTaq® Polymerase 5U/µl	0,100 µl
Master-Mix Volumen	24,00 µl
+ DNA 100ng/µl*	1,000 µl
Reaktionsvolumen	25,000 µl

*Da nur eine sehr limitierte Menge an extrahierter DNA vorhanden ist, wurde, um Material zu sparen, bei den PCRs universell 1µl extrahierte und aufgereinigte DNA eingesetzt, unabhängig von dessen Konzentration.

Thermocycler-Programm für Gradienten-PCR:

Programm:	Step 1	Step 2	Step 3*	Step 4	Step 6	Step 7
	96 °C	96 °C	°C*	72 °C	72 °C	8 °C
	5 Minuten	10 Sekunden +2 °C/sec R. Temp	10 Sekunden 55 °C – 68 °C	15 Sekunden +2 °C/sec R. Temp	5 Minuten	∞
	35x Cycles					

*Step 3 wurde im Bereich von 55°C bis 68°C in 8 Varianten durchgeführt. Daraus ergeben sich folgende Temperaturen für Step 3: 55 °C, 55.9 °C, 57.6 °C, 60.1 °C, 63.1 °C, 65.5 °C, 67.2 °C, 68 °C.

3.6 Sanger-Sequenzierung

Zur Analyse einzelner Genabschnitte der aufgereinigten DNA-Proben der Familie OPH48 auf vorhandene Varianten in der Basenabfolge, wurden Sanger-Sequenzierungen durchgeführt. Vor der Sequenzierung erfolgt eine PCR-Amplifikation mit anschließender Aufreinigung der PCR-Produkte mittels ExoSAP-IT®.

3.6.1 PCR vor Sanger-Sequenzierung

Vor der Sanger-Sequenzierung ist eine PCR notwendig, um die spezifische DNA-Region, die untersucht werden soll, zu amplifizieren. Die PCR erhöht die Menge der Ziel-DNA, welche für die Sequenzierung erforderlich ist, da nur kleine Mengen der Ausgangs-DNA vorhanden sind. Des Weiteren stellt die PCR sicher, dass nur die gewünschte Region der DNA sequenziert wird, indem spezifische Primer verwendet werden. Die Amplifikation vor der Sequenzierung verbessert die Signalstärke und -klarheit während der Sequenzierung. Folgend die Anleitung für die PCR-Amplifikation des gewünschten 939bp großen Produktes mit den für den mutationsumfassenden Abschnitt des 15ten Exons des *RPGR*-Gens.

Primer für PRGR Exon 15:

- Forward-Primer (AAGTGGAGGGAGAACGTGAA)
- Reverse-Primer (CTTCTTCGCCTGTCTCCTGA)

Tabelle 6: Reaktionsansatz Mastermix PCR vor Sanger-Sequenzierung (25µl):

Nuclease freies Wasser	18,550 µl
Forward-Primer 100pmol/µl	0,125 µl
Reverse-Primer 100pmol/µl	0,125 µl
dNTP-Mix 25mM je Base	0,100 µl
5x GoTaq® Reaction Buffer	5,000 µl
GoTaq® Polymerase 5U/µl	0,100 µl
Master-Mix Volumen	24,00 µl
+ DNA 100ng/µl *	1,000 µl
Reaktionsvolumen	25,000 µl

*Da nur eine sehr limitierte Menge an extrahierter DNA vorhanden ist, wurde, um Material zu sparen, bei den PCRs universell 1µl extrahierte und aufgereinigte DNA eingesetzt, unabhängig von dessen Konzentration.

Bei Proben die schlechte Sanger-Sequenzierungsergebnisse lieferten (OPH48-8), wurde ein alternativer Reaktionsansatz (Tabelle 7) für den Mastermix der PCR vor der Sanger-Sequenzierung gewählt. Es wurden 2,0 µl aufgereinigte DNA für die PCR eingesetzt und anschließend sequenziert.

Tabelle 7: Alternativer Reaktionsansatz Mastermix PCR vor Sanger-Sequenzierung bei schlechter Probenqualität (25µl):

Nuclease freies Wasser **	17,550 µl
Forward-Primer 100pmol/µl	0,125 µl
Reverse-Primer 100pmol/µl	0,125 µl
dNTP-Mix 25mM je Base	0,100 µl
5x GoTaq Reaction Buffer	5,000 µl
Go Taq Polymerase 5U/µl	0,100 µl
Master-Mix Volumen	24,00 µl
+ DNA 100ng/µl * **	2,000µl
Reaktionsvolumen	25,000 µl

*Da nur eine sehr limitierte Menge an extrahierter DNA vorhanden ist, wurde, um Material zu sparen, bei den PCRs universell 1µl extrahierte und aufgereinigte DNA eingesetzt, unabhängig von dessen Konzentration.

**Unterschiedliche Menge an DNA wird mit jeweils passendem, Volumen Wasser ergänzt, um ein Endvolumen von 25µl für den Mastermix zu gewährleisten.

Thermocycler-Programm für PCR vor Sanger-Sequenzierung:

Pro-gramm:	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4	Step 6	Step 7
	96 °C	96 °C	63,1 °C	72 °C	72 °C	8 °C
	5 Minuten	10 Sekunden +2 °C/sec R. Temp	10 Sekunden	15 Sekunden +2 °C/sec R. Temp	5 Minuten	∞
	35x Cycles					

3.6.2 ExoSAP-IT-Aufreinigung der PCR-Produkte

Das Reagenz ExoSAP-IT™ wird für PCR-Produkte mit einer Größe von weniger als 100 bp bis zu einer Größe von 20 kb eingesetzt. Es werden dabei ungenutzte Primer und Nukleotide entfernt, ohne dass Verluste des PCR-Produktes entstehen.

Das ExoSAP-IT™-Reagenz wird direkt zu den Reaktionsprodukten nach der PCR dazugegeben. ExoSAP-IT™ PCR-Produkt Cleanup ist in allen gängigen PCR-Puffern aktiv, sodass kein Pufferaustausch erforderlich ist.

Nach der Behandlung wird das ExoSAP-IT™-Reagenz durch 15-minütiges Erhitzen auf 80 °C inaktiviert. Die behandelten PCR-Produkte sind danach bereit für die anschließenden Analysen und Anwendungen, welche es erfordern, dass die DNA frei von überschüssigen Primern und Nukleotiden ist.

PCR-Produkt-Aufreinigungsprotokoll lt. Thermo Fisher Scientific

Hinweis: Lagern Sie das ExoSAP-IT™ Reagenz bei -20 °C in einem Nofrost-Gefrierschrank.

1. Nehmen Sie das ExoSAP-IT™-Reagenz aus dem -20 °C-Gefrierschrank und kühlen Sie es während des gesamten Verfahrens auf Eis.
2. Mischen Sie 5 µL eines Post-PCR-Reaktionsprodukts mit 2 µL ExoSAPIT™-Reagenz für ein kombiniertes Reaktionsvolumen von 7 µL.
3. Wenn Sie ein PCR-Produktvolumen von mehr als 5 µL behandeln, erhöhen Sie einfach die Menge des ExoSAP-IT™-Reagenzes proportional.
4. Inkubieren Sie bei 37 °C für 15 Minuten, um die verbleibenden Primer und Nukleotide abzubauen.
5. Inkubieren Sie 15 Minuten lang bei 80 °C, um das ExoSAP-IT™-Reagenz zu inaktivieren.
6. Das PCR-Produkt ist nun bereit für die Verwendung von DNA-Sequenzierungen, SNP-Analysen oder anderen Primer-Extensions-Anwendungen. Behandelte PCR-Produkte können bei -20 °C gelagert werden, bis sie benötigt werden.

3.6.3 Sanger-Sequenzierung Reaktionsansatz

Folgend die Auflistung des Inhaltes des Reaktionsansatzes für die durchgeführten Sanger-Sequenzierungen, sowie pipettierte Volumina.

Tabelle 8: Reaktionsansatz Sanger-Sequenzierung*:

Primer 10pmol/µl (Primer mit 10mM Tris/HCL pH 8,8 verdünnt) **	1,0 µl
Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	1,0 µl
5x Sequenzierpuffer Big Dye™ Terminator v1.1	2,0 µl
Millipore H ₂ O	5,0 µl
Aufgereinigtes PCR-Produkt	1,0 µl
Gesamtvolumen der Sequenzierreaktion	10µl

*Je ein separater Ansatz mit Forward-Primer bzw. Reverse-Primer!

**Aufgrund der großen Produktgröße von 939 Basenpaaren (bp) des durch die Primer vorgegebenen Amplifikationsproduktes und der Limitierung der Sanger-Sequenzierung auf eine maximale Größe von etwa 700 Basen, wurden nach einer Test San-

ger-Sequenzierung (4.4.1.1) mit einem Forward- und Reverse-Sequenzierungsansatz die Proben von OPH48 ausschließlich mit einem Forward-Ansatz sequenziert. Dies geschah, da die Mutationsregion beim Ansatz mit dem Forward-Primer innerhalb der durch diese Methode vorgegebenen Limitationen lag und der Ansatz mit dem Reverse-Primer auf Grund der Produktgröße keine validen verwertbaren Ergebnisse lieferte.

Thermocycler-Programm der Sanger-Sequenzierung:

Programm:	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
	96 °C	50 °C	60 °C	8 °C
	20 Sekunden	20 Sekunden	4 Minuten	∞
35x Cycles				

3.6.4 Aufreinigung des Sequenzierproduktes mittels Sephadex

Die Aufreinigung des Sequenzierproduktes erfolgt mittels Montage SEQ96 Sequencing Reaction Cleanup Kit von der Firma Millipore.

Aufreinigung mit Sephadex G50 Superfine

Sephadex G50 ist ein perlförmiges Gel, welches mit Nuclease-freiem Wasser überschichtet, wird. (Vor der Verwendung gut mischen!)

Zentristepsälchen (8-stripe) werden in leere MicroAmp Optical 8-tube Strips (0,2 ml), welche in einer Halterung fixiert sind, gesteckt. Danach wird in jedes Säulchen 395µl Sephadex pipettiert. Es erfolgt der erste Zentrifugationsschritt bei 750 g für 1 min. Das überschüssige Wasser in den MicroAmp-tubes wird danach ausgeleert.

Die Säulchen werden nochmals 1 min bei 750 g zentrifugiert und restliches Wasser in den MircoAmp-tubes, durch Ausleeren entfernt.

Die Säulchen mit dem Gel werden in neue MicroAmp Optical 8-tube Strips (0,2 ml) gesteckt und das Sequenzierprodukt 1:1(10 µl + 10 µl) mit Nuclease-freiem Wasser verdünnt und auf das Gel (pro Probe 1 Säulchen) getropft.

Es erfolgt abermals eine Zentrifugation bei 750 g für 2 min, das aufgereinigte Sequenzierprodukt befindet sich danach in den neuen MicroAmp tubes. Diese werden

in einer eigenen Halterung für das SeqStudio platziert und mit Gummi-Septa verschlossen und in den Sequenzer gestellt.

3.6.5 Auswertung der Sanger-Sequenzierung

Zur Auswertung der Sanger-Sequenzierung wurde die Software Chromas von Technology Pty Ltd verwendet. Chromas dient zur Analyse von .ab1-Dateien, die bei der DNA-Sequenzierung erstellt werden. Diese als DNA-Elektropherogramm-Dateien klassifizierten .ab1-Dateien enthalten sowohl Informationen über das DNA-Sequenz-Elektropherogramm, als auch einige Rohdaten und zusätzliche Informationen. Chromas ermöglicht die Visualisierung und Interpretation dieser Sequenzdaten, um Mutationen oder andere genetische Variationen zu identifizieren.

3.6.5.1 BLAST-like Alignment Tool (BLAT), Side by Side Alignment

Zu jedem Sanger-Sequenzierungs-Ergebnis wurde ein BLAT durchgeführt und ein Side by Side Alignment angeschlossen. Der BLAT (BLAST-like Alignment Tool) des UCSC Genome Browsers ermöglicht die Überprüfung der sequenzierten Region, indem sichergestellt wird, dass die amplifizierte Sequenz aus der erwarteten Region stammt. Zudem bestätigt es die korrekte Ausrichtung zum Referenzgenom. BLAT (BLAST-like Alignment Tool) ist darauf ausgelegt, Sequenzen mit 95 % oder höherer Ähnlichkeit und einer Länge von mindestens 25 Basen schnell zu finden. (10)

Das Side by Side Alignment ist eine visuelle Darstellung des Vergleichs zwischen der Sanger-Sequenz und der Referenzsequenz aus der UCSC Genome Browser Datenbank. Mittels Side by Side Alignment wurde überprüft, ob eine Sanger-Sequenz eine exakte Übereinstimmung mit der Referenzsequenz in dem untersuchten Bereich hat. Das Alignment hilft somit, die genaue Position und Übereinstimmung einer Sequenz im Kontext des Referenzgenoms zu überprüfen und zu bestätigen

3.7 Whole-Exome-Sequencing (WES)

3.7.1 Methodische Überlegungen und Herausforderungen

In dieser Studie wurden DNA-Proben aus Pakistan analysiert, um die genetischen Ursachen einer seltenen Erbkrankheit zu identifizieren. Die Erfahrung hat gezeigt, dass Proben aus dieser Region aufgrund langer Transportwege und suboptimaler Kühlbedingungen häufig eine beeinträchtigte Qualität aufweisen. Dies führte dazu, dass trotz vorheriger Qualitätskontrollmaßnahmen wie Test-PCRs und Sanger-Sequenzierungen eine Vielzahl der Proben in der Vergangenheit nicht erfolgreich sequenziert werden konnte. Es wird vermutet, dass die Degradation der DNA bereits während der Library-Präparation zu einem Ausfall der Proben führt.

Aufgrund der derzeit noch hohen Kosten eines Whole-Exome-Sequencing (WES) und des verbundenen Ausfallrisikos bei Proben mit beeinträchtigter Qualität, war es nicht möglich, alle verfügbaren DNA-Proben der Familie OPH48 mittels WES zu untersuchen. Daher wurde eine gezielte Auswahl einer Probe getroffen, basierend auf dem Stammbaum und dem Vorhandensein phänotypischer Merkmale der Erkrankung, sowie den Ergebnissen des Quality-PCR-Checks. Infolgedessen wurde die Probe OPH48-2, welche die phänotypischen Ausprägungen lt. Stammbaum zeigte, zur Durchführung des WES an das Institut für Humangenetik der Medizinischen Universität Graz geschickt.

3.7.2 Auswertung des Whole-Exome-Sequencing (WES)

Zur Auswertung der Whole-Exome-Sequencing (WES)-Daten der Probe OPH48-2 wurde zunächst die erhaltene BAM-Datei mithilfe von DRAGEN (Dynamic Read Analysis for GENomics) von Illumina verarbeitet, um daraus eine VCF-Datei zu generieren. Diese VCF-Dateien wurden anschließend mit Franklin by Genoox und Excel gefiltert und analysiert.

3.7.2.1 Integrative Genomics Viewer (IGV)

Weiters wurde der Datensatz des Bam-Files zur Überprüfung der Reads des Next-Generation Sequencing (NGS) mit dem kostenlos verfügbaren Integrative Genomics Viewer (IGV) überprüft. IGV dient zur Visualisierung und Analyse von NGS-Daten

und ermöglicht es, große Mengen von Sequenzierungsdaten effizient zu überprüfen. Diese Software unterstützt die Darstellung von Alignments und Varianten und hilft bei der Identifizierung und Charakterisierung von genetischen Variationen. (11)

3.7.2.2 Franklin by Genoox

Für die Variantenfilterung wurde Franklin by Genoox, eine cloudbasierte Plattform zur Analyse und Interpretation genomischer Daten, verwendet. Franklin bietet Werkzeuge zur Annotation und Filterung von Varianten, ermöglicht die klinische Interpretation und unterstützt die Identifikation potenziell relevanter genetischer Varianten.

Folgende allgemeine Filterkriterien wurden gesetzt:

Aggregated Frequency:

- N/A
- Very Rare
- Rare

Confidence:

- Low
- Medium
- High

Da es kaum Angaben zum Phänotyp, der Familie OPH48 gibt, wurden noch weitere Filter bzgl. Augenerkrankungen in Betracht gezogen. Mittels einer Genliste der „PanelApp“ (panelapp.genomicsengland.co.uk) wurden aus einem Genpanel zu allgemeinen „Retinal disorders“ Filterkategorien in Franklin eingebracht. Die Genliste des Panels umfasste 421 Gene, welche mit allgemeinen Augenkrankheiten assoziiert werden.

3.7.2.3 Excel (Microsoft)

Excel wurde ergänzend zur manuellen Filterung und Analyse der Daten aus Franklin by Genoox verwendet. Es bietet flexible Möglichkeiten zur Datenvisualisierung und ermöglicht benutzerdefinierte Filter, Sortierungen und Pivot-Tabellen, um spezifische genetische Varianten hervorzuheben und detailliert zu untersuchen.

3.8 Segregationsanalyse

Nach Abschluss der Variantensuche und den Abgleich der mutmaßlichen Mutation mit den Proben der Familie OPH48, wurden die Ergebnisse dem Stammbaum der Familie gegenübergestellt (4.6 Aktualisierter Stammbaum).

Die Segregationsanalyse wird typischerweise nach der Identifizierung einer potenziell pathogenen genetischen Variante durchgeführt, um deren Kausalität für das beobachtete Merkmal oder die Krankheit zu unterstützen oder zu widerlegen. Durch den Vergleich der theoretischen Vererbungsmuster mit den tatsächlichen Beobachtungen in der Familie liefert die Segregationsanalyse wertvolle Erkenntnisse und lässt Rückschlüsse über die genetische Vererbung einer Mutation zu. (6)

3.9 Geräte

Tabelle 9: Auflistung aller verwendeten Geräte

Name	Hersteller	Zusatzinformationen
Biofuge pico	Heraeus Instruments	Zentrifuge
Hera safe	Heraeus Instruments	Werkbank
Diverse Kolbenhubpipetten	Eppendorf	
C1000 Touch™ Thermal Cycler	BIO-RAD	Thermocycler
Sub-cell GT WIDE MINI	BIO-RAD	Elektrophoresekammer
PowerPac Basic™	BIO-RAD	
SeqStudio™ Genetic Analyzer	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific	
Cobi-Spin FVL-2400N	Biosan	Zentrifuge
Mini Spin	Eppendorf	Zentrifuge
Medikamenten- Gefrierschrank	Gram	
Medikamenten- Kühlschranks	Gram	
Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments	Zentrifuge
AutoChemi™ System	UVP BioImaging Systems	Fluoreszenzkammer
Digital Graphic Printer	Sony	Bildrunder für Gelelektrophorese
REAX top	Heidolph	Vortexer
Ice Flaker	Breema Ice Makers	Flockeneismaschine
NanoQuant infinite M200	Tecan	Spektralphotometer

3.10 Verbrauchsutensilien

Tabelle 10: Auflistung aller verwendeten Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller	Zusatzinformationen
PCR SingleCap 8er-SoftStrips 0.2ml, farblos	Biozym	LOT: 22324 Art-Nr.: 710980
DNA LoBind Tube 1.5 ml	Eppendorf	LOT: K200149P Cat. no.: 022431021
MicroAmp® Optical 8-Tube Strip (0.2ml)	Applied Biosystems by Life Technologies	Ref: 4316567
SeqStudio™ Reservoir Septa	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific	LOT: 9024201 Ref: A35640
SeqStudio™ Reservoir Septa 8-Strip	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific	LOT: 1218301 Ref: A35643

3.11 Reagenzien

Tabelle 11: Auflistung aller Reagenzien

Name	Hersteller	Zusatzinformationen
5x Colorless GoTaq® Reaction Buffer	Promega	LOT: 0000505205 Ref: M792A
GoTaq™ G2 DNA Polymerase	Promega	LOT: 0000508363 Ref: M784B
100bp DNA-Ladder	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific	LOT: 01290467 Ref: 15628019
GelRed® Nucleic Acid Stain 10,000X in Water	Biotium	LOT: 22G1006
Primer: <i>RPGR</i> -Exon15-reverse	Merck – Sigma Aldrich	Custom Order
Primer: <i>RPGR</i> -Exon15-reverse	Merck – Sigma Aldrich	Custom Order
Exo SAP-IT™	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific	LOT: 01303943 LOT 2783825 Ref: 78200.200.UL
Big Dye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing PR-100	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific	LOT: 01141569 Ref: 4336768
5xSequenzierpuffer Big Dye™ Terminator v1.1	Applied Biosystems by Life Technologies	LOT: 1601275 Ref: 4336697
Sephadex™ G-50 Superfine	Cytiva	LOT: 10308631
SeqStudio™ Genetic Analyzer Cathode Buffer Container	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific	LOT: 2304109
SeqStudio™ Genetic Analyzer Cartridge v2	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific	Ref: A41328

3.11.1 Herstellung benötigter Lösungen

3.11.1.1 Stammlösungen

Folgende Stammlösungen wurden für die Analysen angesetzt:

- **1 M Tris-HCl pH 8,8:** 12,11 g Tris wurden in 80 ml deionisiertem Wasser (Fresenius) gelöst, mit HCl auf pH 8,8 eingestellt und mit deionisiertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde autoklaviert.
- **1,5 M Tris-HCl pH 8,8:** 18,17 g Tris wurden in 80 ml deionisiertem Wasser (Fresenius) gelöst, mit HCl auf pH 8,8 eingestellt und mit deionisiertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde autoklaviert.
- **3,5 M KCl:** 13,05 g KCl wurden in 30 ml deionisiertem Wasser (Fresenius) gelöst und mit deionisiertem Wasser auf 50 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde autoklaviert.
- **3 M MgCl₂·6H₂O:** 30,5 g MgCl₂·6H₂O wurden in 30 ml deionisiertem Wasser (Fresenius) gelöst und mit deionisiertem Wasser auf 50 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde autoklaviert.
- **0,5 M EDTA pH 8,0:** 18,61 g EDTA wurden in 70 ml deionisiertem Wasser (Fresenius) gelöst, mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt und mit deionisiertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde autoklaviert.
- **10x TBE:** 27,00 g Tris, 13,75 g Borsäure und 1,875 g EDTA wurden in 200 ml deionisiertem Wasser (Fresenius) gelöst und mit deionisiertem Wasser auf 250 ml aufgefüllt.
- **Gel Red Nucleic Acid Stain** (Fa. Biotium) Cat No: 41003: 10.000x konzentrierte Stammlösung wurde in Wasser (0,5 ml) gelöst.

3.11.1.2 Arbeitslösungen

Aus den Stammlösungen wurden folgende Arbeitslösungen hergestellt:

- **10 mg/ml Proteinase K:** 100 mg Proteinase K wurden in 8 ml deionisiertem Wasser (Fresenius) gelöst und mit deionisiertem Wasser auf 10 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde in 1,4 ml Aliquots aufgeteilt und bei -20 °C gelagert.
- **10 % SDS:** 5 g SDS (unter Verwendung eines Mundschutzes) wurden in 40 ml deionisiertem Wasser (Fresenius) gelöst und mit deionisiertem Wasser auf 50 ml aufgefüllt.
- **TKM 1:** 6,67 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 2,86 ml 3,5 M KCl (10 mM), 3,33 ml 3 M MgCl₂·6H₂O (10 mM), 4,00 ml 0,5 M EDTA (2 mM), 10,00 g Triton X-100 (1 %) und 973,14 g deionisiertes Wasser (Fresenius) wurden gemischt. Die Lösung wurde mittels Magnetrührstab und Magnetrührer homogenisiert.
- **TKM 2:** 5,85 g NaCl (0,4 M), 3,335 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 (10 mM), 1,43 ml 3,5 M KCl (10 mM), 1,665 ml 3 MgCl₂·6H₂O (10 mM), 2,00 ml 0,5 M EDTA (2 mM) und 485,72 g deionisiertes Wasser (Fresenius) wurden gemischt. Die Lösung wurde mittels Magnetrührstab und Magnetrührer homogenisiert.
- **10 mM TE-Puffer pH 8,8:** 1,00 ml 1 M Tris-HCl pH 8,8, 0,20 ml 0,5 M EDTA und 98,80 ml deionisiertes Wasser (Fresenius) wurden gemischt.
- **1x TBE:** 100 ml 10x TBE wurden mit deionisiertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt und durch Schwenken homogenisiert.
- **1,5 % Agarosegel in 1x TBE:** 1,5 g Agarose wurden in 100 ml 1x TBE gelöst und mindestens 3 x kurz aufgekocht. Die Flüssigkeit wird auf ca. 56 °C abgekühlt.
- **Gel Red / Agarosegel** 5 µl GelRed (Biotium) (10.000fach verdünnte Stammlösung) / 50 ml 1,5 % Agarosegel.
- **TBE-Ladepuffer:** 2 ml 10x TBE, 18 ml deionisiertes Wasser (Fresenius), 20 ml Glycerin (wasserfrei) und eine Spatelspitze Bromphenolblau wurden gemischt. Bromphenolblau durch Schwenken auflösen. Bei Bedarf aliquotieren, restliche Lösung bei 4 °C lagern.
- **100 bp Ladder** 50µg 100bp Ladder von Invitrogen (Produkt Nr: 15628019) wurden mit 800µl dest. H₂O (Fresenius) und 100µl 10x Blue Juice Gel loading Buffer gemischt.

3.12 Programme

Tabelle 12: Auflistung aller verwendeten Programme, Datenbanken und Web-Tools

Name	Verwendung/Link
CeGaT by CeGaT GmbH	Stammbaumerstellung
DRAGEN by Illumina	Whole-Exome-Sequencing
Integrative Genomics Viewer	Bam-Files
Microsoft Excel	Variantenfilterung
SeqStudio™ Plate Manager Version 1.2.0-FC6 - Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific	Sanger-Sequenzierung
Chromas by Technelysium	Sanger-Sequenzierung
PubMed	Literaturrecherche https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/
Primer3web Version 4.1.0	Primerdesign https://primer3.ut.ee/
Bioinformatics.org – Reverse Complement	Primerdesign https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html
UCSC (Genome Browser, In Silco PCR, GTEEx)	Recherche https://genome.ucsc.edu/
ClinVar	Recherche https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/
dbSNP	Recherche https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/
HGMD	Recherche https://www.hgmd.cf.ac.uk/
Varsome	Recherche https://varsome.com/
Franklin by genoox	Variantenfilterung https://franklin.genoox.com/clinical-db/home
PanelApp	Variantenfilterung https://panelapp.genomicsengland.co.uk
Ensemble	Recherche https://www.ensembl.org/index.html

Alle Grafiken des UCSC-Genome-Browsers, sowie der BLAT-Search Results, das Side by Side Alignment und jegliche weitere Referenzierung auf genomische Positionen beziehen sich, sofern nicht anders vermerkt, auf GRCh38 (Hg38).

4 Ergebnisse

4.1 Stammbaum

Ein wichtiger erster Schritt dieser Arbeit war die Digitalisierung des handgezeichneten Stammbaumes der Familie OPH48 aus Pakistan mithilfe der Software „CeGaT“ der Firma CeGaT GmbH. Der aus Pakistan erhaltene Stammbaum enthielt ebenfalls Informationen zu dem vermutlichen Phänotyp „Progressive Retinal Degeneration“.

Das Ziel dieser Digitalisierung war es, eine übersichtliche Darstellung der familiären Beziehungen abbilden zu können und mögliche Muster bzgl. der phänotypischen Ausprägungen der Augenerkrankungen sowie der Vererbung erkennen zu können.

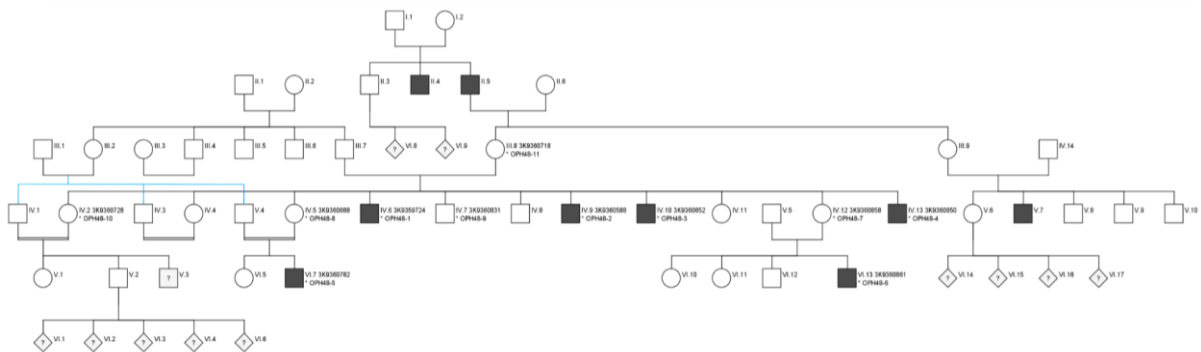


Abbildung 13: Stammbaum Familie OPH48 nach handschriftlicher Vorlage. (erstellt mit CeGaT)

Abbildung 13 zeigt den digitalisierten Stammbaum der Familie OPH48. Der digitalisierte Stammbaum zeigt folgende Informationen:

- Familienstruktur: Schwarze und blaue Linien kennzeichnen das Verwandtschaftsverhältnis, doppelte schwarze Linien kennzeichnen konsanguine Verwandtschaftsverhältnisse.
- Vorhandene Blutproben für die Analysen: Gekennzeichnet durch Probenlaufnummer OPH-48 1-11.
- Phänotyp: Betroffen (schwarz), nicht betroffen (weiß), unbekannter Phänotyp (grau mit Fragezeichen).
- Geschlecht: Kreis (weiblich), Viereck (männlich), Raute (Unbekanntes Geschlecht).

4.1.1 Interpretation des digitalisierten Stammbaumes

Durch die übersichtliche Darstellung zeigte sich, dass in diesem Stammbaum nur männliche Familienmitglieder phänotypisch auffällig sind. Diese Tatsache führt zur Hypothese, dass es sich hierbei um eine X-Chromosomale rezessive Vererbungsform handeln könnte.

Alle betroffenen Personen könnten theoretisch durch diese Vererbungsform schlüssig erklärt werden. Die weiblichen Probandinnen I.2, III.8, III.9, IV.5, IV.12 wären demnach Konduktorinnen. Sie müssten lt. dieser Hypothese ein mutiertes und ein normales Allel jenes Gens, welches für die phänotypische Ausprägung der betroffenen Personen verantwortlichen ist, auf dem X-Chromosom haben. Weiters wären sie durch die rezessive Art der Mutation phänotypisch unauffällig. Auch die Verteilung der Segregation der Mutation auf die Nachkommen über die Generationen in diesem Stammbaum scheint mit dieser Hypothese nachvollziehbar, da Konduktorinnen das mutierte Allel durchschnittlich an ca. 50 % der Nachkommen weitergeben könnten.

Ein männliches phänotypisch betroffenes Familienmitglied mit einem männlichen Nachkommen müsste bei der X-Chromosomalen rezessiven Vererbung theoretisch phänotypisch unauffällig sein, sofern die Mutter des Sohnes 2 gesunde Allele des für die phänotypische Ausprägung verantwortlichen Gens besitzt und somit keine Konduktorin ist. Leider ist diese Konstellation in dem vorliegenden Stammbaum nicht vorhanden.

Eine mitochondriale Vererbung ist unwahrscheinlich, da in diesem Fall auch weibliche Nachkommen phänotypische Auffälligkeiten zeigen sollten. Die X-Chromosomale dominante Vererbung ist ebenfalls unwahrscheinlich, da sonst auch weibliche Nachkommen phänotypische Auffälligkeiten zeigen sollten. Auch eine autosomal rezessive Vererbung ist unwahrscheinlich, da in diesem Szenario weibliche und männliche Nachkommen in einem ähnlichen Geschlechterverhältnis phänotypische Auffälligkeiten zeigen sollten. Genauso unwahrscheinlich ist auch eine autosomal dominante Vererbung, da in diesem Fall merkmalsfreie Nachkommen, ihrerseits keine weiteren phänotypisch auffälligen Nachkommen haben könnten, ohne dass dessen Partner bzw. Partnerin dieselben in der Familie vorhandenen phänotypische Auffälligkeiten hat, um diese vererben zu können. Beispiele dafür sind Familienmitglied III.7, sowie IV.14.

Aufgrund dieser Schlussfolgerungen wird bei den weiteren Analyseschritten primär von einer möglichen rezessiven X-Chromosomalen Vererbung des Phänotyps in der Familie OPH48 ausgegangen.

4.2 Ergebnisse der Quality-Check-PCR

Aufgrund der langen Transportwege und teilweise unzureichender Kühlung des EDTA-Vollblutes der Proben der Familie OPH48, wurde zu Testzwecken mit allen Proben (nach der Probenaufreinigung und DNA-Extraktion) eine PCR durchgeführt. Ziel dieser PCR war es, zu überprüfen, ob die isolierten DNA-Proben trotz problematischer Transport- & Lagerungsbedingungen für kostspieligere molekularbiologische Untersuchungen wie ein Whole-Exome-Sequencing (WES) geeignet sind.

Zu diesem Zweck wurde der Genabschnitt LAMA2-Exon30 von den extrahierten genomischen DNA-Proben der Familie OPH48 amplifiziert. Größe des erwarteten Amplifikationsprodukts: 338 bp.

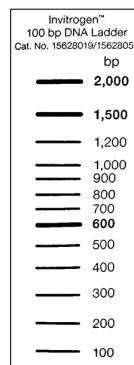


Abbildung 14: 100 bp DNA Ladder von invitrogen by Thermo Fisher Scientific (0,5µg/µl) (For Research Use Only)

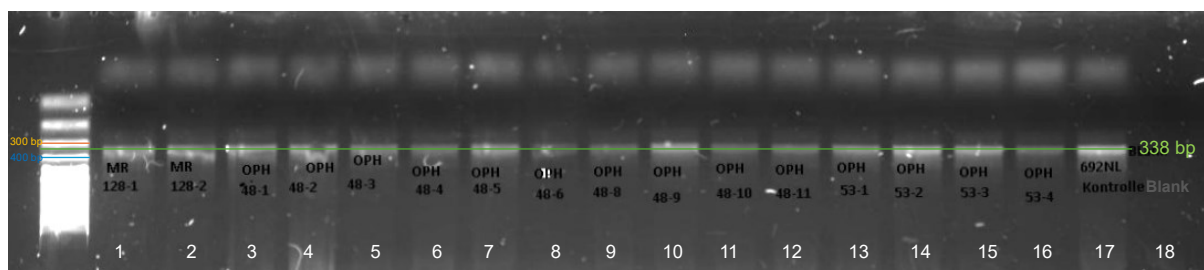


Abbildung 15: Bildbeschreibung: Ergebnisse der Quality-Check-PCR aller OPH48-Proben auf 1,5 % Agarosegel. Verwendete Ladder: 100 bp DNA Ladder von invitrogen by Thermo Fisher Scientific (Abbildung Vertikal gespiegelt (original-Bild))

Die Ergebnisse der Gelelektrophorese zur Qualitätsüberprüfung der DNA mittels PCR zeigen, wie in Abbildung 15 ersichtlich, bei allen Proben von OPH48 (Positionen 3 bis 12) eine deutliche Bande in der erwarteten Höhe von 338 bp. Auch die Positivkontrolle mit der laborinternen Test-DNA 692NL weist das erwartete Amplifikationsprodukt in Form einer Bande in der entsprechenden Höhe auf. Die Negativkontrolle beziehungsweise der Blank zeigt keine Bande, wodurch die Kontaminationsfreiheit des Mastermixes bestätigt wird. Aufgrund dieser Ergebnisse haben alle Proben den Qualitätscheck in Bezug auf die Eignung für molekularbiologische Analysen bestanden und können weitergehend mit Sanger-Sequenzierung oder Whole-Exome-Sequencing (WES) untersucht werden.

4.3 Whole-Exome-Sequencing (WGS) Ergebnisse

Das WGS der Probe OPH48-2 wurde am Diagnostik- & Forschungsinstitut für Humangenetik der Medizinischen Universität Graz durchgeführt. Das erhaltene BAM-File wurde mittels DRAGEN (Illumina) verarbeitet, um verschiedene VCF-Dateien zu generieren.

Laut Stammbaum ist die der Patient hinter der Probe OPH48-2 phänotypisch von der Augenkrankheit betroffen.

4.3.1 Variantenfilterung via Franklin Genoox

Der VCF-Datensatz des WES der Probe OPH48-2 wurde für die Variantenfilterung und Variantenklassifikation auf die Website „Franklin Genoox“ geladen und analysiert. Filterungen und Filterkriterien wurden aufgrund der fehlenden phänotypischen Krankheitsbeschreibung mit unterschiedlichen Filtern durchgeführt.

Die Filterung mit dem auf dem Stammbaum vermerkten Phänotyp „Progressive Retinal Degeneration“ blieb ergebnislos, da keine Variante im Datensatz mit diesem assoziiert werden konnte. Weiters wird angemerkt, dass der Zusatz „progressive“ von Retinal degeneration derzeit nicht als HPO-Term vorhanden ist. Aus diesem Grund wurde der Filter für den Phänotyp „Progressive Retinal Degeneration“ wieder entfernt und Filter für spezifische Phänotypen von weitere Augenerkrankungen gewählt.

Folgende HPO-Terms wurden als Filter angewendet:

4.3.1.1 Retinal degeneration (HP:0000546)

Mit diesem HPO-Term konnte die Auswahl auf 287 Varianten eingegrenzt werden. Durch die Analyse des Stammbaumes wurde eine X-Chromosomale rezessive Vererbungsform der Erkrankung innerhalb der Familie OPH48 vermutet, daher wurde eine weitere Filterung spezifisch für Varianten, welche das X-Chromosom betreffen, gesetzt. Dadurch konnte die Auswahl auf 2 relevante Varianten eingegrenzt werden.

1. *RPGR*: Indel auf ChrX, Position 38286563-38286579, Referenz: CCCTCCCTCCTCTTTTT, Alternativ: C, Hom, Exon 15, Frameshift-Mutation, p.Glu807Glyfs*3, c.2420_2435del, Exonic.
2. *RP2*: SNP auf ChrX, Position 46880597, Referenz: G, Alternativ: A, Hom, Exon 5, UTR 3', rs4239962, c.*828G>A.

Die beiden vielversprechendsten Varianten sind ein Indel, welcher zu einem Frameshift im 15ten Exon des *RPGR*-Gens führt, sowie SNP im *RP2* Gen.

Es wurde eine weitere neue Filterung mit einem aus der PanelApp eingefügten Genpanels als Filterkriterium durchgeführt, welches die möglichen Kandidatenvarianten auf 199 Varianten reduzierte. Eine weitere Filterung auf das X-Chromosom grenzte die Auswahl auf 14 Varianten ein.

Auch hier wurde die gleiche wie zuvor beschriebene Frameshift-Mutation des 15ten Exons des *RPGR*-Gens identifiziert. Weiters zeigte Franklin Genoox für diese genetische Variante eine „Confidence High-Rate“ mit AB (Allel-Balance):100 %. Das bedeutet, dass die Sicherheit, mit der diese Variante erkannt und klassifiziert wurde, sehr hoch ist und in weiterer Folge die zugrundeliegenden Daten und Algorithmen stark darauf hinweisen, dass die Interpretation der Variante korrekt und zuverlässig ist. Zusätzlich sind auf der Franklin Genoox-Plattform bei der gefundenen *RPGR*-Variante die Abkürzungen XLR (X-Linked Recessive) und XL (X-Linked), welche für die Vererbungsmodelle der genetischen Varianten stehen, ersichtlich.

XLR weist darauf hin, dass die genetische Variante auf dem X-Chromosom lokalisiert ist und eine rezessive Vererbung aufweist, was mit der derzeitigen Vererbungstheorie lt. Stammbaumauswertung (Abbildung 13) übereinstimmt.

Trotz des Verdachts auf eine X-Chromosomale rezessive Vererbung wurde das Filterkriterium für X-Chromosomale Mutationen entfernt, um eine nicht zu spezifische und breit gefächerte Variantenfilterung zu ermöglichen.

Folgend aufgelistet sind alle Phänotypen, welche spezifischen Augenkrankheiten entsprechen, aufgelistet. Die Suchbegriffe, welche in Franklin Genoox als Filterkriterium angewendet wurden, sind in blau dargestellt, zusätzlich ist das HPO-pendant daneben angeführt:

1. [Ophthalmic artery anomaly](#) / Abnormality of ophthalmic artery (HP:0410006)
Mit diesem Phänotyp als Filterkriterium wird die Frame-Shift-Variante des *RPGR*-Gens mit XLR/XL Erbgang erneut als vielversprechendste als erstes angezeigt. Auf Platz 2 liegt eine heterozygote Variante im *FOXC1*-Gen, die autosomal dominant vererbt wird, sowie auf Platz 3 eine heterozygote Variante im *IL17RD*-Gen, welche autosomal rezessiv oder dominant vererbt wird.
2. [Ophthalmic artery occlusion](#)/ Ophthalmic artery occlusion (HP:0020164)
Auch beim zweiten Filterversuch mit „ophthalmic artery occlusion“ als phänotypisches Filterkriterium wird das *RPGR*-Gen *RPGR* c.2420_2435del (p.Glu807Glyfs*3) mit XLR/XL Erbgang erneut als erstgereichte Variante angezeigt, gefolgt von einer *HK1*-Variante in einer Splice Region auf Platz 2, welche einen autosomal rezessiven (AR) oder einen autosomal dominanten (AD) Erbgang aufweist und somit weniger wahrscheinlich ursächlich für den Phänotyp der Familie OPH48 ist.
3. [Ophthalmoplegia externa](#) / External ophthalmoplegia (HP:0000544)
Bei diesem Phänotyp wird eine Variante mit unklarer Signifikanz des Gens *SYNE1* an erster Stelle gereiht. Bei dieser Variante handelt es sich um eine Deletion, welche ebenfalls einen AR oder AD Erbgang aufweist.
Da aufgrund des Stammbaums von einer X-chromosomal rezessiven Vererbung ausgegangen wird, liegt der Fokus bei diesem Phänotyp auf der Genvariante, welche von Franklin by genoox auf Platz zwei gerankt wurde. Hier findet sich erneut die Frameshift Mutation des Gens *RPGR* c.2420_2435del (p.Glu807Glyfs*3).

4. [Ophthalmoparesis](#) / Ophthalmoparesis (HP:0000597)
Wie beim Phänotyp external ophthalmoplegia (HP:0000544) ist auch bei diesem das Ergebnis der Variantenfilterung in den ersten Rängen ident, mit der Deletions-Genvariante des Gens *SYNE1* auf Platz 1 und der möglicherweise ursächlichen Mutationen und der Frameshift Genvariante des Gens *PRGR* mit X-chromosomalen Erbgang auf Platz 2.
5. [Ophthalmoplegia](#) / Ophthalmoplegia (HP:0000602)
Bei diesem Phänotyp wird die Variante *RPGR* c.2420_2435del (p.Glu807Glyfs*3) wieder auf Platz 1 gelistet. Eine vernachlässigbare Variante im *FOXC1*-Gen ist auf Platz 2.
6. [Ophthalmoplegia – Congenital](#) / Congenital ophthalmoplegia (HP:0001491) und [Retinal disease](#) / Retinal disease (HP:0000479)
Mit diesen Phänotypen separat als Filterkriterium konnten keine Varianten im VCF-File der Probe OPH48-2 via Franklin by genoox assoziiert bzw. identifiziert werden.

4.3.2 *RPGR*-Genvariante NM_001034853.2(*RPGR*):c.2420_2435del (p.Glu807Glyfs*3)

Da die Variante: c.2420_2435del (p.Glu807Glyfs*3) über die meisten Phänotypen hinweg als vielversprechendste Genmutation gelistet wurde und zum derzeitiger vermuteten Vererbungsmuster lt. Stammbaum passt, wird diese im weiteren Verlauf dieser Arbeit vertieft analysiert.

Die Variante betrifft das Gen *RPGR* (Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator) und ist eine Indel-Mutation (Insertion/Deletion) des Transkripts NM_001034853.2. Die chromosomale Position dieser Mutation befindet sich auf dem Chromosom X (chrX) von der Startposition 38286563 bis zur Stopposition 38286579. Die Referenzsequenz lautet CCCTCCCTCCTCTTTTT, während die Alternativsequenz ein einzelnes C ist. Das Indel führt zu einer Deletion von 17 Basen und der Insertion eines Cytosins; was dem Verlust von 16 Basen entspricht, wie in Abbildung 16 zu sehen ist. Auf Aminosäureebene führt die Mutation zu einem Frameshift und damit voraussichtlich zu einer Änderung von p.Glu807Glyfs*3, was auf Nukleotidebene als c.2420_2435del beschrieben wird. Die Mutation befindet sich in Exon 15 und ist hemizygot bei Männern

(bzw. homozygot bei Frauen). Die Frameshift-Mutation tritt in einer exonischen Region auf. Die Variante mit der RS-Nummer rs2147197891 (dbSNP) ist in der ClinVar-Datenbank (ClinVar Variation ID: 1297120) bekannt und als „Likely Pathogenic“ (LP) eingestuft. Die Mutation wurde bereits in der Publikation "The Importance of Automation in Genetic Diagnosis: Lessons from Analyzing an Inherited Retinal Degeneration Cohort with the Mendelian Analysis Toolkit (MATK)" von Zampaglione et al. in den Supplementary Materials erwähnt. Die Studie befasst sich mit der Entwicklung und Evaluierung des Mendelian Analysis Toolkit (MATK), einer Software zur Automatisierung und Verbesserung der genetischen Diagnose von Mendel'schen Erkrankungen, speziell am Beispiel von erblichen Netzhautdegenerationen. (12)

In Tabelle 6 der Supplementary Materials des Papers von Zampaglione et al. (2022) wird in den Ergebnissen des Whole-Exome-Sequencing der Studie unter vielen anderen auch die Variante NM_001034853.1(*RPGR*):c.2420_2435del (p.Glu807fs) mit der Probenbezeichnung „OG1875“ beschrieben. Das betroffene Gen *RPGR*, sowie die Referenzsequenz (CCCTCCCTCCTCTTTT) und alternative Sequenz (C) stimmen mit der gefundenen Variante dieser Arbeit überein. Somit kommt es zum gleichen Frameshift c.2420_2435del und der daraus resultierenden Proteinänderung p.Glu807GlyfsTer3. Von besonderem Interesse ist, dass diese Variante in den Datensätzen des Papers bereits mit der Krankheit "Retinitis pigmentosa X-linked" assoziiert und ebenfalls als Likely Pathogenic (LP) gemäß den ACMG-Kriterien (American College of Medical Genetics and Genomics) PVS1 und PM2 eingestuft wurde. (12)

Da die Supplementary Materials keine detaillierten klinischen Informationen über den betroffenen Patienten liefern, ist daher unklar, welche spezifischen Symptome oder welchen Schweregrad der Erkrankung dieser Patient aufweist.

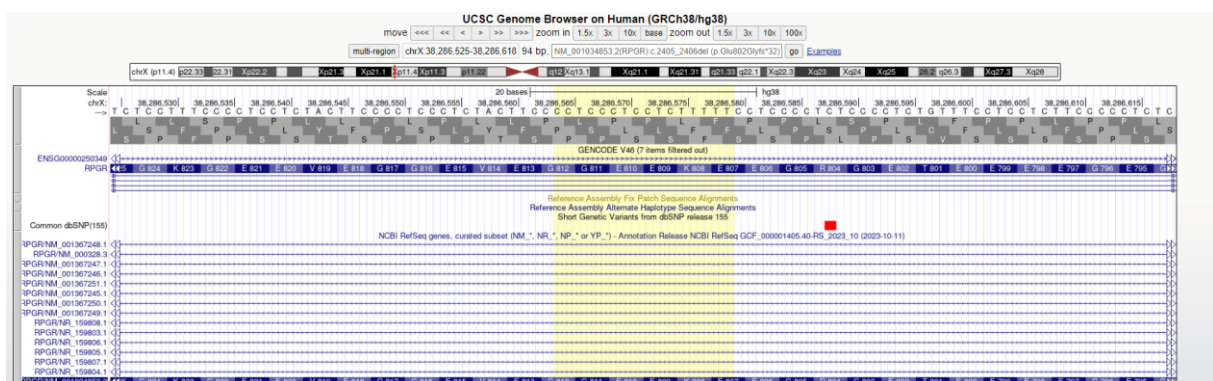


Abbildung 16: Darstellung der Mutation/Deletion (gelb) c.2420_2435del (p.Glu807Glyfs*3) des *RPGR*-Gens im UCSC Genome Browser (GRCh38/hg38)

4.3.2.1 IGV-Viewer OPH48-2 Genvariante RGPR (Indel)

Um die Ergebnisse der Variantenfilterung des VCF-Files der Probe OPH48-2 zu überprüfen, wurde die Stelle des Indel der *RPGR*-Variante im IGV-Viewer analysiert. Wie bereits erwähnt wird die originale Sequenz des Exon 15 des *RPGR*-Gens (Nukleotidsequenz: CCCTCCCTCCTCTTTT) bei dieser Mutation deletiert und stattdessen ein einzelnes Cytosin (C) mittels Insertion eingefügt. Dies müsste im Vergleich der Probe OPH48-2 zu einem Referenzdatensatz mittels IGV-Viewer visuell darstellbar sein und mittels nicht vorhandener Reads aufgrund der Deletion ersichtlich sein.

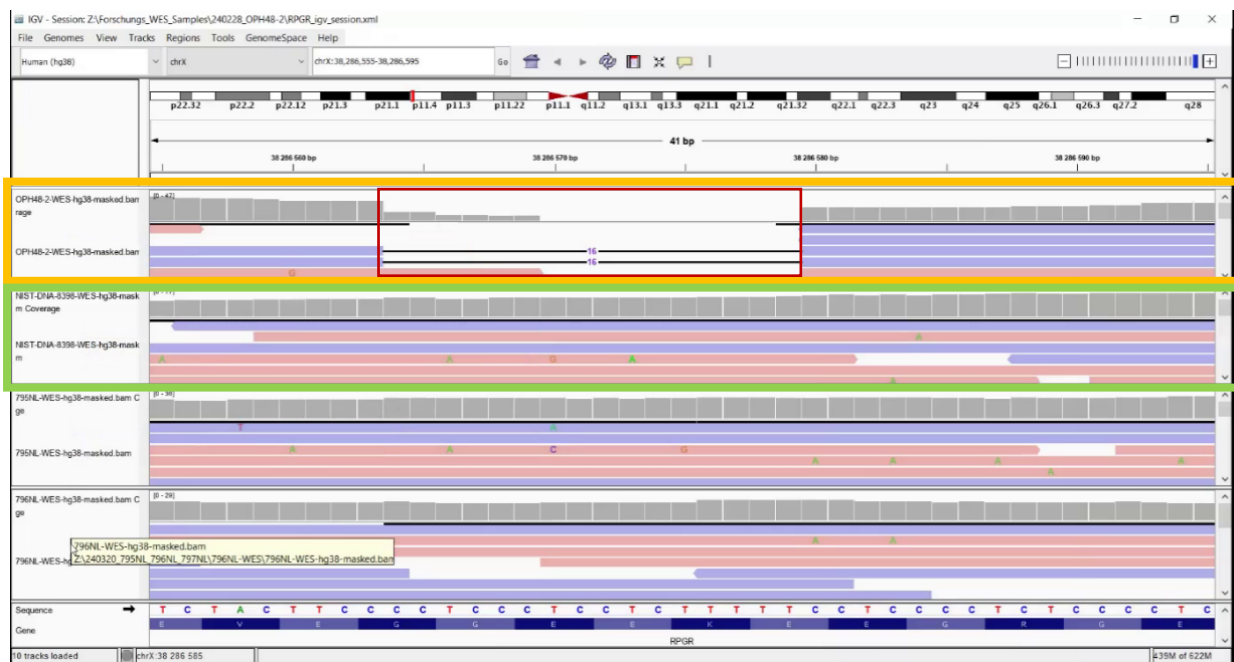


Abbildung 17: Ansicht der Reads um die Mutationsregion (rot) von c.2420_2435del des *RPGR*-Gens des Datensatzes des WES OPH48-2 (orange) sowie eines Kontrolldatensatzes (grün).

Wie in Abbildung 17 deutlich erkennbar ist, sind in der betroffenen Region keine Reads aligniert. Das stützt die These, dass es sich in den WES-Daten der Probe OPH48-2 um die bei der Filterung gefundene Indel/Frameshift-Variante des *RPGR*-Gens handelt.

4.3.3 Ergebnisse der Gradienten-PCR mit und ohne DMSO

Das Design der benötigten Primer für den Genabschnitt, in welchen die Variante im 15ten Exon des *RPGR*-Gens liegt, wurden bereits im Methodenteil 3.5 beschrieben. Die Gradienten PCR wurde durchgeführt, um die optimale Schmelztemperatur der Primer zu ermitteln. Aufgrund des erhöhten GC-Gehaltes der Primer-Paare wurde ein Reaktionsansatz mit sowie ohne Dimethylsulfoxid (DMSO) angesetzt.

Die PCR-Produkte wurden mit Ladepuffer vermischt und mit der 100bp DNA Leiter von Invitrogen auf ein 1,5 % Agarosegel aufgetragen. Die erwartete Produktgröße liegt bei 939 bp.

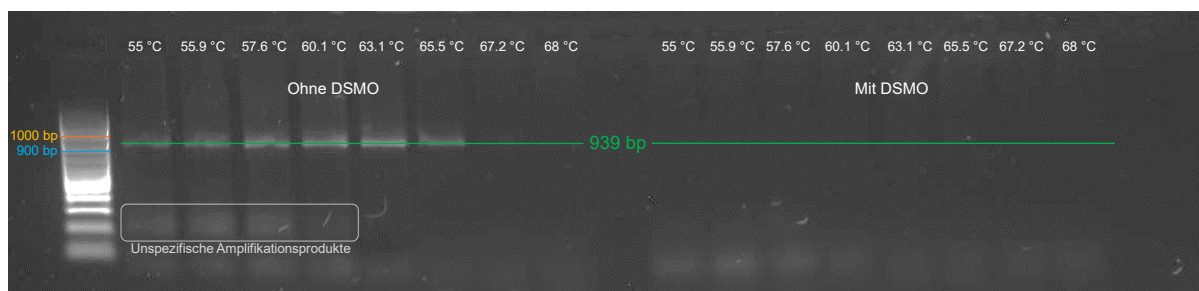


Abbildung 18: Gelelektrophorese der Gradienten-PCR mit und ohne DMSO

Abbildung 18 zeigt deutliche Banden auf der erwarteten Höhe von 939bp bei dem Ansatz ohne DMSO im Temperaturbereich von 56 °C bis 65.5 °C. Auf der Höhe von ungefähr 200 bp sind unspezifische Amplifikationsprodukte bei den Temperaturen 55 °C bis 60,1 °C erkennbar. Die Probe aus dem Ansatz ohne DMSO, mit einer Annealing-Temperatur von 63.1 °C, zeigt eine deutliche Bande und keine unerwünschten unspezifischen Amplifikationsprodukte. Eine Abschwächung der Leuchtintensität der Bande der Probe mit einer Annealing-Temperatur von 65,5 °C aus dem Ansatz ohne DMSO ist ebenfalls deutlich erkennbar.

Die Temperaturbereiche 67,2 °C und 68 °C zeigten keine Amplifikationsprodukte, bzw. Banden, gleich allen Proben des Ansatzes mit DMSO. Für weitere Analysen wurde daher die ideale Annealing-Temperatur der Primer bei 63.1 °C festgelegt

4.3.4 Ergebnisse PCR mit designten Primern und OPH48 Proben

Um die Funktionalität der Primer mit den aufgereinigten PCR-Produkten der Familie OPH48 zu testen (common SNP), wurden die Amplifikationsprodukte vor der Sanger-Sequenzierung mittels Gelelektrophorese überprüft. Die PCR-Produkte wurden mit Ladepuffer vermischt und mit der 100bp DNA Ladder von invitrogen auf ein 1,5 % Agarosegel aufgetragen.

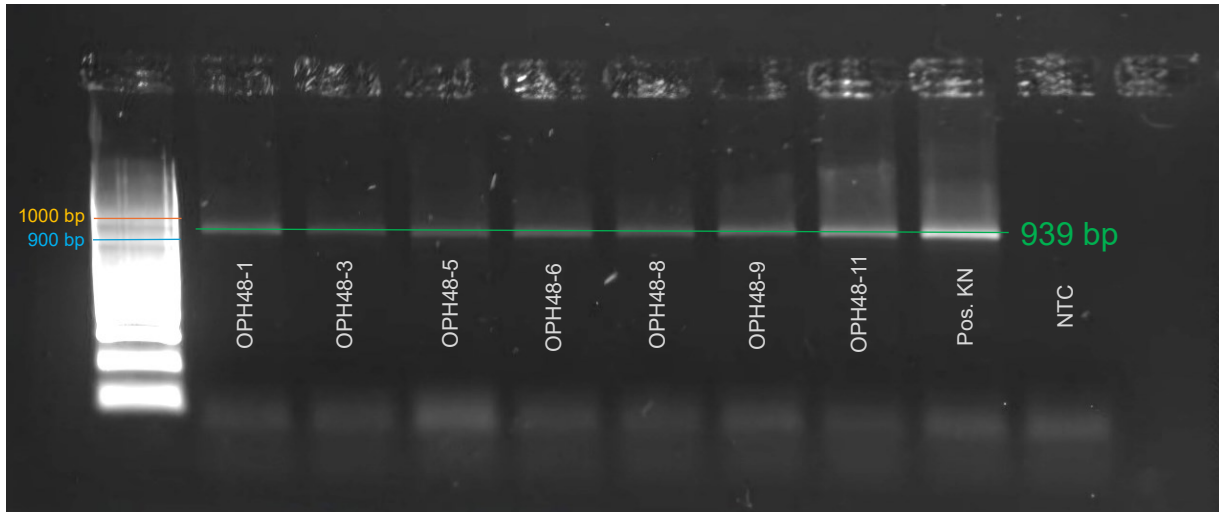


Abbildung 19: Gelelektrophorese der Amplifikationsprodukte der OPH48-Proben mit den designten Primern

Wie in Abbildung 19 ersichtlich ist, zeigen alle Proben von OPH48 ein PCR-Produkt in der erwarteten Größe von 939 bp. Die Positivkontrolle mit einer laborinternen Test-DNA zeigt ebenfalls eine Bande bei 939 bp. Die Non-template-control zeigt keine Bande und bestätigt damit einen kontaminationsfreien Mastermix für diesen Ansatz. Trotz des vorhandenen common SNP im Reverse Primer konnten alle Proben erfolgreich amplifiziert werden.

4.4 Sanger-Sequenzierung

Um zu überprüfen, ob auch die anderen phänotypisch auffälligen Familienmitglieder, von welchen Probenmaterial vorhanden ist, die Frameshift-Mutation c.2420_2435del (p.Glu807Glyfs*3) des *RPGR*-Gens tragen (OPH48-1, OPH48-2, OPH48-3, OPH48-4, OPH48-5, OPH-48-6), wurde eine Sanger-Sequenzierung der betroffenen Region des Exons 15 des Gens *RPGR* durchgeführt.

Mithilfe dieser Untersuchung soll ebenfalls geklärt werden, ob weibliche Familienmitglieder, welche phänotypisch unauffällig sind, X-chromosomal heterozygote Trägerinnen, also Konduktorinnen der Frame-Shift-Variante sind, welches die These der rezessiven Vererbung mit 50 % Wahrscheinlichkeit von phänotypisch betroffenen männlichen Nachkommen stützen würde.

Außerdem soll auf diese Weise geklärt werden, ob phänotypisch unauffällige männliche Familienmitglieder (OPH48-9) sowie phänotypisch unauffällige weibliche Familienmitglieder der Familie OPH48 hemizygot bzw. homozygot für die gefundenen *RPGR*-Gen-Variante sind.

Grundsätzlich sollte jede Sequenz, welche mit Sanger-Sequenzierungen analysiert wird, von beiden Seiten sequenziert werden, um Artefakte ausschließen zu können. Da jedoch im Exon 15 des *RPGR*-Gens sehr viele repetitive Sequenzen vorhanden sind und somit die Primer der PCR für die Vervielfältigung der DNA-Abschnitte vor der Sanger-Sequenzierung in größeren Abständen zueinander gesetzt werden mussten, hat das Amplifikationsprodukt eine Größe von 939 bp. Dies führt dazu, dass die Sequenzierung des RV-Stranges durch die Limitationen der Sanger-Sequenzierung die maximale Anzahl der qualitativ gut messbaren Basen (~700) wahrscheinlich überschreiten wird, bevor die Mutations-Region erreicht wird. Um dies zu überprüfen, wurde zunächst mit einer laborinternen Test-DNA, welche die Mutation nicht enthalten sollte, die Sequenzierung mit FW und RV Sanger-Sequenzierung getestet.

4.4.1 Informationen zur Auswertung (Farbkodierung)

Folgend die Ergebnisse der Sanger-Sequenzierungen mit den jeweiligen Qualitätswerten der gesamten Sequenz, dem Elektropherogramm, der Sequenz der Sanger-Sequenzierung, sowie dem dazugehörigen BLAT und Side by Side Alignment.

Zur einfacheren Interpretation wird folgend eine Farbkodierung verwendet. Die grüne Sequenz markiert den Forward-Primer, die rote Sequenz den Reverse-Primer. Die Erkennungsregion vor der Mutationsregion wurde in Forward-Ansätzen hellblau markiert.

Die Mutationsregion wird durch orange Markierungen hervorgehoben, die Erkennungsregion nach der Mutationsregion wurde violett markiert. Die Erkennungsregion für Reverse-Ansätze wurde grau markiert, wobei die Basenabfolge AAGGGGAG-GAAGAAGG, CCTTCTTCCTCCCCTT entspricht und 556 Basen von der Mutationsregion (gelb) entfernt liegt. Bei Heterozygotie wird der Mutationsbereich pink markiert.

Übersicht der Farbmarkierungen im Amplifikationsprodukt:

AAGTGGAGGGAGAACGTGAAAGAGGAGGAAGGAGAGAGGAAAAAGGAGGAAAGAGCGGGGAAG-GAGGAGAAAGGAGAGGAAGAAGGAGACCAAGGAGAGGGGGAAGAGGAGGAAACAGAGGGGAGAGGGGAAGAAAAAGAGGAGGGAGGGGAAGTAGAGGGAGGGGAAAGGAGAGAGG-GAAGAGGAAGAGGAGGAGGGT GAGGGGGAAGAGGAGGAAGGGGAGGGGGAAGAGGAGGAAGGGGAGGGGGAAGAGGAGAAGGGGAG-GAAGAAGGGGAGGAAGGAGAAGGGGAGGGGGAAGAGGAGGAAGGAGAAGGGGAGGGGAGAAGAGGAAGGAGAAGGGGAGG-AGAAGGGGAGGGAGAAGAGGAGGAAGGAGAAGGGGAGGGGAGAAGGAGAAGGAGAAGGGGAGG-GAGAAGAGGAGGAAGGAGAAGGGAAAGGGGAGGAGGAAGGAGAGGAAGGAGAAGGGGAGGGGGAAGAGGAGGAAGGAGAAGGGGAGGGATGGAGAAGGGGAGGGGGAAGAGGAGGAAGGAGAAT-GGGAGGGGGAAGAGGAGGAAGGAGAAGGGGAGGGGGAAGAGGAAGGAGAAGGGGAAGGGGAGGAAGGAAGGGGAGGGGGAAGAGGAGGAAGGAGAAGGGGAGGGGGAAGAGGAGGAAGGG- GAAGAAGAAGGGGAGGAAGAAGGAGAGGGAGAGGAAGAAGGGGAGGGGAGAAGGGGAGGAAGAAGAGGAAGGGGAAGTGAAGGGGAGGTGGAAGGGGAGGAAGGAGAGGGGGAAGGAGAGGAAGAGGAAG-GAGAGGAGGAAGGAGAAGAAAGGGAAAAGGAGGGGGAAGGAGAAGAAAACAGGAGGAACAGAGAAGAGGAGGAGGAAGAAGAGGGGAAGTACAGGAGACAGGCGAAGAAG

4.4.1.1 Sanger-Sequenzierung Forward und Reverse

Ziel der Sequenzierung der laborinternen Test-DNA war es, zu überprüfen, ob entgegen den Erwartungen eine Sequenzierung mit dem Reverse-Ansatz der Sanger-Sequenzierung trotz der großen Größe des Produktes von 939 bp möglich ist.

Sanger-Sequenzierung der laborinternen Test-DNA Reverse-Ansatz

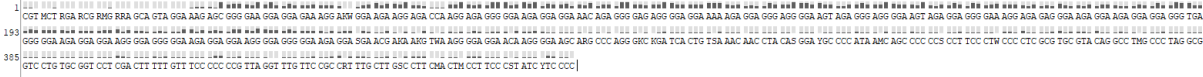


Abbildung 20: Qualitätswerte der gesamten Sequenz der laborinternen Test-DNA (Forward)

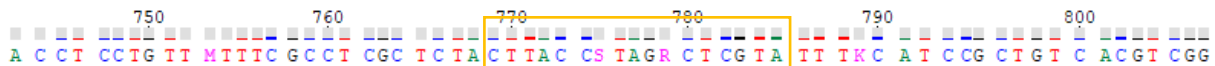


Abbildung 24: Elektropherogramm der laborinternen Test-DNA (Reverse) Mutationsregion

Sequenz der Sanger-Sequenzierung zur Übersicht:

CWTAYGACGYTCYTCCCTTCCTCCTCTTCTCTGWCCTCCTGTTTTCTTCTCCTTCCCCCTCCTTTTC
 CCTTTCTTCTCCTTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTTCCCCCTCTCCTTCCCTCCCTTCCCCTC
 CCCTTCCCTMCCCTTCCTTCTTCTCCTCCCCTTCTCCCTCCCCTTCTTCTCCTCCTCCTCCTTCTTC
 CTCCCCTTCTTCTTCCCCTTCTCCTCCTTCCCCCTCCCCTTCTCCTTCTCCTCCTTCCCCCTCCCCTT
 CTCCTTCCCTCCCCTTCCCCTTCTCCTTCCCTTCCCCCTCCCCTTCTYCTTCTCCTCCTTCCYCTCC
 YATTCTYCTTCCCTCCTTCCYCTCCYCTTCTYCATCCTCCYCTTCCYCTTCTCCTTCTCCTCCTTCT
 CYCTCCYCTTCTCCTTCTYCTTCCCTCCTCCYCTTCTYCTTCTCCTCCTTCTCCTTCTCCTTCCC
 CTTCTYCTTCTCCTTCTYCTTCCYCTTCTYCTTCTCCTCCTTCTMASTCCYCTTCTMCTTCTCCTTCT
 YCCTCCCCTTCTMCTTCTCCTCCTTCCCCCTCWTCTTCTCCTTCCCTCCCCTTCTTCTCCCCTTCTC
 CTTCTTAAYCTTCTTCTCCKCTTCCCTTCTCCTTCTCCTTCTCCACCCTSCCRWTTCTCCTCCTT
 CCCCTCCCATCCSTCRTSTTCCYMCTCGATTCTCATCTTCTCCTTCTCCTTGTSTCCTTGACCTCC
 TGTTMTTTCGCCTCGCTCTACTTACCSTAGRCTCGTATTTKCATCCGCTGTACGTCGGTTTAATTAA
 TCTGKCKMTAGGGCGGGGTAKTACTRGMCTASCATTAACAATTCAAAGAAKAKAKCCSCGATGMA
 SRCTAKGMRTCAGAAAGTRGAGGGTCTACCTCRACTTAYAASAAAAATAGAAGAAAGAAGAGYGSRTST
 MAGRACGMGTAGWAAAATAAAGTAGGAGGAGAT

Erkennungsregion vor Mutationsregion (grau hinterlegt): 195 - 212 bp
 Von Erkennungsregion bis Mutationsregion: 556 bp
 Mutationsregion (orange): 768 - 785 bp

Die große Größe des Amplifikationsproduktes und die Limitationen der Sanger-Sequenzierung haben zur Folge, dass zwar die Erkennungsregion vor der Mutation eindeutig identifiziert werden kann, die eigentliche Mutationsregion jedoch nicht korrekt sequenziert werden konnte. Die Basenabfolge stimmt aufgrund der schlechten Qualität der Signale und folglich des schwierigen Basecallings nicht mit der erwarteten Basenabfolge (CCTTCTTCTCCTCCCCTT) dieses Bereichs überein. Die schlechten Qualitätswerte sind in Abbildung 22, als auch in Abbildung 24 ersichtlich, während das Elektropherogramm die Erkennungsregion vor der Mutation mit ausreichenden Qualitätswerten in Abbildung 23 darstellt.

Folglich wird für alle weiteren Sanger-Sequenzierungen nur noch der Ansatz mit dem Forward-Primer verfolgt, da diese Ergebnisse in ausreichender Qualität liefern.

Die Frameshift-Mutation c.2420_2435del im *RPGR*-Gen konnte hemizygot in der Probe OPH48-3 nachgewiesen werden. Das BLAT-Ergebnis zeigt, dass die sequenzierte Probe eine hohe Übereinstimmung von 96,4 % mit der Referenzsequenz auf dem X-Chromosom aufweist. Diese Region umfasst die kritische Stelle des *RPGR*-Gens, in der die Mutation vermutet wird, insbesondere zwischen den Positionen 38286563 und 38286579. Die Ausrichtung erfolgt auf dem Minus-Strang des Referenzgenoms. Eine visuelle Überprüfung im UCSC Genome Browser bestätigte, dass die Sequenz die korrekte genomische Region abdeckt.

4.4.1.4 Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung der Probe OPH48-4

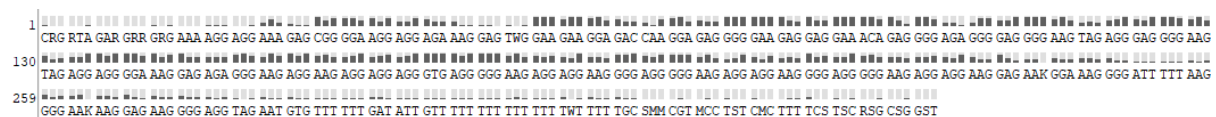


Abbildung 29: Qualitätswerte der gesamten Sequenz der Probe OPH48-4

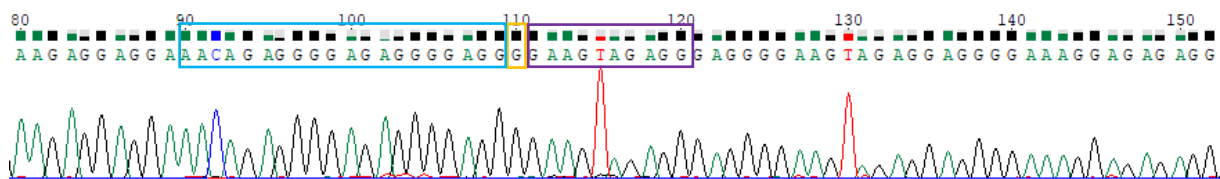


Abbildung 30: Elektropherogramm der Probe OPH48-4

Sequenz der Sanger-Sequenzierung zur Übersicht:

CRGRTAGARRRRGAAAAGGAGGAAAGAGCGGGGAAGGAGGAGAAAGGAGTWGGAAGAAGGAGACCA
 AGGAGAGGGGGAAGAGGAGGAAACAGAGGGGAGAGGGGAGGGGAAGTAGAGGAGGGGGAAGTAGAGGA
 GGGGAAAGGAGAGAGGGAAAGAGGAAGAGGAGGAGGGGTGAGGGGGAAGAGGAGGAAGGGGAGGGGGAAG
 AGGAGGAAGGGGAGGGGGAAGAGGAGGAAGGAGAAKGGAAAGGGGATTTTTAAGGGGAAGAAGGAGAA
 GGGGAGGTAGAATGTGTTTTTTGATATTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTCSMMCGTMCCTSTCMCT
 TTCSTSCRSGCSGGST

Erkennungsregion vor Mutationsregion (hellblau): 90 -109 bp

Mutationsregion (orange): 110 bp

Erkennungsregion nach Mutationsregion (violett): 111-120bp

BLAT Search Results:

Die gefundene Übereinstimmung auf dem X-Chromosom (chrX) beginnt bei Position 38286389 und endet bei Position 38286678. Die Übereinstimmung ist 290 Basenpaare lang und zu 97,1 % identisch mit der abgefragten Sequenz.

paare und liegt zwischen den Positionen 38286429 und 38286679 auf dem X-Chromosom. Diese Region umfasst die kritische Stelle des *RPGR*-Gens, wo die Mutation vermutet wird, insbesondere zwischen den Positionen 38286563 und 38286579. Die Ausrichtung erfolgt auf dem Minus-Strang des Referenzgenoms. Dies wurde ebenfalls durch eine visuelle Überprüfung im UCSC Genome Browser bestätigt.

4.4.1.7 Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung der Probe OPH48-8

Aufgrund der schlechten Qualität vorangegangener Sequenzierungen der Probe OPH48-8, die auf lagerungs- und transportbedingte Schädigungen der extrahierten DNA zurückgeführt werden kann, wurde der alternative Sequenzieransatz mit erhöhter DNA-Menge gewählt, um valide Ergebnisse zu erzielen. (Material und Methoden Abschnitt 3.6.1 Tabelle 7).

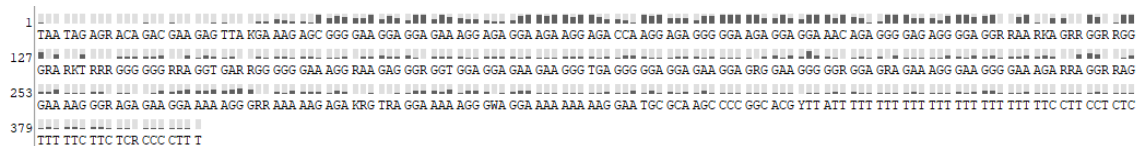


Abbildung 35: Qualitätswerte der gesamten Sequenz der Probe OPH48-8 (2µl DNA)

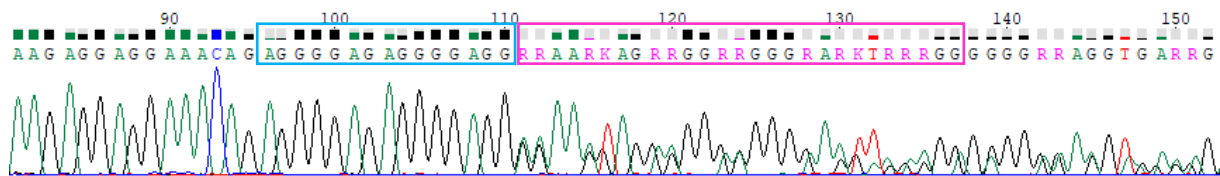


Abbildung 36 :Elektropherogramm der Probe OPH48-8 (2µl DNA)

Sequenz der Sanger-Sequenzierung zur Übersicht:

TAATAGAGRACAGACGAAGAGTTAKGAAAGAGCGGGGAAGGAGGAGAAAGGAGAGGAAGAAGGAGACC
AAGGAGAGGGGAAGAGGAGGAAACAGAGGGGAGAGGGGAGGRRRAARKAGRRGGRRGGGRARKTRRRG
GGGGRRAGGTGARRGGGGGAAAGGRAAGAGGRRGGTGGAGGAGAAGAAGGTTGAGGGGGAGGAGAA
GGAGRGAAGGGGRRGGAGRAGAAAGGGAAGGGAAAGARRAGRRAGGAAAAGGRRAGAGAAGGAAA
AAGGRRRAAAAAGAGAKRGTTRAGGAAAAAGGGWAGGAAAAAAAAGGAATGCGCAAGCCCCGGCACGY
TTATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTTCTCTCTTTTTTCTTCTCRCCCCTTT

Erkennungsregion vor Mutationsregion (hellblau): 96 – 110 bp
Heterozygotie Mutationsbereich (pink): 111 – 137 bp

Tabelle 13: Allelgegenüberstellung OPH48-8

Sequenz mit Deletion	AGGGGAGAGGGGAGGGGAAGTAGAGGGAGGGGAAGTAGAGGA
Sequenz ohne Deletion	AGGGGAGAGGGGAGGAAAAAGAGGAGGGAGGGGAAGTAGAGG
Gegenüberstellung	AGGGGAGAGGGGAGGRRRAARKAGRRGGRRGGGRARKWRRRGR
Sequenz von OPH48-8	AGGGGAGAGGGGAGGRRRAARKAGRRGGRRGGGRARKTTRRRGG

Gelb hinterlegte Nukleotide in Tabelle 13 kennzeichnen nicht passende Basecalls. Diese können auf die vereinzelt geringe Signalstärke bzw. die schwierige Messung bei 2 gleichzeitigen unterschiedlichen Messsignalen zurückgeführt werden. Tabelle 13 zeigt die erwarteten Basecalls bei heterozygoten Trägerinnen der Variante und stellt diese den sequenzierten Basen gegenüber.

Tabelle 14: IUPAC-Nomenklatorsystem für nukleotidische Mehrdeutigkeit

IUPAC-Nomenklatorsystem für nukleotidische Mehrdeutigkeit	
Buchstabe	Nukleotide
R	A oder G (Purine)
Y	C oder T (Pyrimidine)
S	G oder C
W	A oder T
K	G oder T
M	A oder C
B	C, G oder T (nicht A)
D	A, G oder T (nicht C)
H	A, C oder T (nicht G)
V	A, C oder G (nicht T)
N	A, C, G, T (jedes Nukleotid)

BLAT Search Results:

Das Ergebnis der Sequenzabfrage zeigt, dass die Sequenz auf dem X-Chromosom (chrX) gefunden wurde. Die gefundene Übereinstimmung beginnt bei Position 38286577 und endet bei Position 38286664. Die Übereinstimmung hat eine Länge von 88 Basenpaaren und ist zu 100,0 % identisch mit der abgefragten Sequenz.

Ausschnitt des Side by Side Alignment

```
00000074 gggggaagaggaggaaacagaggggagaggggaggaaa 00000111
<<<<<<<<< ||||||||||||||||||||||||||||||||||| <<<<<<<<<
38286614 gggggaagaggaggaaacagaggggagaggggaggaaa 38286577
```

Das BLAT-Ergebnis zeigt, dass die sequenzierte Probe eine vollständige Übereinstimmung von 100,0 % mit der Referenzsequenz auf dem X-Chromosom aufweist.

Der Bereich deckt den relevanten Abschnitt des X-Chromosoms ab, der die vermutete Mutationsstelle im *RPGR*-Gen umfasst. Eine visuelle Überprüfung im UCSC Genome Browser bestätigte, dass die Sequenz die interessierende Region des *RPGR*-Gens abdeckt und die kritische Mutationsstelle enthält.

Da nur 2 gelb markierte nicht erwartete Basen (Tabelle 13) auf die schwierige Messung bei 2 gleichzeitigen unterschiedlichen Messsignalen zurückgeführt werden können und somit vernachlässigbar sind, sowie die anderen Basen der Sequenzierung den Erwartungen entsprechen, kann die Frameshift-Mutation c.2420_2435del im *RPGR*-Gen in der Probe OPH48-8 als heterozygot nachgewiesen angesehen werden.

4.4.1.8 Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung der Probe OPH48-9

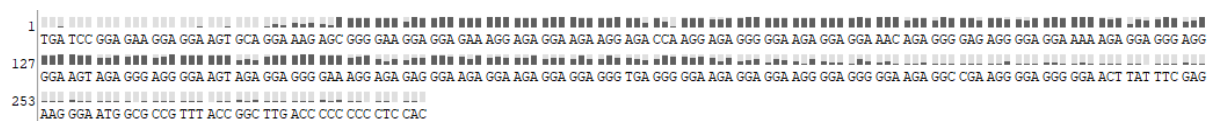


Abbildung 37: Qualitätswerte der gesamten Sequenz der Probe OPH48-9

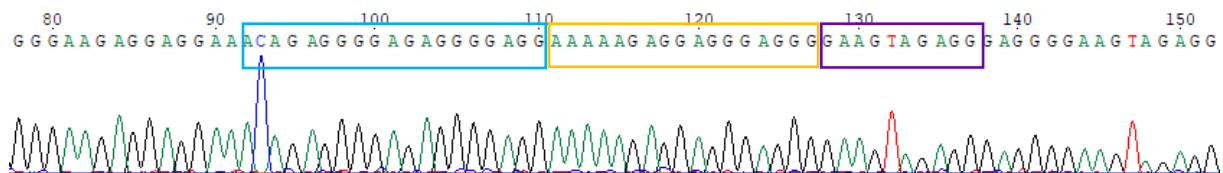


Abbildung 38: Elektropherogramm der Probe OPH48-9

Sequenz der Sanger-Sequenzierung zur Übersicht:

TGATCCGGAGAAGGAGGAAGTGCAGGAAAGAGCGGGGAAGGAGGAGAAAGGAGAGGAAGAAGGAGACC
AAGGAGAGGGGGAAGAGGAGGAAACAGAGGGGAGAGGGGAGGAAAAAGAGGAGGGAGGGGAAGTAGAG
GGAGGGGAAGTAGAGGAGGGGAAAGGAGAGAGGGAAGAGGAAGAGGAGGAGGGTGAGGGGGAAGAGGA
GGAAGGGGAGGGGGAAGAGGCCGAAGGGGAGGGGGAACCTTATTTTCGAGAAGGGAATGGCGCCGTTTAC
CGGCTTGACCCCCCTCCAC

Erkennungsregion vor Mutationsregion (hellblau): 92 – 110 bp

Mutationsregion (orange): 111 – 127 bp

Erkennungsregion nach Mutationsregion (violett): 128 – 137 bp

BLAT Search Results

Das Ergebnis der Sequenzabfrage zeigt, dass die Sequenz auf dem X-Chromosom (chrX) gefunden wurde. Die gefundene Übereinstimmung beginnt bei Position 38286429 und endet bei Position 38286691. Die Übereinstimmung hat eine Länge von 263 Basenpaaren und ist zu 98,4 % identisch mit der abgefragten Sequenz.

Ausschnitt des Side by Side Alignment

```
00000074 gagggggaagaggaggaaacagagggggagagggggaggaaaaagaggagggg 00000123
<<<<<<<< ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| <<<<<<<<<
38286616 gagggggaagaggaggaaacagagggggagagggggaggaaaaagaggagggg 38286567
```

```
00000124 aggggaagtagaggagggggaaagtagaggaggggaaaggagagagggaag 00000173
<<<<<<<< ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| <<<<<<<<
38286566 aggggaagtagaggagggggaaagtagaggaggggaaaggagagagggaag 38286517
```

Die Frame-Shift-Mutation c.2420_2435del im *RPGR*-Gen konnte in der Probe OPH48-9 nicht nachgewiesen werden, da die bei der Mutation deletierte Sequenz (orange) homozygot vorhanden ist. Das BLAT-Ergebnis zeigt, dass die sequenzierte Probe eine hohe Übereinstimmung von 98,4 % mit der Referenzsequenz auf dem X-Chromosom aufweist. Die Positionen der Übereinstimmung decken den relevanten Abschnitt des X-Chromosoms ab, in dem die Mutation im *RPGR*-Gen vermutet wird. Eine visuelle Überprüfung im UCSC Genome Browser bestätigt, dass die Sequenz den interessierenden Bereich abdeckt und die vermutete Mutationsstelle umfasst.

4.4.1.9 Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung der Probe OPH48-10



Abbildung 39: Qualitätswerte der gesamten Sequenz der Probe OPH48-10

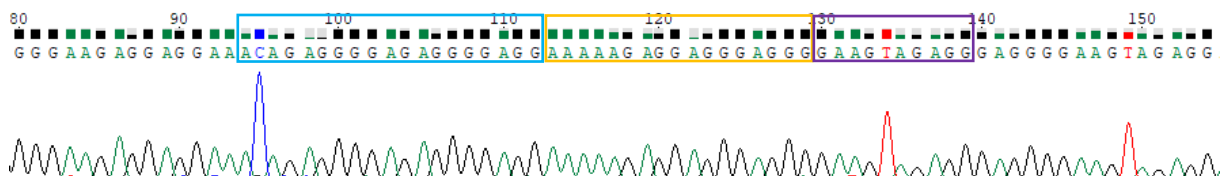


Abbildung 40: Elektropherogramm der Probe OPH48-10

Sequenz der Sanger-Sequenzierung zur Übersicht:

```
ARGGWRSGAGGMSCRMCGAAAAGGAGGAAAAGAGCGGGGAAGGAGGAGAAAAGGAGAGGAAGAAGGAGA
CCAAGGAGAGGGGGAAGAGGAGGAAACAGAGGGGAGAGGGGAGGAAAAAGAGAGGGGAGGGGAAGTAG
AGGGAGGGGAAGTAGAGGAGGGGAAAAGGAGAGAGGGAAGAGGAAGAGGAGGAGGGT GAGGGGGAAGAG
GAGGAAGGGGAGGGGGAAGAGGAGGAAGGGGAGGGGGAAGAKGAGGAAGGAGAAGGGAAAAGGGAGGA
AGAAGGGGAAGAASGCCACGGGGAGGAAGYAGTGGACGCCCCCCCCCGCCYCTTCCCCAGCMCCCC
CCCCTCTCCCCCTCTCCCCC
```

Erkennungsregion vor Mutationsregion (hellblau): 94 - 112 bp

Mutationsregion (orange): 13 - 129 bp

Erkennungsregion nach Mutationsregion (violett): 130 - 139 bp

Sequenz der Sanger-Sequenzierung zur Übersicht:

ATTCCRRRTAAGGCGAAGAGAGGAAAGAGCGGGGAAGGAGGAGAAAGGAGAGGAAGAAGGAGACCAAG
 GAGAGGGGGAAGAGGAGGAAACAGAGGGGAGAGGGGAGGRRAARTAGGRGGRRGGGRAATRRAGGGG
 GGAAARGTSAAGAGGRGAAGAGAAAGAGGARGGTGGAGGGGGASAAGGGTSAGGGGAAAGGGAAGSA
 GCCCCAGGGSSGCGGACCCACCGCCGGGGCCCGAGTACTCCCCAACTCTGTCCCCACCCCCCT
 CCGCSCTCTTTTGTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTTCCTCCCCCCCCCGCCRCCCCCCCC
 CCCTTCCCCCCCCCTCSTSTWTS

Erkennungsregion vor Mutationsregion (hellblau): 89 – 107 bp

Heterozygotie Mutationsbereich (pink): 108 – 134 bp

Tabelle 15: Allelgegenüberstellung OPH48-11

Allel mit Indel	AGGGGAGAGGGGAGGGGAAGTAGAGGGAGGGGAAGTAGAGGA
Allel ohne Indel	AGGGGAGAGGGGAGGAAAAAGAGGAGGGAGGGGAAGTAGAGG
Gegenüberstellung	AGGGGAGAGGGGAGGRRAARKAGRRGGRRGGGRARKWRRRRGR
Sequenz von OPH8-11:	AGGGGAGAGGGGAGGRRAARTAGGRGGRRGGGRAATTRRAGG

Gelb hinterlegte Nukleotide in Tabelle 15 kennzeichnen nicht passende Basecalls.

Diese können auf die vereinzelt geringe Signalstärke bzw. die schwierige Messung bei 2 gleichzeitigen unterschiedlichen Messsignalen zurückgeführt werden. Tabelle 15 zeigt die erwarteten Basecalls bei heterozygoten Trägerinnen der Variante und stellt diese den sequenzierten Basen gegenüber.

Tabelle 16: IUPAC-Nomenklatorsystem für nukleotidische Mehrdeutigkeit.

IUPAC-Nomenklatorsystem für nukleotidische Mehrdeutigkeit	
Buchstabe	Nukleotide
R	A oder G (Purine)
Y	C oder T (Pyrimidine)
S	G oder C
W	A oder T
K	G oder T
M	A oder C
B	C, G oder T (nicht A)
D	A, G oder T (nicht C)
H	A, C oder T (nicht G)
V	A, C oder G (nicht T)
N	A, C, G, T (jedes Nukleotid)

BLAT Search Results:

Das Ergebnis der Sequenzabfrage zeigt, dass die Sequenz auf dem X-Chromosom (chrX) gefunden wurde. Die Übereinstimmung hat eine Länge von 90 Basenpaaren und ist zu 100,0 % identisch mit der abgefragten Sequenz.

Ausschnitt des Side by Side Alignment

```
00000017 gaggaaagagcggggaaggaggagaaaggagaggaagaaggagaccaagg 00000066
<<<<<<<< ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| <<<<<<<<
38286667 gaggaaagagcggggaaggaggagaaaggagaggaagaaggagaccaagg 38286618
```

```
00000067 agagggggaagaggaggaaacagaggggagaggggaggaa 00000106
<<<<<<<< ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| <<<<<<<<
38286617 agagggggaagaggaggaaacagaggggagaggggaggaa 38286578
```

Da die gelb markierten nicht erwarteten Basen (Tabelle 15) auf die schwierige Messung bei 2 gleichzeitigen unterschiedlichen Messsignalen zurückgeführt werden können und die gecallten Basen in allen Fällen zu mindestens einem der beiden vermuteten Allele passen, sind diese Fehlmessungen vernachlässigbar. Vor allem, da die anderen Basen der Sequenzierung den Erwartungen entsprechen, kann die Frame-Shift-Mutation c.2420_2435del im *RPGR*-Gen in der Probe OPH48-11 als heterozygot bestätigt angesehen werden.

Das BLAT-Ergebnis zeigt, dass die sequenzierte Probe eine vollständige Übereinstimmung von 100,0 % mit der Referenzsequenz auf dem X-Chromosom aufweist. Die Übereinstimmung erstreckt sich über 90 Basenpaare und liegt zwischen den Positionen 38286578 und 38286667 auf dem X-Chromosom. Diese Region umfasst die kritische Stelle des *RPGR*-Gens, in der die Mutation vermutet wird, insbesondere zwischen den Positionen 38286563 und 38286579. Die Ausrichtung erfolgt auf dem Minus-Strang des Referenzgenoms.

Eine visuelle Überprüfung im UCSC Genome Browser bestätigt, dass die Sequenz die interessierende Region präzise abdeckt und die vermutete Mutationsstelle enthält.

4.5 Pathophysiologische Relevanz von Exon 15 (*RPGR*)

4.5.1 Konservierung von Exon 15 (*RPGR*)

Um den Einfluss einer Mutation im 15. Exon des *RPGR*-Gens abschätzen zu können, wurde mittels Genome-Browser von UCSC die Konservierung dieser Region analysiert.

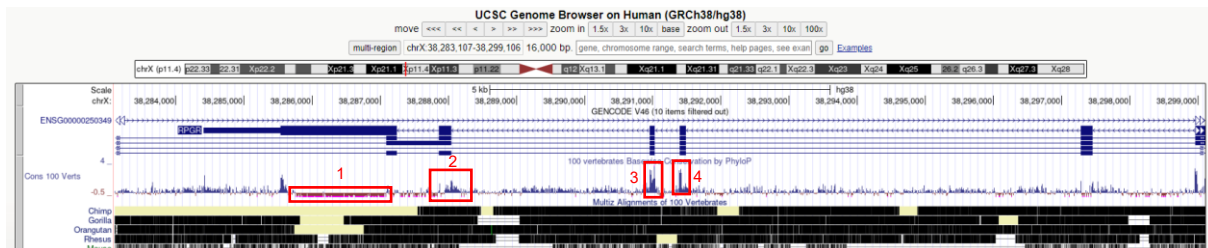


Abbildung 43: Ausschnitt aus UCSC Genome Browser; Konservierung der Exone: Exon 15 (1), Exon 14 (2), Exon 13 (3), Exon 12 (4) des *RPGR*-Gens in unterschiedlichen Spezies

Abbildung 43 zeigt die evolutionäre Konservierung der Exons des *RPGR*-Gens über verschiedene Spezies hinweg, visualisiert durch die Höhe der Balken, die den Grad der Konservierung an jeder Position repräsentiert. Auffällig ist die vergleichsweise geringe Konservierung in der Region um Exon 15 (Abbildung 43), in der die identifizierte Frameshift-Mutation p.Glu807Glyfs*3 lokalisiert ist. Im Gegensatz dazu weisen andere Exons, insbesondere 12, 13 und 14, eine hohe Konservierung auf, was auf eine hohe funktionelle Bedeutung dieser Bereiche hindeutet.

Interessanterweise ist die geringe Konservierung in der Region um Exon 15 nicht auf den Menschen beschränkt, sondern erstreckt sich auch über weitere Primaten wie Schimpansen, Orang-Utans und Gorillas. Besonders der Bereich der Mutationsstelle NM_001034853.2:c.2420_2435del ist bei allen drei Primaten, wie beim Menschen, wenig konserviert. Diese Beobachtung legt nahe, dass Veränderungen in diesem spezifischen Bereich des Proteins möglicherweise evolutionär tolerierbarer sind als in anderen, stärker konservierten Regionen.

4.5.2 Genexpression der Exons von *RPGR* in verschiedenen Gewebetypen

Um die eventuellen Auswirkungen einer der Frameshift-Mutation im Transkript NM_001034853.2 im wenig konservierten 15ten Exon besser einschätzen zu können, wurde versucht, die Genexpressionsniveaus des *RPGR* (Retinitis Pigmentosa

Daten zu Sehnerven bzw. dem Auge standen in der GTEx-Datenbank nicht zur Verfügung.

4.5.3 Exon-spezifische Expression des *RPGR*-Gens in verschiedenen menschlichen Gewebetypen

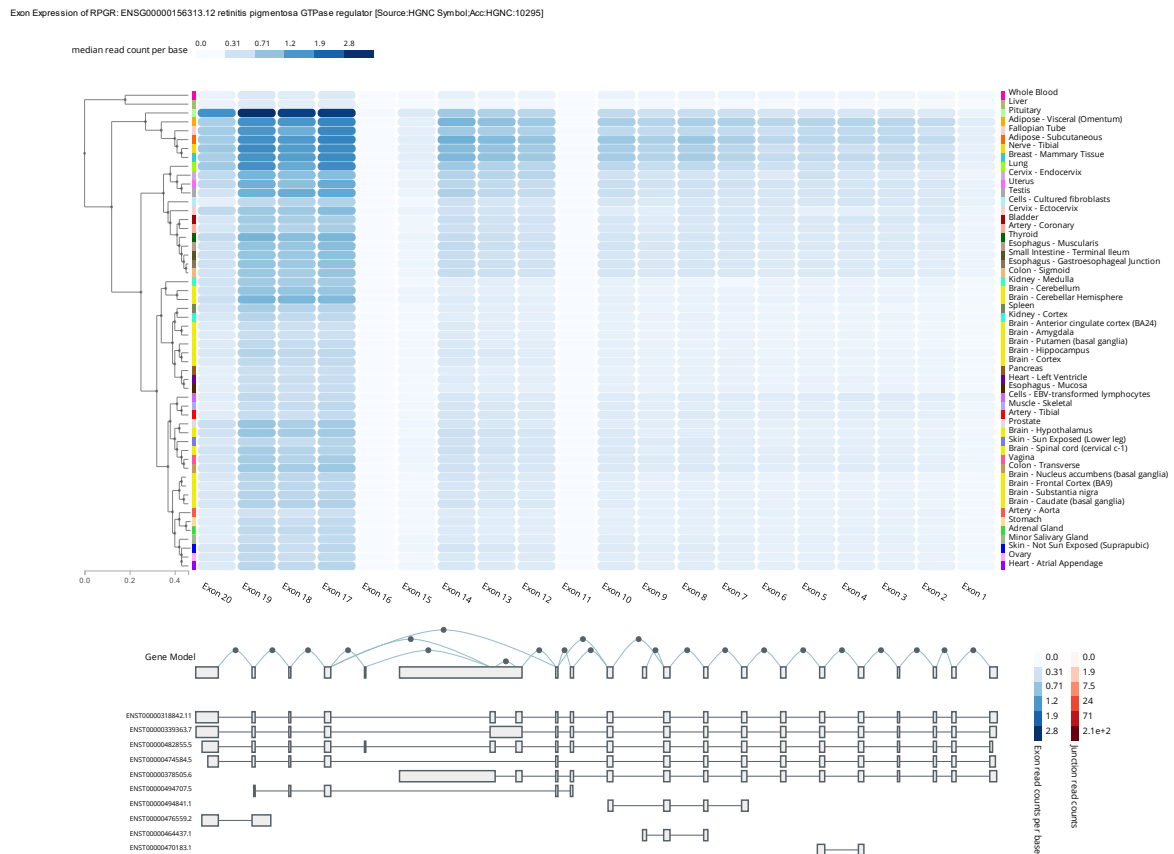


Abbildung 45: Exon Expression inklusive Gewebetypen und Isoformen von *RPGR*. Die Daten, welche für die in dieser Arbeit beschriebenen Analysen verwendet wurden, stammen aus dem GTEx-Portal vom 10/06/2024 dbGaP-Zugangsnummer phs000424.v8.p2.

Abbildung 45 zeigt die Expression der einzelnen Exons des *RPGR*-Gens und ihre Expressionsstärke in verschiedenen Geweben. Die Heatmap visualisiert die Intensität der Exon Expression, wobei hellere Farben eine geringere und dunklere Farben eine höhere Expression anzeigen. Jede Zelle bzw. dessen individuelle Blaufärbung repräsentiert den Median des Exon Read Count pro Base des *RPGR*-Gens. Jede Spalte repräsentiert ein Exon und jede Zeile ein spezifisches Gewebe, in welchem die Expression gemessen wurde.

Die vertikalen Dendrogramme gruppieren die verschiedenen Gewebe basierend auf ähnlichen Expressionsmustern. Dies hilft, Muster und Ähnlichkeiten in der Exon-Expression zu identifizieren.

Das Gen-Modell im unteren Teil der Abbildung 45 zeigt schematisch die Größe der einzelnen Exons sowie die Lage der Junctions eines Transkripts. Darunter sind weitere schematische Darstellungen von Exon- und Intron-Regionen einiger unterschiedlicher Isoformen des *RPGR*-Gens dargestellt.

Wie in Abbildung 45 ersichtlich ist, weist Exon 15 durchgehend über alle Gewebearten eine geringe Expressivität auf. Dies deutet darauf hin, dass eine Mutation in diesem Bereich vermutlich geringere pathophysiologische Auswirkungen hätte als in anderen Bereichen, wie beispielsweise Exon 17. Da in der GTEx-Datenbank und folglich auch in dieser Grafik keine spezifischen Daten für die Expression der unterschiedlichen Exons in Sehnerven, dem Auge bzw. am Sehen beteiligten Organen vorhanden sind, kann nicht direkt auf die Auswirkungen der Mutation des *RPGR*-Gens NM_001034853.2 p.Glu807Glyfs*3 in diesen Gewebetypen geschlossen werden. Allerdings zeigt diese Analyse dennoch, dass Exon 15 eine höhere Expression in allen getesteten Gewebetypen aufweist als Exon 16 oder Exon 11, wenn auch auf geringem Niveau.

4.6 Aktualisierter Stammbaum

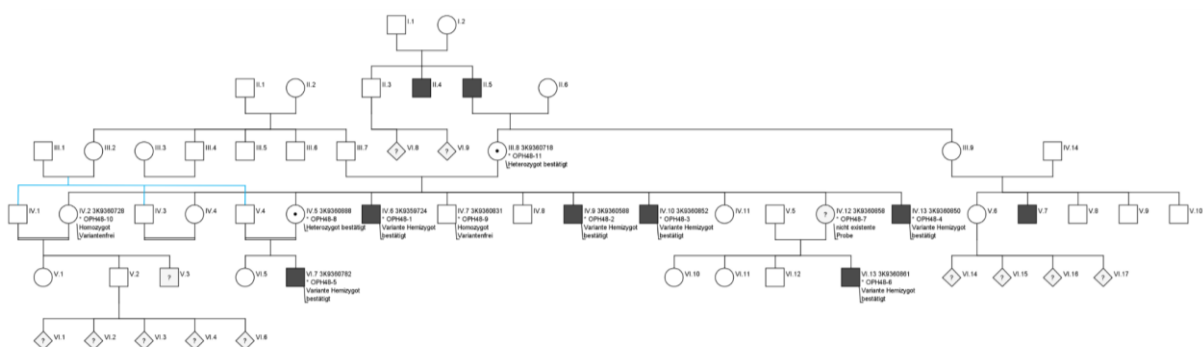


Abbildung 46: Aktualisierter Stammbaum Familie OPH48 nach Sanger-Sequenzierung. (erstellt mit CeGaT)

Aufgrund der Ergebnisse der Sanger-Sequenzierungen der Familie OPH48 wurde der Stammbaum (Abbildung 46) aktualisiert. Die Probanden IV.5 (OPH48-8) und III.3 (OPH48-11), welche heterozygote Trägerinnen der Genvariante sind, wurden als

Konduktorinnen markiert. Keine symbolbetreffende Änderung beim Stammbaum erfolgte bei den Probanden IV.6 (OPH48-1), IV.9 (OPH48-2), IV.10 (OPH48-3), IV.13 (OPH48-4), sowie VI.7 (OPH48-5) und VI.13 (OPH48-6), die zwar hemizygot als Variantenträger bestätigt werden konnten, jedoch schon zuvor durch ihren Phänotyp als wahrscheinliche Variantenträger markiert wurden. Die Bestätigung der hemizygoten Trägerschaft wurde jedoch im Stammbaum unter der Probennummer ergänzt. Gleiches trifft auf die Probandin IV.2 (OPH48-10) und den Probanden IV.7 (OPH48-9) zu, welche beide eine Wildtypsequenz an der Stelle c.2420_2435del (p.Glu807Glyfs*3) des *RPGR*-Gens aufwiesen.

Die Segregation der Variante NM_001034853.2 p.Glu807Glyfs*3 des *RPGR*-Gens stimmt mit dem Verdacht einer X-chromosomal rezessiven Vererbung überein.

5 Diskussion

5.1 Phänotyp-Genotyp Korrelation

In der genetischen Analyse der Familie OPH48, welche mit der Erkrankung progressive Retinal degeneration lt. Stammbaum phänotypisch assoziiert wurde, konnte die Variante NM_001034853.2 p.Glu807Glyfs*3 im *RPGR*-Gen nachgewiesen werden. Diese Variante wurde bereits mit Retinopathia pigmentosa assoziiert und führt somit höchstwahrscheinlich zu einer schrittweisen Verschlechterung des Sehens, beginnend mit Nachtblindheit und dem Verlust des peripheren Sehens. (12)

Obwohl die identifizierte Variante eine plausible Ursache für die beobachtete Augenerkrankung darstellt, ist es dennoch möglich, dass aufgrund der ungenauen phänotypischen Beschreibung der betroffenen Familienmitglieder das Risiko einer falschen Genotyp-Phänotyp-Korrelation besteht. Eine genaue und umfassende Phänotypisierung der Familienmitglieder ist entscheidend, um sicherzustellen, dass die genetische Variante tatsächlich die beobachtete Erkrankung verursacht und keine anderen genetischen oder umweltbedingten Faktoren involviert sind.

Daher wäre eine detailliertere klinische Untersuchung und Beschreibung des Phänotyps der betroffenen Familienmitglieder notwendig, um die Diagnose Retinopathia pigmentosa zu bestätigen und mögliche Fehldiagnosen zu vermeiden. Trotz der geo-

grafischen schwierigen Erreichbarkeit der Familie in Pakistan, wäre eine Zusammenarbeit mit Augenärzten vor Ort und gegebenenfalls die Durchführung weiterer funktioneller Tests zur besseren phänotypischen Beschreibung erstrebenswert. Dies könnte dabei helfen, die genaue Ursache der Erkrankung mit größerer Sicherheit zu bestimmen und eine präzisere Genotyp-Phänotyp-Korrelation zu ermöglichen.

5.2 Probenqualität

Die teilweise schlechte Qualität der DNA, welche auf suboptimale Transport- & Lagerungsbedingungen zurückzuführen sind, erschwerten die molekulargenetischen Analysen. Durch alternative Ansätze mit erhöhtem DNA-Einsatz konnten valide Ergebnisse erreicht werden, für zukünftige Analysen sollte dennoch eine kürzere Transportdauer und eine bessere Kühlung des Probenmaterials angestrebt werden, um die Untersuchungen zu erleichtern.

5.3 Primerdesign

Auch wenn die designten Primer für die durchgeführten Analysen ausreichend waren, sollte für weitere Analysen in anderen Familien in Betracht gezogen werden, neue Primer zu generieren. Die große Produktgröße des Amplifikationsproduktes, welche auf die vielen repetitiven Sequenzen des Exon 15 des *RPGR*-Gens zurückzuführen sind, erschwerten die Reverse-Sequenzierung mit Sanger. Die Primer konnten nicht außerhalb des Exons gesetzt werden, da das Exon 15 des *RPGR*-Gens ~ 1706 BP groß ist. Eine mögliche Alternative wäre die Aufteilung der Sequenz in mehrere PCR-Produkte, welche sich überlappen, um einen Abschnitt dieser Größe trotz der Limitationen der Sanger-Sequenzierung untersuchen zu können.

Auch der vorhandene common SNP rs111787313 im Zentrum des Reverse-Primers könnte bei weiteren Analysen zu Problemen führen, wenn die Proben-DNA den SNP enthält. Aus diesem Grund sollte für weiterführende Analysen ein neues Primerdesign angestrebt werden.

5.4 Konservierung und Relevanz des Exon 15 (*RPGR*)

Die geringere Konservierung in Exon 15 (Abbildung 43) über viele Spezies hinweg im Vergleich zu den anderen Exons (bspw. Exon 13, Exon 14) könnte darauf hindeuten,

dass die Frameshift-Mutation p.Glu807Glyfs*3 möglicherweise weniger schwerwiegende Auswirkungen auf die Proteinfunktion hat als Mutationen in stärker konservierten Regionen. Nichtsdestotrotz führt die Frameshift-Mutation voraussichtlich zu einem vorzeitigen Stopcodon, was höchstwahrscheinlich zu einem verkürzten und funktionslosen RPGR-Protein führt. Trotz der geringeren Konservierung könnte die Mutation somit dennoch die Proteinfunktion, oder Proteinstabilität beeinflussen und dadurch zur Pathogenese der Retinitis pigmentosa in der untersuchten Familie OPH48 beitragen.

5.5 Erhöhte Genexpression von *RPGR* in Nervengewebe

Wie in den Ergebnissen 4.5.2 beschrieben, ergab die Expressionsanalyse des *RPGR*-Gens die höchste Expression in der Hypophyse, im Nerv Tibia, im subkutanen Fettgewebe, im Eileiter, in der Lunge und im Brustgewebe.

Da das relevante Transkript NM_001034853.2 des *RPGR*-Gens vor allem für seine Beteiligung an der Funktion der Photorezeptoren in der Netzhaut bekannt ist und Mutationen in diesem häufig zu Netzhauterkrankungen führen, könnten die Gewebe des zentralen Nervensystems und somit in weitere Folge der Sinnesorgane am relevantesten sein. Wie bereits erwähnt sind leider keine differenzierteren Daten für diese spezifischen Gewebearten, die das Sehen betreffen, in der GTEx-Datenbank bzgl. *RPGR*-Exon-Expression verfügbar. (7)

Gegen einen hohen Impact einer Mutation in Exon 15 spricht auch eine Analyse die in den supplementary Materials des Papers "Diagnostic genome sequencing improves diagnostic yield: a prospective single-centre study in 1000 patients with inherited eye diseases" von Weisschuh et al. (2023) durchgeführt wurde. Die Studie erwähnte und beobachtete zwar eine stabile Expression des *RPGR*-Gens im Blut bei 95 % der Individuen der Studie, allerdings zeigte sich die Expression der relevanten ORF15-Isoform (Exon 15 in NM_001034853.2) im Vergleich zu den anderen Exons dieses Gens nur in einem geringen Ausmaß. (9)

Auch die etwas erhöhte Expression im Gehirngewebe (Kleinhirnhemisphäre und Kleinhirn) lt. GTEx-Datenbank (Abbildung 44), lässt auf keine Verbindung schließen, da das Kleinhirn, als auch die Kleinhirnhemisphäre selbst, keine direkte Rolle beim

Sehen spielen. Die Verbindung zum Sehen beschränkt sich in diesem Fall auf die Feinabstimmung von Augenbewegungen. (1,2)

Im weiteren Sinn könnte man dennoch durch die erhöhte Expression im Tibia Nerv bzw. folglich der erhöhten Expression im peripheren Nervensystem darauf schließen, dass jene erhöhte Expression eventuell auch spezialisierte Nervenzellen, wie Photorezeptoren im menschlichen Auge, betrifft. Zieht man dies in Betracht, könnte ein durch eine Mutation dysfunktionales *RPGR*-Transkript und folglich fehlende oder geminderte Expression im Nervengewebe der Photorezeptoren die pathologischen Mechanismen, welche zu Retinitis pigmentosa oder einer phänotypisch ähnlichen Erkrankung führen, erklären.

5.6 Pathophysiologische Bedeutung von Mutationen im *RPGR*-Gen Exon 15

Auch wenn die Aminosäuresequenz in der Region um Exon 15, in der die identifizierte Frameshift-Mutation p.Glu807Glyfs*3 lokalisiert ist, nicht hochkonserviert ist, könnte die Region dennoch Teil einer wichtigen funktionellen Domäne des *RPGR*-Proteins sein. Um die Relevanz der bisher generierten Ergebnisse zu untermauern, wurde unter anderem in der HGMD-Datenbank und weiteren Gendatenbanken nach publizierten Varianten in Exon 15 des *RPGR*-Gens gesucht, welche in ihrer Größe oder Position jener Variante, welche in dieser Arbeit behandelt wurde, ähneln und die mit Retinitis pigmentosa oder ähnlichen degenerativen Netzhauterkrankungen in Verbindung gebracht wurden.

Via HGMD konnte eine krankheitsverursachende Mutation im Exon 15 des *RPGR*-Gens (c.2357_2358insGAGC) gefunden werden, die zu einer Frameshift-Mutation und einem vorzeitigen Stopcodon führt (p.Asp787Argfs*2) und bei Patienten mit Retinitis pigmentosa gefunden wurde. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass Deletionen in Exon 15, auch wenn sie in weniger konservierten Regionen liegen, zu einem Funktionsverlust des *RPGR*-Proteins führen und Retinitis pigmentosa verursachen können. (14)

Ein weiterer Eintrag in der HGMD-Datenbank zeigt eine Duplikation von vier Nukleotiden im Exon 15 des *RPGR*-Gens (c.1853_1856dupGAAG), welche bei einer 54-jährigen deutschen Patientin mit X-chromosomal rezessiver Retinitis pigmentosa gefunden wurde. Diese weitere vermerkte Variante in den zusätzlichen Daten des Papers von Eisenberger et al (2013) ist ein weiterer wichtiger Hinweis für den Einfluss von Veränderungen in Exon 15 des *RPGR*-Gens. (15)

Dem folgt eine kürzlich veröffentlichte Studie von Tuupanen et al. (2022). Sie konzentriert sich auf die Häufigkeit und Verteilung von Varianten im *RPGR*-Gen bei einer großen Kohorte von Patienten mit vererbter Netzhautdystrophie (IRD). Obwohl die Studie nicht explizit RP diagnostiziert, deuten die Art der Mutation, ihre schwere Auswirkung auf das Protein und der beobachtete Phänotyp stark darauf hin, dass diese Mutation einen RP ähnlichen Phänotyp verursacht. Die Mehrheit der männlichen Patienten und ein Großteil der weiblichen Patienten der Studie zeigten Symptome einer Retinitis pigmentosa (RP) oder einer Stäbchen-Zapfen-Dystrophie. Bei einigen Patienten wurden auch Zapfen-, Zapfen-Stäbchen- oder Makuladystrophien diagnostiziert. (16)

In der Studie wird auch erwähnt, dass das Exon ORF15 eine Hotspot-Region für krankheitsverursachende Varianten ist, insbesondere für kleine Deletionen, die zu Frameshifts führen. Der Artikel stärkt dadurch indirekt die Hypothese, dass Varianten im Exon 15 des *RPGR*-Gens zu RP führen können, auch wenn die Expression dieses Exons gering ist. (16)

Weiters wurde in den Supplementary Materials dieses Papers, genauer in der Tabelle "*RPGR* variants observed in an unselected IRD cohort of 5201 patients", neben vielen weiteren teils als pathogen oder „likely pathogenic“ klassifizierten Mutationen, die Mutation c.1840_1843dupAAGG als eine Frameshift-Variante im Exon ORF15 des *RPGR*-Gens beschrieben, welche zu einer Verschiebung des Leserasters und einem vorzeitigen Stoppcodon (p.Val615Glufs*16) führt. (16)

Noch aufschlussreicher ist die gefundene Variante (c.2419G>T, p.Glu807*). Sie betrifft die gleiche Aminosäure an derselben Position (Glu807), wie jene Variante, die in dieser Arbeit behandelt wird (NM_001034853.2: c.2420_2435del, p.Glu807Glyfs3).

Obwohl die Varianten sich am DNA-Strang geringfügig in ihrer genauen Position unterscheiden, ist die funktionelle Konsequenz dieselbe, die vorzeitige Beendigung der Proteintranslation. Dieser Umstand ist ein starker Hinweis darauf, dass diese Stelle im *RPGR*-Protein von entscheidender Bedeutung für die Pathogenese von RP sein könnte. (16)

5.6.1 Weitere relevante Studien

Weitere Recherchen führten zur Variante NM_001034853.2 (c.2405_2406delCA), welche auch in der Studie "Evaluation of a whole-exome sequencing pipeline and benchmarking of causal germline variants" von Tosco-Herrera et al. (2022) erwähnt wird. Diese Variante beschreibt eine Deletion von zwei Nukleotiden (CA) an den Positionen 2405 und 2406 der kodierenden DNA-Sequenz des *RPGR*-Gens. Die in dieser Arbeit analysierte Indel-Variante (c.2420_2435del) liegt nur 14 Nukleotide von der von Tosco-Herrera et al. (2022) beschriebenen Variante c.2405_2406delCA entfernt und befindet sich ebenfalls im Exon 15 des *RPGR*-Gens auf dem gleichen Transkript NM_001034853.2. (17)

Dem entgegenzusetzen ist, dass die Variante c.2405_2406delCA zwar in der Exom-Sequenzierung der Studie "Evaluation of a whole-exome sequencing pipeline and benchmarking of causal germline variants" erfasst wurde, jedoch nicht die in der Studie festgelegten Qualitätskontrollkriterien erfüllte und somit aufgrund einer geringen Genotypqualität (GQ) verworfen wurde. Dennoch wird sie in Tabelle 4 der Studie mit Retinitis pigmentosa in Verbindung gebracht. Laut ClinVar ist diese Variante außerdem als „wahrscheinlich pathogen“ eingestuft und mit atrophischer Makuladegeneration assoziiert. (17)

Panneman et al. (2023) führten eine kosteneffektive Sequenzanalyse von 113 Genen bei 1.192 Probanden mit Retinitis pigmentosa (RP) und Leberscher kongenitaler Amaurose (LCA) durch. Bei der Analyse der Daten des Papers konnte eine weitere interessante Variante im *PRGR*-Gen entdeckt werden. Die in den Supplementary Datensätzen gefundene Mutation c.2405_2406del führt im Gen zu einer Deletion von zwei Nukleotiden in der cDNA-Sequenz, was einen Leserahmenverschiebungsfehler (Frameshift) verursacht. Dies resultiert in der veränderten Proteinsequenz

p.(Glu802Glyfs*32), wobei an Position 802 Glutaminsäure durch Glycin ersetzt wird und ein vorzeitiges Stopcodon nach 32 fehlerhaften Aminosäuren auftritt. Laut Datensatz von Panneman et al. (2023) und den Kriterien des American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) wurde diese Mutation als „pathogen“ klassifiziert, was bedeutet, dass sie als krankheitsverursachend gilt. (18)

Von besonderem Interesse ist diese Mutation, da sie nur 13 Basen von der in dieser Arbeit beschriebenen Mutation (NM_001034853.2 (RPGR): c.2420_2435del (p.Glu807Glyfs*3)) entfernt liegt.

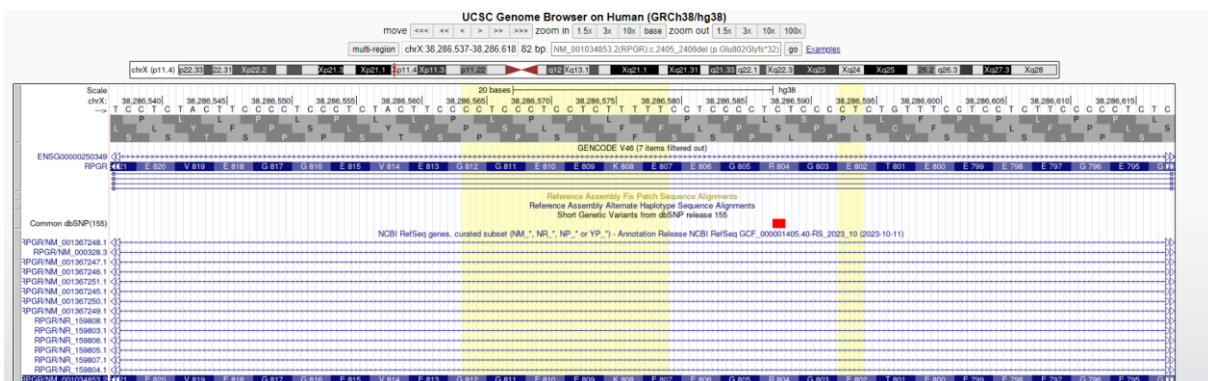


Abbildung 47: Auszug aus UCSC Genome Browser; Darstellung der Variante NM_001034853.2(RPGR):c.2405_2406del (p.Glu802Glyfs*32) gelb markiert (rechts); Darstellung der Variante NM_001034853.2(RPGR):c.2420_2435del (p.Glu807Glyfs*3) gelb markiert (links)

Die Mutation auf dem Transkript NM_001034853.2 im RPGR-Gen ist lt. den Supplementary-Daten des Papers mit X-chromosomaler Retinitis pigmentosa assoziiert. Die kurze Distanz zwischen den Varianten von nur 13 Basen (Abbildung 47) und die dennoch in den Daten von Panneman et al. (2023) beschriebenen Assoziation mit Retinitis pigmentosa, stärkt die Hypothese, dass Mutationen in diesem Bereich Auswirkungen auf den Phänotyp haben können. (18) Diese gilt vor allem in dem Kontext, dass sich die gefundene Variante im gleichen Transkript wie die Mutante, welche in dieser Arbeit behandelt wird, befindet.

Eine weitere interessante Mutation, die im gleichen Transkript NM_001034853.2 und ebenfalls in den Supplementary Daten der Studie in Tabelle 4 gefunden werden konnte, ist NM_001034853.2(RPGR):c.3027_3028del (p.Glu1010Glyfs*68). Die Mutation liegt ebenfalls im 15 Exon. Allerdings liegen hier zwischen den beiden Mutationen 591 Basen, wie in Abbildung 48 ersichtlich ist. Auch hier wurde die Variante lt. ACMG-Klassifikation als pathogen eingestuft und mit RP assoziiert. (18)

Eine weitere Sequenzierungsanalyse eines Probanden, identifiziert durch die Probandennummer 075760, deckte ebenfalls eine Mutation im *RPGR*-Gen auf, die für Retinitis pigmentosa (RP) mit X-chromosomaler Vererbung verantwortlich zu sein scheint. Die genomische Notation der identifizierten Mutation lautet chrX:g.38145846_38145847del (Hg19), welche eine Deletion von zwei Basenpaaren darstellt. Auf cDNA-Ebene wird diese Mutation als c.2405_2406del beschrieben und führt zu einer Frameshift-Mutation, die auf Proteinebene als p.(Glu802Glyfs*32) beschrieben wird. (18)

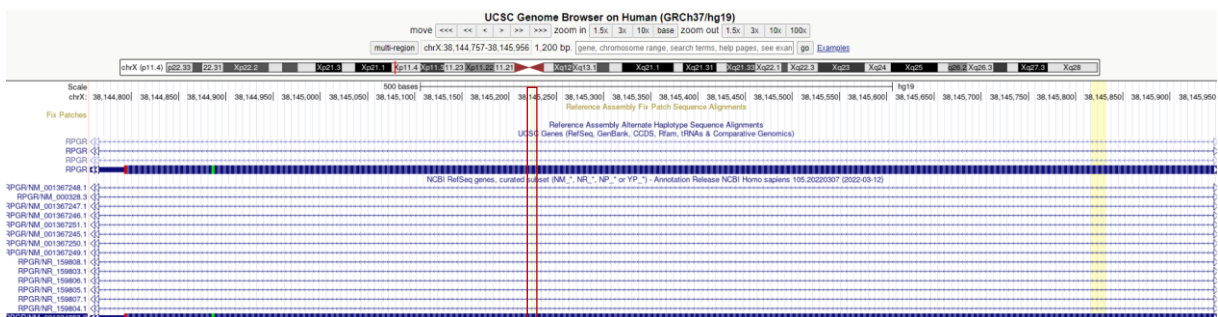


Abbildung 48: Auszug aus UCSC Genome Browser (Hg19); Darstellung der Variante NM_001034853.2(*RPGR*):c.3027_3028del (p.Glu1010Glyfs*68). gelb und rot markiert (links); Darstellung der Variante NM_001034853.2(*RPGR*):c.2420_2435del (p.Glu807Glyfs*3) gelb markiert (rechts)

Weitere bekannte phänotypische Manifestationen dieser Mutation umfassen neben RP auch X-chromosomale cone-rod dystrophy (CD/CRD) und Makuladystrophie (MD). Die Daten unterstreichen die Bedeutung von *RPGR*-Mutationen des 15ten Exons bei retinalen Degenerationen und stützen die These des Einflusses der in dieser Arbeit behandelten Mutation, da sich diese ebenfalls auf dem Transkript NM_001034853.2 befindet. (18)

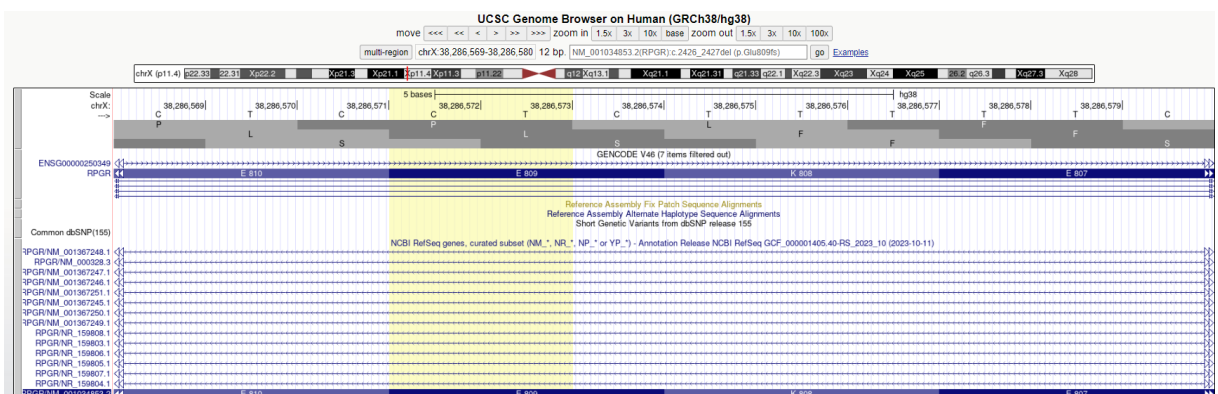


Abbildung 49: Auszug aus UCSC Genome Browser; Darstellung der Variante NM_001034853.2(*RPGR*):c.2426_2427del (p.Glu809fs)

Maggi et al. (2021) entwickelten eine gezielte Sequenzierungsmethode basierend auf Long-Range-PCR (LR PCR), die eine flexible und kostengünstige Alternative zu herkömmlichen Methoden wie Whole-Exome Sequencing (WES) oder spezifischen Genpanels darstellt. Dieser Ansatz ermöglichte eine umfassende Sequenzierung von 35 Loci, die mit erblichen Netzhauterkrankungen (IRDs) assoziiert sind, einschließlich des *RPGR*-Gens. (19)

Unter anderem wurde im Paper von Maggi et al. die Variante NM_001034853.1 (*RPGR*): c.2426_2427del (p.Glu809fs) im *RPGR*-Gen (Abbildung 49) in einem männlichen Patienten im Alter von 21-25 Jahren mit Retinitis pigmentosa (RP) identifiziert. Die Variante ist als pathogen eingestuft und führt zu einem Frameshift, der das Leseraster des Gens stört und zu einem vorzeitigen Stoppcodon führt. Die Einstufung basiert auf den Kriterien des ACMG. (19,20)

Die genetische Variante wird übereinstimmend von mehreren unabhängigen Einreichern in der ClinVar-Datenbank als pathogen oder wahrscheinlich pathogen für Retinitis pigmentosa und verwandte Netzhautdystrophien eingestuft. Von besonderem Interesse ist diese Variante, da sie im exakt gleichen Bereich, wie die in dieser Arbeit behandelte Mutation, auf dem X-Chromosom, liegt (Abbildung 50).

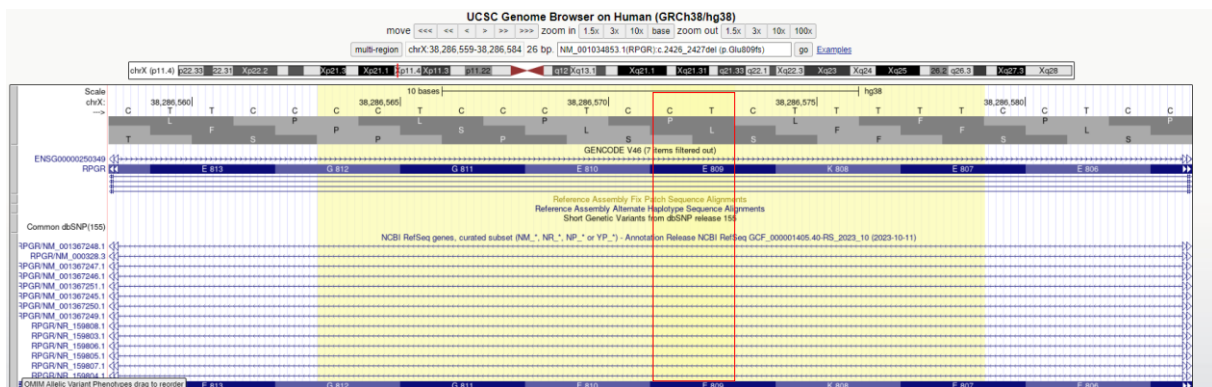


Abbildung 50: Auszug aus UCSC Genome Browser; Darstellung der Variante NM_001034853.2(*RPGR*):c.2426_2427del (p.Glu809fs) (gelb markiert, rot markiert), Darstellung der Variante NM_001034853.2(*RPGR*):c.2420_2435del (p.Glu807Glyfs*3) (gelb markiert)

Die Studie untersuchte insgesamt 227 nicht verwandte Probanden mit IRDs. Besonders hervorzuheben ist, dass die Methode eine vollständige Abdeckung des *RPGR*-Gens ermöglichte, einschließlich des Exon ORF15, das aufgrund seiner repetitiven Sequenz für herkömmliche Sequenzierungsmethoden eine Herausforderung dar-

stellt. In der Studie wurden neben der zuvor beschriebenen und in Abbildung 50 dargestellten Lokalisation der Variante NM_001034853.1(*RPGR*):c.2426_2427del (p.Glu809fs) mehrere weitere Frameshift-Mutationen im Exon ORF15 von *RPGR* identifiziert (NM_001034853.1:c.2586_2587del, NM_001034853.1:c.2008_2017del, NM_001034853.1:c.2236_2237del, NM_001034853.1:c.2819_2838dup). Auch diese Mutationen führen zu einem vorzeitigen Stopcodon und somit zu einem verkürzten, möglicherweise funktionsunfähigen Protein und liegen teilweise ebenfalls nahe der in dieser Arbeit behandelten Mutation. (19)

Zwei weitere spezifische Mutationen, welche in den Supplementary-Daten der Studie „EYS is a major gene involved in retinitis pigmentosa in Japan: Genetic landscapes revealed by stepwise genetic screening“ von Numa et al (2020) identifiziert wurden, stehen im Zusammenhang mit retinitis pigmentosa (RP). Diese Mutationen (c.2357_2358insGAGGAGAA p.(Asp787Argfs10) und c.2236_2237delAA p.(Lys746Glufs19)) befinden sich im *RPGR*-Gen, welche zusätzlich in räumlicher Nähe zur Mutation, welche in dieser Arbeit behandelt wird, im *RPGR* liegen. Beide Mutationen wurden als wahrscheinliche pathogene Varianten gemäß den ACMG-Richtlinien eingestuft. Ihre genaue pathogene Wirkung muss jedoch noch weiter untersucht werden, insbesondere in populationsbasierten Studien, um ihre Bedeutung und Prävalenz in verschiedenen ethnischen Gruppen zu bestätigen. Dennoch ist dies ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung dieses Genbereichs in der Entwicklung von RP. (14)

Das Paper "Comprehensive Rare Variant Analysis via Whole-Genome Sequencing to Determine the Molecular Pathology of Inherited Retinal Disease" untersuchte die genetischen Ursachen von vererbten Netzhauterkrankungen (IRD) durch die Analyse seltener Varianten mittels Ganzgenomsequenzierung (WGS). In der Studie wurde ebenfalls das *RPGR*-Gen untersucht und 13 pathogene Varianten im *RPGR*-Gen identifiziert, von denen viele in der ORF15-Region lokalisiert sind. Die Studie betonte die Bedeutung der WGS zur Verbesserung der Detektionsrate in diesen schwierigen Bereichen. Allerdings wurde für die spezifische Analyse der stark repetitiven Regionen des *RPGR*-Gens, insbesondere der ORF15-Region, eine speziell optimierte Sanger-Sequenzierung eingesetzt. (4)

Dadurch konnte die Variante (*RPGR*):c.1859_1860delAG (p.Lys620Argfs*9) identifiziert werden. Allerdings war die spezifische Variante nur in den Supplementary Materials der Excel Tabelle mmc2.xlsx zu finden. Die Variante wurde mittels Whole-Genome Sequencing (WGS) identifiziert und mit dem Phänotyp Retinitis Pigmentosa (RP) assoziiert, welcher bei einer weiblichen Probandin mit europäischer Ethnizität gefunden wurde. Die Variante im *RPGR*-Gen ist eine frameshift-Mutation (ENST00000378505.2:c.1894_1897delGACA), die zu einer Änderung auf Proteinebene (p.Asp632LysfsTer4) führt. (4)

Der Abgleich der angegebenen „ENST00000378505.2“ Transkript-ID mit der Ensembl-Datenbank zeigte, dass es sich um ein Transkript des Retinitis Pigmentosa GTPase Regulators (*RPGR*) handelt. Dieses Transkript besteht aus 15 Exons und ist auch Mitglied des Human CCDS Sets: „CCDS35229“. Der Report aus der CCDS-Datenbank für CCDS35229.1 (aktuelle Version) zeigte, dass es sich laut NCBI um das für diese Arbeit relevante Transkript NM_001034853.2 handelt. Auch die CCDS Sequenzdaten und die Nukleotidsequenz wurden überprüft und enthalten die Indel-Region (AAAAAGAGGAGGGAGGG), welche für die Variante dieser Arbeit NM_001034853.2(*RPGR*):c.2420_2435del (p.Glu807Glyfs*3) relevant ist.

In den Supplementary Materials der Excel Tabelle mmc2.xlsx des Papers von Carss et al., 2017 konnten noch 12 weitere Varianten, die mit der Transkript-ID ENST00000378505.2 aufgelistet sind, gefunden werden (Tabelle 17). Alle liegen im *RPGR*-Gen und folglich auch laut CCDS-Datenbank auf dem Transkript NM_001034853.2. Zehn der zwölf Varianten sind mit dem Phänotyp Retinitis Pigmentosa (RP) assoziiert, sowie eine mit congenital stationary night blindness (CSNB) und eine mit Makuladystrophie (MD).

Tabelle 17: Auszug aus den Supplementary Materials der Excel Tabelle mmc2.xlsx des Papers von Carss et al., (2017) bzgl. relevanter Mutationen des *RPGR*-Gens

Nr.	Method	Phenotype	Sex	Gene	Variant_genomic	Variant_HGVSc	Variant_HGVSp	CSQ
1	WES	RP	M	<i>RPGR</i>	X:38182680A>C	ENST00000378505.2:c.126T>G	p.Cys42Trp	missense
2	WES	RP	M	<i>RPGR</i>	X:38145927CCT>C	ENST00000378505.2:c.2323_2324delAG	p.Arg775GlyfsTer59	frameshift
3	WES	RP	M	<i>RPGR</i>	X:38146014TTC>T	ENST00000378505.2:c.2236_2237delGA	p.Glu746ArgfsTer23	frameshift
4	WES	RP	M	<i>RPGR</i>	X:38163907A>AT	ENST00000378505.2:c.914dupA	p.Asn305LysfsTer41	frameshift
5	WES	RP	M	<i>RPGR</i>	X:38146000TTC>T	ENST00000378505.2:c.2250_2251delGA	p.Lys751GlyfsTer18	frameshift
6	WGS	CSNB	M	<i>RPGR</i>	X:38170012AT>A	ENST00000378505.2:c.633delA	p.Tyr212MetfsTer11	frameshift
7	WGS	MD	M	<i>RPGR</i>	X:38144799C>A	ENST00000378505.2:c.3453G>T	p.Leu1151Phe	missense

8	WGS	RP	M	<i>RPGR</i>	X:38164046G>T	ENST00000378505.2:c.779-3C>A	NA	splice_region
9	WGS	RP	F	<i>RPGR</i>	X:38146354TTGTC>T	ENST00000378505.2:c.1894_1897delGACA	p.Asp632LysfsTer4	frameshift
10	WGS	RP	M	<i>RPGR</i>	X:38156557AG>A	ENST00000378505.2:c.1393delC	p.Leu465SerfsTer11	frameshift
11	WGS	RP	M	<i>RPGR</i>	X:38158217T>A	ENST00000378505.2:c.1237A>T	p.Arg413Ter	stop_gained
12	WGS	RP	M	<i>RPGR</i>	X:38156577ACT>A	ENST00000378505.2:c.1372_1373delAG	p.Ser458CysfsTer4	frameshift
13	WGS	RP	M	<i>RPGR</i>	X:38150723C>A	ENST00000378505.2:c.1429G>T	p.Glu477Ter	stop_gained

Von besonderem Interesse sind die Proben Nr. 2, Nr. 3 und Nr. 12 lt. Tabelle 17, da diese bereits mit weiteren Studien assoziiert werden konnten. Die Varianten Nr. 2 & Nr.12 wurden in der Arbeit von Breuer et al. (2002) Paper "A Comprehensive Mutation Analysis of *RP2* and *RPGR* in a North American Cohort of Families with X-Linked Retinitis Pigmentosa" genannt und Variante Nr. 3, welche ebenfalls mit RP in Verbindung gebracht wird, konnte in dem von Carss et al. (2017) behandelten Paper, mit einer Studie von Vervoort et al. (2000) mit dem Titel „Mutational hot spot within a new *RPGR* exon in X-linked retinitis pigmentosa“, die im Jahr 2000 in Nature Genetics veröffentlicht wurde, in Verbindung gebracht werden, in welcher Mutationshotspots innerhalb eines neuen Exons des *RPGR*-Gens bei X-chromosomaler Retinitis pigmentosa untersucht. (4,20,21)

Eine weitere Variante, c.1859_1860delAG auf dem Transkript NM-ID NM_001034853.1 wurde im Paper "Extensive genic and allelic heterogeneity underlying inherited retinal dystrophies in Mexican patients molecularly analyzed by next-generation sequencing" als neuartige pathogene Veränderung beschrieben. Der Genotyp ist hemizygot und die cDNA-Veränderung lautet c.1859_1860delAG, was zu einer Proteinveränderung von p.Lys620ArgfsTer9 führt. Auch diese Variante wurde als ursächlich für eine X-chromosomal rezessive Retinitis Pigmentosa (XLRP) identifiziert. (22)

Obwohl beide Varianten große Abstände innerhalb ihrer Lokalisation auf demselben Exon des *RPGR*-Gens aufweisen, ist die Assoziation mit RP bei der Mutation c.1859_1860delAG dennoch ein Hinweis für die mögliche Pathogenität von Mutationen in diesem Exon.

Das Paper "The Spectrum of Structural and Functional Abnormalities in Female Carriers of Pathogenic Variants in the *RPGR* Gene" untersuchte das klinische Erschei-

nungsbild und den langfristigen Verlauf bei weiblichen Trägerinnen von *RPGR*-Mutationen. Die Studie umfasste 125 heterozygote Trägerinnen von *RPGR*-Mutationen aus 49 Familien und beschreibt eine Vielzahl von strukturellen und funktionellen Abnormalitäten. Die komplette Expression des RP- oder CORD-Phänotyps wurde bei 23 % der Trägerinnen beobachtet, meist in milderer Form als bei betroffenen männlichen Verwandten. (23)

Die Mutation AGGAG⁵⁹⁰AAGGAaggaGCAGAGGATT (c. 1773_1776delAGGA, p.(Gly592Glnfs*9), welche in dieser Studie über die HGMD-Suche gefunden wurde, wird in der Tabelle "Supplementary Table S1" des Papers aufgeführt. Diese Mutation wird als krankheitsverursachende Mutation identifiziert, die mit Retinitis pigmentosa (RP) assoziiert ist. (23)

Die Variante c.1773_1776del AGGA im ORF15-Exon des *RPGR*-Gens führt zu einem Frameshift und resultiert in der Proteinveränderung p.(Gly592Glnfs*9). Diese spezifische Deletion wurde in einer weiblichen Trägerin beobachtet, die keine Symptome von Retinitis pigmentosa (RP) aufwies. Dennoch ist dies ein weiterer Hinweis, welcher die Hypothese stärkt, dass Mutationen im Exon 15 mit RP assoziiert werden. Das Fehlen klinischer Symptome trotz der genetischen Mutation bei Heterozygotie ist typisch für X-chromosomale Erkrankungen wie RP. (23)

Auch dass die in dieser Arbeit beschriebene Variante bereits in der Clinvar-Datenbank aufscheint und in der Publikation "The Importance of Automation in Genetic Diagnosis: Lessons from Analyzing an Inherited Retinal Degeneration Cohort with the Mendelian Analysis Toolkit (MATK)" von Zampaglione et al. in den Supplementary Materials erwähnt wurde, sowie die Tatsache, dass sie dort mit Retinitis pigmentosa und Pathogenität assoziiert wird, sind starke Hinweise, welche die Hypothese dieser Arbeit stützen.

Dennoch muss allgemein angemerkt werden, dass in den Supplementary Materials, aus welche die meisten der zuvor behandelten Varianten stammen, meist keine detaillierten klinischen Informationen über den betroffenen Patienten liefern. Es ist daher oft unklar, welche spezifischen Symptome oder welchen Schweregrad der Erkrankung dieser Patient aufweist.

6 Conclusio und Ausblick

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die durchgeführten Analysen und Datenbankrecherchen die mögliche Relevanz, der in dieser Arbeit identifizierten Frameshift-Mutation p.Glu807Glyfs*3 im *RPGR*-Gen bestärken. Es ist wahrscheinlich, dass die in dieser Arbeit identifizierte Mutation im Exon 15 des *RPGR*-Gens, trotz ihrer Lage in einer weniger konservierten Region, möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von Retinitis pigmentosa spielt. Darauf deutet die Häufigkeit ähnlicher Mutationen in der Literatur hin, welche beschreiben, dass Veränderungen in diesem Bereich des *RPGR*-Gens einen signifikanten Einfluss auf die Funktion des Proteins haben und zur Pathogenese von Retinitis pigmentosa (RP) beitragen können.

Um die genauen Auswirkungen der Mutation p.Glu807Glyfs*3 auf das RPGR-Protein und ihre Rolle bei der Entstehung der Retinitis pigmentosa in der untersuchten Familie zu verstehen, sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Zukünftige Forschungen sollten sich auf die funktionellen Auswirkungen der Frameshift-Mutation p.Glu807Glyfs*3 und ähnlicher Mutationen im *RPGR*-Gen konzentrieren. Insbesondere könnten funktionelle Studien, welche die genauen Auswirkungen dieser Mutationen auf die Proteinstruktur und -funktion untersuchen, sinnvoll sein. Dazu könnten Zellkulturmodelle oder Tiermodelle eingesetzt werden, um die pathogenen Mechanismen besser zu verstehen.

Die Korrelation zwischen den genetischen Mutationen und dem klinischen Phänotyp sollte weiter erforscht werden. Langzeitstudien mit größeren Patientenkohorten könnten wertvolle Informationen über den Krankheitsverlauf und die Variabilität der Symptome liefern. Die Entwicklung und Erprobung von Therapien, die auf die Korrektur der spezifischen genetischen Veränderungen abzielen, könnten einen wichtigen Schritt zur Behandlung von RP darstellen.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Wandschichten des Auges; Mit Genehmigung der Georg Thieme Verlag KG, Lizenz: 5816370556963 (2).....	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung und Aufbau der Netzhaut im Randbereich der Fovea; Mit Genehmigung der Georg Thieme Verlag KG, Lizenz: 5816370556963 (2).....	3
Abbildung 3: Hinterer Pol der Netzhaut; Mit Genehmigung der Georg Thieme Verlag KG, Lizenz: 5816370556963 (2,24).....	3
Abbildung 4: Retinopathia pigmentosa, fortgeschrittenes Stadium.....	8
Abbildung 5: Unauffälliger Fundus (Fundusbild eines Patienten mit Retinopathia); Mit Genehmigung des Springer Verlags, Lizenz: 5815971439645 (1).....	9
Abbildung 6: Auffälliger Fundus (Autofluoreszenzbild des Fundus eines Patienten mit Retinopathia pigmentosa sine pigmento) mit korniger Pigmentierung des Pigmentepithels der mittleren Netzhautperipherie; Mit Genehmigung des Springer Verlags, Lizenz: 5815971439645 (1).....	9
Abbildung 7: Auszug aus Ensembl.org RPGR Transkript NM_001034853.1, Exons: 15, Coding exons: 15.....	10
Abbildung 8: Schematische Darstellung der wichtigsten RPGR-Protein-Isoformen (konstitutives RPGR Ex1-19 und RPGRORF15) (7).....	11
Abbildung 9: 100 bp DNA Ladder von invitrogen by Thermo Fisher Scientific (0,5µg/µl) (For Research Use Only).....	18
Abbildung 10: Vollständige Sequenz RPGR-Gen Exon 15, Genom Browser der Online-Datenbank UCSC.....	19
Abbildung 11: Eingegrenzter Bereich des Exon 15 (RPGR) für das Primerdesign. ...	20
Abbildung 12: Darstellung des finalen Primer-Designs Primer3web Version 4.1.0... ..	21
Abbildung 13: Stammbaum Familie OPH48 nach handschriftlicher Vorlage. (erstellt mit CeGaT).....	37
Abbildung 14: 100 bp DNA Ladder von invitrogen by Thermo Fisher Scientific (0,5µg/µl) (For Research Use Only).....	39
Abbildung 15: Bildbeschreibung: Ergebnisse der Quality-Check-PCR aller OPH48-Proben auf 1,5 % Agarosegel.	39
Abbildung 16: Darstellung der Mutation/Deletion (gelb) c.2420_2435del (p.Glu807Glyfs*3) des RPGR-Gens im UCSC Genome Browser (GRCh38/hg38) ..	44
Abbildung 17: Ansicht der Reads um die Mutationsregion (rot) von c.2420_2435del des RPGR-Gens des Datensatzes des WES OPH48-2 (orange) sowie eines Kontrolldatensatzes (grün).....	45
Abbildung 18: Gelelektrophorese der Gradienten-PCR mit und ohne DMSO.....	46
Abbildung 19: Gelelektrophorese der Amplifikationsprodukte der OPH48-Proben mit den designten Primern.....	47
Abbildung 20: Qualitätswerte der gesamten Sequenz der laborinternen Test-DNA (Forward).....	49
Abbildung 21: Elektropherogramm der laborinternen Test-DNA (Forward).....	50
Abbildung 22: Qualitätswerte der gesamten Sequenz der laborinternen Test-DNA (Reverse).....	50
Abbildung 23: Elektropherogramm der laborinternen Test-DNA (Reverse) Erkennungsregion vor Mutationsregion	50

Abbildung 24: Elektropherogramm der laborinternen Test-DNA (Reverse) Mutationsregion	51
Abbildung 25:Qualitätswerte der gesamten Sequenz der Probe OPH48-1	52
Abbildung 26: Elektropherogramm der Probe OPH48-1.....	52
Abbildung 27: Qualitätswerte der gesamten Sequenz der Probe OPH48-3	53
Abbildung 28: Elektropherogramm der Probe OPH48-3.....	53
Abbildung 29: Qualitätswerte der gesamten Sequenz der Probe OPH48-4	54
Abbildung 30: Elektropherogramm der Probe OPH48-4.....	54
Abbildung 31: Qualitätswerte der gesamten Sequenz der Probe OPH48-5	55
Abbildung 32: Elektropherogramm der Probe OPH48-5.....	55
Abbildung 33: Qualitätswerte der gesamten Sequenz der Probe OPH48-6	57
Abbildung 34: Elektropherogramm der Probe OPH48-6.....	57
Abbildung 35: Qualitätswerte der gesamten Sequenz der Probe OPH48-8 (2µl DNA)	58
Abbildung 36 :Elektropherogramm der Probe OPH48-8 (2µl DNA).....	58
Abbildung 37: Qualitätswerte der gesamten Sequenz der Probe OPH48-9	60
Abbildung 38: Elektropherogramm der Probe OPH48-9.....	60
Abbildung 39: Qualitätswerte der gesamten Sequenz der Probe OPH48-10	61
Abbildung 40: Elektropherogramm der Probe OPH48-10.....	61
Abbildung 41: Qualitätswerte der gesamten Sequenz der Probe OPH48-11.....	62
Abbildung 42: Elektropherogramm der Probe OPH48-11	62
Abbildung 43: Ausschnitt aus UCSC Genome Browser; Konservierung der Exone: Exon 15 (1), Exon 14 (2), Exon 13 (3), Exon 12 (4) des RPGR-Gens in unterschiedlichen Spezies	65
Abbildung 44: Genexpression im Gewebe von RPGR (ENSG00000156313.12)	66
Abbildung 45: Exon Expression inklusive Gewebetypen und Isoformen von RPGR.	67
Abbildung 46: Aktualisierter Stammbaum Familie OPH48 nach Sanger- Sequenzierung. (erstellt mit CeGaT)	68
Abbildung 47: Auszug aus USCS Genome Browser; Darstellung der Variante NM_001034853.2(RPGR):c.2405_2406del (p.Glu802Glyfs*32) gelb markiert (rechts); Darstellung der Variante NM_001034853.2(RPGR):c.2420_2435del (p.Glu807Glyfs*3) gelb markiert (links).....	75
Abbildung 48: Auszug aus USCS Genome Browser (Hg19); Darstellung der Variante NM_001034853.2(RPGR):c.3027_3028del (p.Glu1010Glyfs*68). gelb und rot markiert (links); Darstellung der Variante NM_001034853.2(RPGR):c.2420_2435del (p.Glu807Glyfs*3) gelb markiert (rechts)	76
Abbildung 49: Auszug aus USCS Genome Browser; Darstellung der Variante NM_001034853.2(RPGR):c.2426_2427del (p.Glu809fs)	76
Abbildung 50: Auszug aus USCS Genome Browser; Darstellung der Variante NM_001034853.2(RPGR):c.2426_2427del (p.Glu809fs) (gelb markiert, rot markiert), Darstellung der Variante NM_001034853.2(RPGR):c.2420_2435del (p.Glu807Glyfs*3) (gelb markiert)	77

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: DNA-Ratio der extrahierten DNA der Proben von Familie OPH48	16
Tabelle 2: Auf molekularanalytische Eignung getestete Proben der Familie OPH48	17
Tabelle 3: Reaktionsansatz Mastermix (25µl) Quality-Check-PCR.....	17
Tabelle 4: Reaktionsansatz Mastermix Gradienten PCR (25µl):	23
Tabelle 5: Reaktionsansatz Mastermix Gradienten PCR (25µl) mit DMSO für GC-reiche Sequenzbereiche:	24
Tabelle 6: Reaktionsansatz Mastermix PCR vor Sanger-Sequenzierung (25µl):	25
Tabelle 7: Alternativer Reaktionsansatz Mastermix PCR vor Sanger-Sequenzierung bei schlechter Probenqualität (25µl):	26
Tabelle 8: Reaktionsansatz Sanger-Sequenzierung*.....	27
Tabelle 9: Auflistung aller verwendeten Geräte.....	32
Tabelle 10: Auflistung aller verwendeten Verbrauchsmaterialien	33
Tabelle 11: Auflistung aller Reagenzien	33
Tabelle 12: Auflistung aller verwendeten Programme, Datenbanken und Web-Tools	36
Tabelle 13: Allelgegenüberstellung OPH48-8	58
Tabelle 14: IUPAC-Nomenklatursystem für nukleotidische Mehrdeutigkeit.....	59
Tabelle 15: Allelgegenüberstellung OPH48-11	63
Tabelle 16: IUPAC-Nomenklatursystem für nukleotidische Mehrdeutigkeit.....	63
Tabelle 17: Auszug aus den Supplementary Materials der Excel Tabelle mmc2.xlsx des Papers von Carss et al., (2017) bzgl. relevanter Mutationen des RPGR-Gens .	79

9 Literaturverzeichnis

1. Grehn F. Augenheilkunde [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019. Verfügbar unter: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-59154-3>.
2. Schwegler JS, Lucius R. Der Mensch – Anatomie und Physiologie [Internet]. 7. Auflage. Schwegler J, Lucius R, Herausgeber. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2022. Verfügbar unter: <https://eref.thieme.de/10.1055/b000000421>
3. Passarge Eberhard, Wirth J. Taschenatlas Humangenetik. Thieme; 2008.
4. Carss K, Arno G, Erwood M, Stephens J, Sanchis-Juan A, Hull S, u. a. Comprehensive Rare Variant Analysis via Whole-Genome Sequencing to Determine the Molecular Pathology of Inherited Retinal Disease. *Am J Hum Genet.* 5. Jänner 2017;100(1):75–90.
5. Christelle M, Lise M, Ben M'Barek K. Challenges of cell therapies for retinal diseases. *Int Rev Neurobiol.* 1. Jänner 2022;166:49–77.
6. Murken J 1934. Taschenlehrbuch Humangenetik [Internet]. Murken J, Grimm T, Holinski-Feder E, Zerres K, Herausgeber. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2017. Verfügbar unter: <https://eref.thieme.de/10.1055/b-005-143305>

7. Megaw RD, Soares DC, Wright AF. RPGR: Its role in photoreceptor physiology, human disease, and future therapies. *Exp Eye Res.* 4. Juli 2015;138:32–41.
8. Pantrangi M, Rath J, Kaetterhenry N, Branham K, Talsness D, Weber JL. Clinical sequencing of the retinitis pigmentosa gene RPGR in over 1,000 cases of vision loss. *Mol Vis [Internet].* 19. Februar 2024 [zitiert 21. Juni 2024];30:49–57. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/38586605>
9. Weisschuh N, Mazzola P, Zuleger T, Schaeferhoff K, Kühlewein L, Kortüm F, u. a. Diagnostic genome sequencing improves diagnostic yield: a prospective single-centre study in 1000 patients with inherited eye diseases. *J Med Genet.* 2023.
10. Kent WJ. BLAT —The BLAST -Like Alignment Tool . *Genome Res.* 1. April 2002;12(4):656–64.
11. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, u. a. Integrative genomics viewer. Bd. 29, *Nature Biotechnology.* 2011.
12. Zampaglione E, Maher M, Place EM, Wagner NE, DiTroia S, Chao KR, u. a. The importance of automation in genetic diagnosis: Lessons from analyzing an inherited retinal degeneration cohort with the Mendelian Analysis Toolkit (MATK). *Genetics in Medicine.* 1. Februar 2022;24(2).
13. Wongchaisuwat N, Amato A, Lamborn AE, Yang P, Everett L, Pennesi ME. Retinitis pigmentosa GTPase regulator-related retinopathy and gene therapy. *Saudi Journal of Ophthalmology [Internet].* 2023 [zitiert 10. Juni 2024];37(4):276–86. Verfügbar unter: https://journals.lww.com/10.4103/sjopt.sjopt_168_23
14. Numa S, Oishi A, Higasa K, Oishi M, Miyata M, Hasegawa T, u. a. EYS is a major gene involved in retinitis pigmentosa in Japan: genetic landscapes revealed by stepwise genetic screening. *Sci Rep.* 1. Dezember 2020;10(1).
15. Eisenberger T, Neuhaus C, Khan AO, Decker C, Preising MN, Friedburg C, u. a. Increasing the yield in targeted next-generation sequencing by implicating CNV analysis, non-coding exons and the overall variant load: The example of retinal dystrophies. *PLoS One.* 12. November 2013;8(11).
16. Tuupanen S, Gall K, Sistonen J, Saarinen I, Kämpjärvi K, Wells K, u. a. Prevalence of RPGR-Mediated Retinal Dystrophy in an Unselected Cohort of Over 5000 Patients. *Transl Vis Sci Technol.* 1. Jänner 2022;11(1).
17. Tosco-Herrera E, Muñoz-Barrera A, Jáspez D, Rubio-Rodríguez LA, Mendoza-Alvarez A, Rodríguez-Perez H, u. a. Evaluation of a whole-exome sequencing pipeline and benchmarking of causal germline variant prioritizers. *Hum Mutat.* 1. Dezember 2022;43(12):2010–20.
18. Panneman DM, Hitti-Malin RJ, Holtes LK, de Bruijn SE, Reurink J, Boonen EGM, u. a. Cost-effective sequence analysis of 113 genes in 1,192 probands with retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis. *Front Cell Dev Biol.* 3. Februar 2023;11.

19. Maggi J, Koller S, Bähr L, Feil S, Pfiffner FK, Hanson JVM, u. a. Long-range pcr-based ngs applications to diagnose mendelian retinal diseases. *Int J Mol Sci.* 2. Februar 2021;22(4):1–34.
20. Vervoort R, Lennon A, Bird AC, Tulloch B, Axton R, Miano MG, u. a. Mutational hot spot within a new RPGR exon in X-linked retinitis pigmentosa. *Nat Genet* [Internet]. August 2000;25(4):462–6. Verfügbar unter: https://www.nature.com/articles/ng0800_462
21. Breuer DK, Yashar BM, Filippova E, Hiriyanna S, Lyons RH, Mears AJ, u. a. A Comprehensive Mutation Analysis of RP2 and RPGR in a North American Cohort of Families with X-Linked Retinitis Pigmentosa. Bd. 70, *Foundation of the Southwest.* 2002.
22. Zenteno JC, García-Montaña LA, Cruz-Aguilar M, Ronquillo J, Rodas-Serrano A, Aguilar-Castul L, u. a. Extensive genic and allelic heterogeneity underlying inherited retinal dystrophies in Mexican patients molecularly analyzed by next-generation sequencing. *Mol Genet Genomic Med.* 1. Jänner 2020;8(1).
23. Talib M, van Schooneveld MJ, Van Cauwenbergh C, Wijnholds J, Ten Brink JB, Florijn RJ, u. a. The spectrum of structural and functional abnormalities in female carriers of pathogenic variants in the RPGR gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1. August 2018;59(10):4123–33.
24. Füeßl HS, Middeke M, Würtemberger G. Anamnese und Klinische Untersuchung [Internet]. Füeßl H, Middeke M, Würtemberger, Herausgeber. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2018. Verfügbar unter: <https://eref.thieme.de/10.1055/b-006-149437>

10 Abkürzungsverzeichnis

AA	Aminosäure
AD	Autosomal Dominant
AR	Autosomal Rezessiv
ACMG	American College of Medical Genetics and Genomics
BLAT	BLAST-Like Alignment Tool
bp	base pairs
cDNA	komplementäre DNA
CNV	Copy Number Variation
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dsDNA	doppelsträngige DNA
dsRNA	doppelsträngige RNA
dNTP	deoxynucleotide triphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Ex	Exon
g	Erdschwerebeschleunigung/Gramm

GRCh38	Genome Reference Consortium Human Build 38
HCl	Salzsäure
HGMD	Human Gene Mutation Database
HGVS	Human Genome Variation Society
HPO	Human Phenotype Ontology
IGV	Integrative Genomics Viewer
Indel	Insertion oder Deletion
IRDs	inherited retinal diseases/erbliche Netzhauterkrankungen
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
kb	Kilobase
LAMA2	Laminin subunit alpha 2
LP	Likely Pathogenic
MATK	Mendelian Analysis Toolkit
MgCl ₂	Magnesium Chloride
ml	Milliliter
min	Minute
mRNA	Messenger RNA
NTC	Non-template Control
NaCl	Natriumchlorid
NGS	Next-Generation Sequencing
ORF	Open Reading Frame
ORF15	Open Reading Frame 15
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RP	Retinitis pigmentosa
RPGR	Retinitis pigmentosa GTPase Regulator
R. Temp	Raumtemperatur
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
sec	Sekunde
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TBE	Tris/Borate/EDTA
TE	Tris-EDTA
TM	Melting Temperature / Schmelztemperatur
UCSC	University of California, Santa Cruz
UTR	Untranslated Region (untranslatierte Region)
WES	Whole-Exome-Sequencing
XLR	X-Linked Recessive
XLRP	X-linked Retinitis pigmentosa
°C	Grad Celsius
μl	microliter