

Masterarbeit

**Charakterisierung einer konsanguinen Familie mit einer
hereditären Form von Nachtblindheit**

(Characterization of a consanguineous family with a hereditary form of
night blindness)

eingereicht von

Aleksandra Maria Sittinger 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. Dr. Christian Windpassinger

Graz, 30. Juni 2017

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.

Genderhinweis

Zur besseren Lesbarkeit wird auf eine „politisch korrekte“ Schreibweise verzichtet und nur die (vermeintlich) maskuline Form verwendet. Selbstverständlich richten sich die Inhalte auch an alle Personen weiblichen Geschlechts.

1 Vorwort

Was überaus fasziniert, ist wie komplex das Auge aufgebaut ist. Die Vollkommenheit ist es, die es uns so schwer macht es nachzuvollziehen. Darwin machte schon damals darauf aufmerksam, dass die Evolution von komplexen Organen durch graduelle Selektion eine Herausforderung für unsere Vorstellungskraft und nicht für unseren Verstand ist (Zrzavy, Evolution, Ein Lese-Lehrbuch).

Aus diesem Grund möchte ich diese Arbeit, den Augen und deren Erkrankungen widmen, weil sie ohne Zweifel zu den wichtigsten Sinnesorganen überhaupt zählen.

2 Danksagung

Zu aller erst möchte ich mich herzlichst bei meinem Betreuer Prof. Christian Windpassinger bedanken.

Er hat mir dieses spannende Thema für meine Arbeit vorgeschlagen und zu gleich *meine Augen* zu dieser Thematik geöffnet.

Ebenfalls möchte ich Ihm für seine Geduld und die unzähligen guten Ratschläge danken!

Dem gesamten Institut der Humangenetik, insbesondere Prof. Erwin Petek, für den Arbeitsplatz am Institut und die gesamte Anteilnahme.

Katharina Theresa Gehmacher möchte ich ebenfalls danken. Ihre vorangegangene Arbeit schuf ein solides Fundament für mein Thema.

Meinem liebevollen Ehemann Robert, möchte ich ebenfalls vom Herzen danken. Für seine Unterstützung und motivierenden Worte!
Ohne Ihn wäre dieses Studium nicht möglich.

Einen letzten Dank möchte ich an meine Familie richten, die immer hinter mir steht und mich zu dem Menschen macht der ich bin.

Danke!

3 Inhaltsverzeichnis

1	VORWORT	3
2	DANKSAGUNG	4
3	INHALTSVERZEICHNIS	5
4	ABKÜRZUNGEN UND DEREN ERKLÄRUNG	8
5	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	9
6	TABELLENVERZEICHNIS	10
7	ZUSAMMENFASSUNG	11
8	ABSTRACT	13
9	EINLEITUNG	14
9.1	Die Evolution der Augen	14
9.2	Das Auge und der Sehsinn	15
9.2.1	Die Anatomie des Auges und seine Funktion	16
9.2.2	Retina (Netzhaut)	17
9.2.3	Signaltransduktion	21
9.2.4	Ionenkanäle	21
9.2.5	Bipolare Zellen	23
9.2.6	Vererbare Netzhautdystrophien	24
10	KONGENITALE STATIONÄRE NACHTBLINDHEIT (CSNB)	26
11	TRPM1 GEN	28
11.1	Funktion des TRPM1 und seine Mutationen	29
12	REZESSIVE ERBKRAKHEITEN	31

12.1	Homozygotie	31
12.2	Rezessive Vererbung	31
12.3	Konsanguinität	32
13	FALLBESCHREIBUNG	34
13.1	Stammbaum der Familie NB1	35
13.2	Vorhergehende Mutationsanalysen der Familie NB1	35
13.2.1	Homozygotie-Mapping	37
13.2.2	Suche nach Kandidatengenen	40
13.2.3	Exom-Sequenzierung der NB1-Familie	40
13.2.4	Sanger Sequenzierung	43
13.3	Ziel dieser Arbeit	43
14	MATERIAL UND METHODEN	45
14.1	Primer Design	45
14.1.1	Primer für das Exon 4 des TRPM1-Gens:	46
14.1.2	Primer für das Exon 12 des TRPM1-Gens:	46
14.2	Primer Vorbereitung	47
14.3	DNA-Quantifizierung	48
14.4	Polymerase Chain Reaktion (PCR)	49
14.4.1	PCR-Ansatz:	50
14.5	Gelelektrophorese	51
14.6	Sanger-Sequenzierung	53
14.7	DNA-Sequenzierung	53
14.7.1	Size Exclusion Chromatographie (Gel-Filtration)	54
14.8	Sequenzier-Lauf und Auswertung	56
14.9	Segregationsanalyse	56

15	ERGEBNISSE	58
15.1	Segregation der Mutation im Exon 4 Des TRPM1 Gens; c.215 A>G	58
15.2	Segregation der Mutation im Exon 12 Des TRPM1 Gens, c.1450G>A	61
15.3	Stammbaum nach der Segregationsanalyse	62
16	DISKUSSION	63
17	LITERATURVERZEICHNIS	67
17.1	Internetverzeichnis	75
17.2	Bücher	76
18	ANHANG	77

4 Abkürzungen und deren Erklärung

bp	Basenpaare
Ca ²⁺	Calcium
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CSNB	Congenitale Stationäre Nachtblindheit
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-Triphosphate
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphate
E	Exon
ERG	Elektroretinographie
HGMD	Human Gene Mutation Database
KB	Kilobasen
LCA	Lebersche kongenitale Amaurose
LOH	Loss of Heterozygosity
MM	Master Mix
mGluR6	metabotropic glutamate receptor 6
MITF	Microphthalmia associated transcription factor
Na ⁺	Natrium
NB1	Probenbezeichnung der betroffenen Familie
N.opticus	Nervus opticus
NGS	Next-Generation-Sequencing
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDE6G	Retinal rod rhodopsin-sensitive cGMP 3',5'-cyclic phosphodiesterase subunit gamma
RP1	Retinitis pigmentosa member 1
SNP	single nucleotide polymorphism
T _m	Schmelztemperatur
TRP	transient receptor potential channel
TRPM1	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 1
WT	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem

5 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Menschliches Auge	15
Abbildung 2: Aufbau des Auges.....	16
Abbildung 3: Aufbau der Retina	18
Abbildung 4: Gene für retinale Erkrankungen	24
Abbildung 5: TRPM1 Gen-Expression	28
Abbildung 6: Autosomal-rezessiver Erbgang	32
Abbildung 7: Konsanguinität Global	33
Abbildung 8: Stammbaum der Familie NB1	35
Abbildung 9: SNP-Array von NB1-3 und NB1-7	37
Abbildung 10: Snp-Analyse von NB1-3 und NB1-7.....	39
Abbildung 11: Fotos nach Gel-Elektrophorese.....	52
Abbildung 12: Gelfilterung.....	55
Abbildung 13: Mutation c.332A>G, UCSC-Genombrowser	58
Abbildung 14: DNA Sequenz Exon 4, linke Stammbaumhälfte.....	59
Abbildung 15: DNA Sequenz Exon 4, rechte Stammbaumhälfte	60
Abbildung 16: DNA Sequenz Exon 12, rechte Stammbaumhälfte	61
Abbildung 17: Stammbaum nach der Segregationsanalyse	62

6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gene für rezessive Form von CSNB.....	27
Tabelle 2: Gemeinsame Homozygote Bereiche von NB1-3 und 4.....	38
Tabelle 3: Varianten nach der Filterung, Suche nach Kandidatengenomen	42
Tabelle 4: Primer Aufbereitung	47
Tabelle 5: DNA Konzentrationen.....	48
Tabelle 6: Temperatur und Zyklusdauer im Thermocycler	50
Tabelle 7: PCR-Ansatz	50
Tabelle 8: Herrstellen eines agarose-Gels	51
Tabelle 9: Sanger- Sequenzierung, Reaktionsansatz.....	53
Tabelle 10: Temperatur und Zyklusdauer, Sequenzierungs-Ansatz	54

7 Zusammenfassung

Die visuelle Wahrnehmung gehört zu den wichtigsten Sinnen des Menschen. Sie ist die Fähigkeit Informationen aus der Umgebung aufzunehmen und zu interpretieren. Das Auge ist ein kleines aber komplex aufgebautes Organ, welches durch seine vielfältigen Perzeptionsmöglichkeiten fasziniert.

Deshalb beeinträchtigen insbesondere Augenerkrankungen in vielen Fällen ein normales Leben.

Die Segregation von visuellen Signalen der ON- und OFF-

Signaltransduktionswege retinaler Bipolarzellen ist ein wichtiger Schritt in der visuellen Verarbeitung. Störungen in der Signaltransduktion können zu verschiedenen Sehstörungen, wie zum Beispiel die kongenitale stationäre Nachtblindheit (CSNB) führen. Diese Arbeit beschreibt eine konsanguine Familie, deren vier Mitglieder von der autosomal-rezessiven Form der CSNB betroffen sind. CSNB ist eine klinisch und genetisch heterogene Gruppe nicht-progressiver Netzhautstörungen zu deren Symptomen beeinträchtigte Nachtsicht zählt.

Eine in einem Vorprojekt durchgeführte „Whole Exome“ - Sequenzierung, gefolgt von Filterungsstrategien, führte zur Identifikation einer potenziell kausalen Missense-Mutation in Exon 4 des *TRPM1* Gens. TRPM1 ist ein essentieller Faktor zur lichtinduzierten Depolarisation der On-Zellen der Retina und ist eine Komponente des Kationenkanals. Durch weitere DNA-Analysen konnte eine bisher noch nicht im Zusammenhang mit CSNB beschriebene DNA-Variante in Exon 12 des *TRPM1*-Gens gefunden werden, welche im Zuge dieser Arbeit in einer Segregationsanalyse aller zur Verfügung stehender Familienmitglieder weiter analysiert wurden.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, beide spezifischen familiären Varianten im *TRPM1*-Gen genauer zu charakterisieren, um den kausalen Zusammenhang mit dem vorhandenen Phänotyp der betroffenen Familienmitglieder zu evaluieren. Die Ergebnisse der Sanger Sequenzierung beider Varianten zeigten, dass die bekannte Mutation in Exon 4 im linken Zweig des Stammbaums mit der Erkrankung segregiert. Im rechten Teil des Stammbaums konnte beim betroffenen Individuum NB1-7 eine Compound-Heterozygotie beider familiären Varianten festgestellt werdender. Anschließend wurde eine „Whole Exome“ - Sequenzierung

eines zuvor nicht erfassten Betroffenen (NB1-6) im besonderen Hinblick auf *TRPM1* durchgeführt. Das Analyseergebnis zeigte, dass dieses Individuum weder Träger der Variante am Exon 4, noch am Exon 12 ist. Da die Ergebnisse dieser Arbeit keine eindeutige Interpretation der möglichen Pathogenität beider Varianten zulassen, ist eine neuerliche klinische Evaluierung der vorliegenden Erkrankung und nachfolgend eine neuerliche Interpretation der Ergebnisse indiziert.

8 Abstract

Visual perception is one of the most important senses, the ability to interpret and to assimilate information from the environment.

The eye is a small but extremely complex organ and so fascinating because of so many working parts.

Eye diseases in particular can have a major impact on normal life.

Segregation of visual signals into ON and OFF pathways by retinal bipolar cells are an important step in visual processing.

Disorders in this essential signal transduction pathway can lead to several kinds of vision disorders, such as congenital stationary night blindness (CSNB).

This work describes a consanguineous family where four members are affected with the autosomal recessive form of CSNB.

CSNB is a clinically and genetically heterogeneous group of non-progressive retinal disorders with symptoms like impaired night vision.

A Whole Exome Sequencing approach followed by subsequent filtering strategies led to the identification of an already reported missense mutation within exon 4 of the gene *TRPM1* and a previously unclassified variant in exon 12 of *TRPM1*.

TRPM1 is necessary for the light induces depolarization of On bipolar cells and it is a component of the cation channel. Further variants of the *TRPM1* were found.

This work outlines in this context, segregation analysis of all available family members. The intention of this work is to define the specific causative mutation in the *TRPM1* gene explaining the clinical phenotype of the affected family members.

Sanger sequencing results of the 4th and 12th exon of *TRPM1* showed segregation of the known mutation in 4th exon with the disease in the left branch of the pedigree. The analysis of the right branch revealed a compound heterozygosity of both mutations in the affected individual NB1-7. Subsequently, a "Whole Exome" sequencing approach, specifically in view of *TRPM1* for a previously unanalyzed person (NB1-6) was carried out. The result of the analysis revealed that this individual is neither carrier of the mutation on the 4th nor the 12th exon. Since the genetic findings do not allow a clear interpretation of both variants with regard to their pathogenic potential, a reevaluation of the clinical findings in the affected individuals is strongly indicated.

9 Einleitung

Das Auge ist ein überaus wichtiges und unentbehrliches Sinnesorgan.

Es vermittelt uns eine Art Sicherheit, gibt eine Möglichkeit auf die Umwelt zu reagieren und mit ihr in Wechselwirkung zu treten.

Schon allein die evolutionäre Entstehung der Augen ist ein Diskussionswürdiges Thema.

9.1 Die Evolution der Augen

Die große Mehrheit aller Tierarten besitzen Augen. Dies ist ein eindeutiger Beweis für den hohen Stellenwert, den die Fähigkeit des Sehens und Gesehen werden einnimmt (Zrzavy et al. 2009).

Es gibt keine allgemeingültige Antwort auf die Frage, ob das Auge homolog oder konvergent im Laufe der Evolution entstanden ist.

Jedoch sprechen einige Theorien für eine konvergente Entstehung, wie zum Beispiel die graduelle und allmähliche Entstehung des Linsenauges.

Dieses Modell wurde anhand von Computerberechnungen entwickelt und geht von einer Ansammlung von differenzierten Haut und Nervenzellen aus.

Diese Zellen liegen zusammen in einer Gruppe von Lichtsinneszellen auf der Körperoberfläche und werden von der Innenseite durch eine Schicht pigmenthaltiger Zellen geborgen. Die obere Seite wird durch eine durchsichtige Schutzschicht umhüllt (Zrzavy et al. 2009).

Computersimulationen lassen vermuten, dass die Evolution der Augen mit einem dreischichtigen lichtempfindlichen Fleck begonnen haben könnte. Alle drei Schichten können unabhängig voneinander ihre räumliche Anordnung einnehmen und ändern. Dabei wurden die optischen Eigenschaften, wie etwa die Sehschärfe genau vermessen und selektiert. Nach relativ kurzer Zeit ergaben alle drei Schichten zusammen eine Hohlkugel mit einer schmalen Öffnung (Zrzavy et al. 2009).

Weitere Berechnungen optimieren die Linsenform, indem das Licht gebündelt an der Netzhaut gebrochen und ein scharfes Sehen ermöglicht wurde (Zrzavy et al. 2009).

Tatsächlich lassen sich diese Art von Augen bei den Mollusken (Weichtiere) finden. Es spricht nichts dagegen, dass das Wirbeltierauge auf eine ähnliche Weise entstanden ist (Zrzavy et al. 2009; aus dem Buch: „Evolution, ein Lese-Lehrbuch“).

9.2 Das Auge und der Sehsinn

Unser Sehsinn hat eine herausragende Bedeutung. Immerhin gehören 40% aller Leitungswege des Zentralnervensystems (ZNS) zur Sehleitung und der Großteil der Großhirnrinde zum visuellen System (angelehnt an das Buch Mensch, Körper, Krankheit, Renate Huch, Klaus D. Jürgens, 2015). In den Augen befinden sich über die Hälfte der sensorischen Rezeptoren des gesamten Körpers.



Was wir sehen:

- Hell/Dunkel
- Farben
- Räumliches Sehen
- Zeitliches Sehen

Abbildung 1: Menschliches Auge, Petr Novák, Wikipedia, lizenziert unter Creative Commons by-sa-2.5, URL:https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AEye_iris.jpg

Hell/Dunkel können wir dank spezialisierter Zellen, den Stäbchen wahrnehmen.

Farben werden durch Zapfen gesehen.

Die Tatsache, dass wir zwei Augen besitzen ermöglicht uns das räumliche Sehen sowie die Fähigkeit Entfernungen einzuschätzen.

Zeitliches Sehen ist darauf zurückzuführen, dass das menschliche Auge

ca. 15 Bilder/sec. wahrnehmen kann und das Gesehene in einem Kontext setzt.

9.2.1 Die Anatomie des Auges und seine Funktion

Der Augapfel (Globus Okuli) eines Erwachsenen Menschen ist nicht vollkommen rund und misst im Durchmesser $\sim 2,5$ cm.

Nur ein kleiner Teil des Auges, etwa $1/6$ seiner gesamten Oberfläche ist von außen zu sehen. Der Rest ist geschützt eingebettet in der Augenhöhle (Orbita), welche mit Fettgewebe umhüllt und von sechs äußeren Augenmuskeln umgeben ist (angelehnt an das Buch Mensch, Körper, Krankheit, Huch et al. 2015).

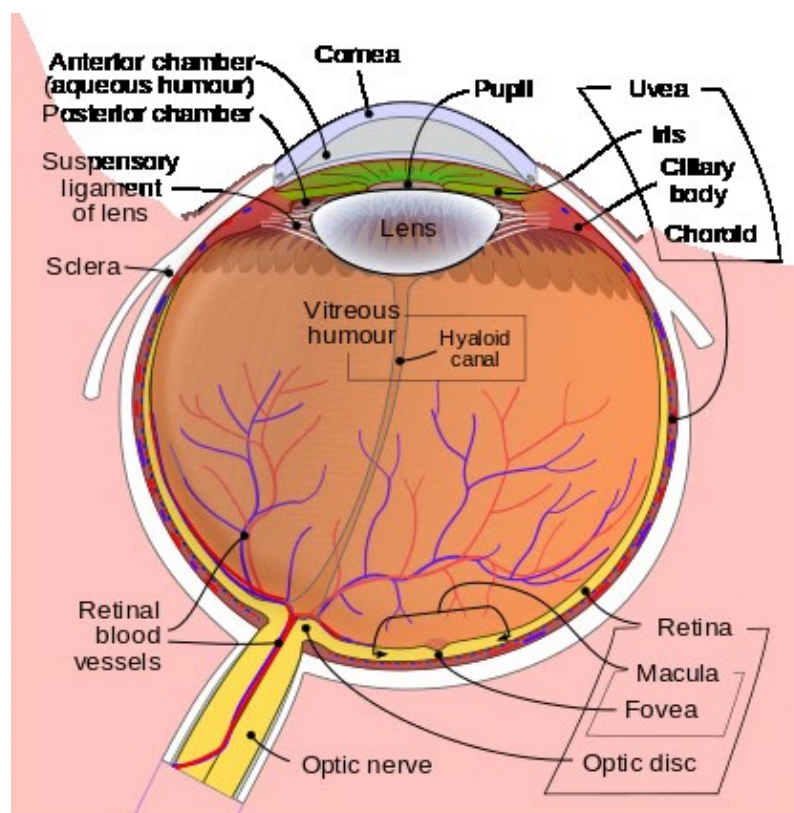


Abbildung 2: Aufbau des Auges; Public Domain,

URL: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/1e/Schematic_diagram_of_the_human_eye_en.svg

Die Augapfelwand wird in drei Schichten unterteilt (Buch: Anatomie und Physiologie, Tortora et al. 2008):

- Tunica conjunctiva

Sie ist die äußerste Schicht des Augapfels und besteht aus der Cornea und Sclera.

- Tunica interna bulbi

Diese mittlere Schicht des Augapfels wird auch Uvea genannt und besteht aus Choroidea, Corpus ciliare und der Iris.

Die Iris wird auch Regenbogenhaut genannt und ist der farbige Teil des Auges.

Sie reguliert die Lichtmenge, die durch die Pupille (Pupilla) in das Auge eindringt.

Die Pupille erscheint schwarz, da man auf den stark pigmentierten

Augenhintergrund (Choroidea und Retina) schaut. Autarke Reflexe auf die einfallenden Lichtintensitäten steuern den Pupillendurchmesser.

- Retina (Netzhaut)

Sie ist die innere Schicht des Augapfels und bildet den Anfang der Sehbahn.

Auf der Retina liegt der Hauptfokus dieser Arbeit.

Die Linse liegt innerhalb der Augenhöhle, hinter der Pupille und der Iris. Ihre

Aufgabe ist die Fokussierung von Bildern auf der Retina und ermöglicht dadurch ein scharfes Sehen.

9.2.2 Retina (Netzhaut)

Die Retina besteht aus zwei Schichten, der Pigmentschicht und der Neuralschicht.

Die Pigmentschicht besteht aus Melanin haltigen Epithelzellen, die zwischen der Choroidea und der Neuralschicht der Retina liegen.

Die Neuralschicht ist ein Ausläufer des Gehirns, der visuelle Impulse verarbeitet und sie weiter als ein Nervenreiz an Axone, die den N. opticus bilden sendet (Buch: Anatomie und Physiologie, Tortora et al. 2008).

Es gibt drei verschiedene Lagen retinaler Neuronen:

- Photorezeptorschicht
- Bipolarzellschicht
- Ganglienzellschicht

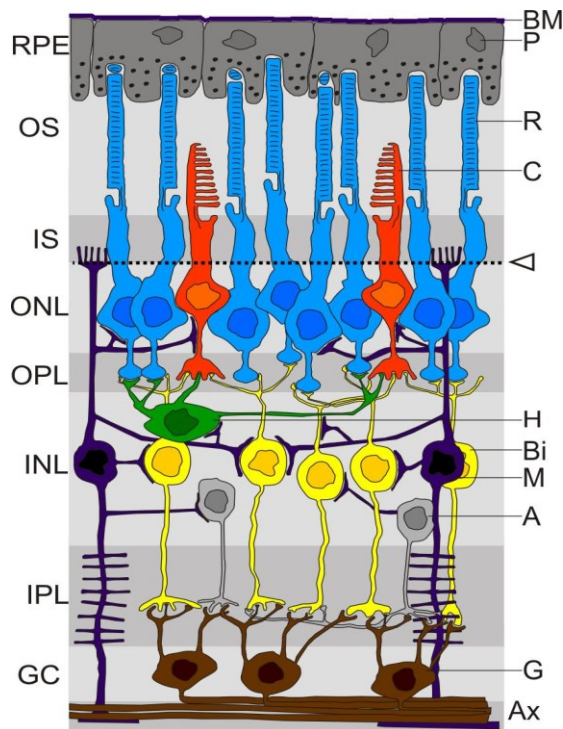


Abbildung 3 Aufbau der Retina; RPE: retinales Pigmentepithel, OS: Außensegmente der Photorezeptorzellen, IS: Innensegmente der Photorezeptorzellen, ONL: äußere nukleäre Schicht, OPL: äußere plexiforme Schicht, INL: innere nukleäre Schicht, IPL: innere plexiforme Schicht, GC: Ganglienzellschicht, P: Pigmentepithelzelle, BM: Bruch-Membran, R: Stäbchen, C: Zapfen, H: Horizontalzelle, B: Bipolarzelle, M: Müller-Zelle, A: Amakrine-Zelle, G: Ganglienzelle, AX: Axone, Pfeil: Membrane limitans externa; Hartpete, Wikipedia Commons, lizenziert unter Creative Commons by-sa-3,0, URL: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3ARetina.jpg>

Die Neuralschicht wird in eine innere und äußere plexiforme Schicht unterteilt. An diesen Stellen werden jeweils synaptische Kontakte gebildet (Abbildung 3).

Das Licht gelangt durch die Ganglienzellschicht über die Bipolarzellschicht und beide plexiformen Schichten zu der Photorezeptorschicht.

In der Bipolarzellschicht sind zwei weitere Zellarten, die Horizontalzellen und die amakrinen Zellen zu finden (Abbildung 3). Sie modifizieren Signale, die entlang der Sehbahn übertragen werden (angelehnt an das Buch „Anatomie und Physiologie, Tortora et al. 2008).

Es gibt zwei Typen von Photorezeptorzellen:

- Stäbchen
- Zapfen

Die Retina besitzt etwa 6 Millionen Zapfen und 120 Millionen Stäbchen.

Die Stäbchen ermöglichen das Sehen bei Dämmerlicht (schwachem Licht). Sie sind für das Hell/Dunkel wahrnehmen verantwortlich und sind etwa 20x lichtempfindlicher als Zapfen.

Für das Farbsehen sind die Zapfen zuständig, indem sie durch helles Licht stimuliert werden (Buch: Anatomie und Physiologie, Tortora et al. 2008).

Zapfen werden in drei Arten unterteilt:

- Blauempfindliche (K)- Zapfen
- Grünempfindliche (M)- Zapfen
- Rotempfindliche (L)- Zapfen

Das Farbsehen wird durch unterschiedliche Kombination der Zapfenstimulation ermöglicht.

Von den Photorezeptoren gelangt die Information durch die äußere plexiforme Schicht zu den Bipolarzellen und wird weiter über die innere plexiforme Schicht zu den Ganglienzellen geführt (Buch: Anatomie und Physiologie, Tortora et al. 2008). Die Axone der Ganglienzellen ziehen sich zum Discus nervi optici (blinder Fleck) hin und treten als N. opticus aus dem Augapfel heraus (angelehnt an das Buch „Anatomie und Physiologie, Tortora et al. 2008). Da der Discus nervi optici weder Zapfen noch Stäbchen enthält, können keine Bilder, die auf diesen Bereich fallen gesehen werden.

Die Macula lutea liegt genau am Mittelpunkt der posterioren Retina. Bei der Fovea centralis handelt es sich um eine Vertiefung innerhalb der Macula lutea. Sie enthält nur Zapfen und ist daher das Areal der größten Sehschärfe (angelehnt an das Buch „Anatomie und Physiologie, Tortora et al. 2008).

Die Photorezeptoren stehen am Anfang der Umwandlung von Licht in Nervenimpulse.

Diese spezialisierten Zellen wurden nach ihrem Aussehen benannt. Die Außensegmente der Stäbchen ähneln einem Stäbchen (Zylinder) und enthalten etwa 1000 gestapelte Discs. Die der Zapfen ähneln einem Zapfen (Kegel) und sind faltenförmig angeordnet (Buch: Anatomie und Physiologie, Tortora et al. 2008).

In den Außensegmenten der Stäbchen und der Zapfen findet die Transduktion von Lichtenergie in ein Rezeptorpotenzial statt.

Die Innensegmente der beiden Photorezeptorenarten beinhalten Organellen, die für die Photorezeption benötigte Moleküle bereitstellen. Außerdem tragen die Photorezeptoren einen Zellkörper und eine synaptische Region.

Die Plasmamembran der Außensegmente besitzt Photopigmente (Buch: Anatomie und Physiologie, Tortora et al. 2008).

Photopigmente sind farbige Moleküle, die bei der Absorption von Licht ihre Konformation ändern.

Photopigmente bestehen aus zwei Teilen:

- Opsin, ein Glycoprotein und
- Retinal, ein Derivat aus Vitamin A

Die Aufgabe von Retinal ist es das Licht zu absorbieren. Damit beginnt die visuelle Transduktion und es kommt zu einem Rezeptorpotenzial.

Es gibt vier verschiedene Opsine.

In Stäbchen kommt nur das Opsin „Rhodopsin“ vor, wo hingegen alle drei der Zapfenarten ein eigenes Opsin besitzen. Alle vier Opsin-Arten absorbieren verschiedene Wellenlängen von Licht (Buch: Anatomie und Physiologie, Tortora et al. 2008).

9.2.3 Signaltransduktion

Wie schon erwähnt passiert das einfallende Licht über die Ganlienzellschicht und die Bipolarzellschicht zu der Photorezeptorzellschicht, wo es zu einem Rezeptorpotenzial kommt.

Das auf diese Weise erzeugte Signal muss über die gleichen Zellschichten an das Gehirn zurück gelangen.

Die Bipolarzellen erhalten die Information von den Photorezeptoren und leiten es weiter an die Ganglienzellen, wo die Übertragung zum Gehirn stattfindet (Buch: Anatomie und Physiologie, Tortora et al. 2008).

9.2.4 Ionenkanäle

Ionenkanäle befinden sich in der Außensegmentmembran der Photorezeptoren. Cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) hält die (Na^+ und Ca^{2+}) Ionenkanäle bei Dunkelheit offen und Glutamat kann an den Synapsen freigesetzt werden. Das freigesetzte Glutamat hyperpolarisiert die Bipolarzelle. Es kommt somit zu keiner Signalübertragung (Buch: Anatomie und Physiologie, Tortora et al. 2008).

Der Lichteinfall bewirkt durch chemische Prozesse das Öffnen des cGMP-Ringes, wodurch sich die Kationenkanäle schließen, Na^+ und Ca^{2+} kann nicht mehr in die Zelle eindringen und die Glutamat Freisetzung wird unterbunden.

Die Hemmung der Bipolarzelle ist somit aufgehoben und es können Neurotransmitter freigesetzt werden (Buch: Anatomie und Physiologie, Tortora et al. 2008).

Die Membran der Ganglienzelle wird dadurch depolarisiert und ein Aktionspotenzial wird ausgelöst.

Besonders detailliert ist der Weg der Rezeptoraktivierung in den Stäbchen analysiert (Buch: Anatomie und Physiologie, Tortora et al. 2008).

Die Hyperpolarisation entsteht durch einen Konzentrationsabfall des cGMP, der durch die Aktivierung der Rhodopsinmoleküle in den Discs der Stäbchen durch ein extrazelluläres Signal, Photon erzeugt wurde. Dadurch kommt es zum Schließen der Kationenkanäle in der Plasmamembran (Buch: Anatomie und Physiologie, Tortora et al. 2008).

Im Dunkeln trägt jedes Rhodopsinmolekül ein *cis*-Retinal, das bei einer Lichtabsorption sekundenschnell zu einer *trans*-Konformation (*trans*-Retinal) übergeht.

Das durch Licht aktivierte Rhodopsinmolekül bewirkt eine Konformationsänderung des G-Proteins, Transducin.

Transducin besteht aus drei Untereinheiten, α , β und γ . Die α -Untereinheit des Transducins aktiviert ihrerseits die cGMP-Phosphodiesterase, welche wiederum cGMP hydrolysiert. Aus dem cyclischem Guanosin-3',5'-monophosphat wird Guanosin-5'-monophosphat und die Ionenkanäle schließen sich (angelehnt an das Buch „Molekularbiologie der Zelle“ Alberts et al. 2008).

Um den Zellen die Rückkehr in den Dunkelzustand zu gewähren hat die γ -Untereinheit des Transducins eine hemmende Wirkung auf die Phosphodiesterase und stellt somit ihren Ruhezustand wieder her.

Um Transducin in seine ursprüngliche Form zurück zu versetzen wird die α -Untereinheit wieder angehängt. Weiterst wird das Rhodopsin durch eine Rhodopsin-spezifische Kinase phosphoryliert und somit inaktiviert (angelehnt an das Buch „Molekularbiologie der Zelle“ Alberts et al. 2008).

9.2.5 Bipolare Zellen

Diese Nervenzellen zeichnen sich durch ihren bipolaren Aufbau aus und werden auch „Bipolarzellen“ genannt. Ihre Aufgabe ist es, die von den Photorezeptoren erhaltene Information zu bündeln und an die Ganglienzellen weiter zu leiten (Anatomie und Physiologie, Tortora et al. 2008 und Molekularbiologie der Zelle, Alberts et al. 2008).

Die Signaltransduktion der Bipolarzellen, wie auch die der Photorezeptoren verläuft nach dem Prinzip der graduierten Potenzialänderung, die zu einer variierenden Menge an ausgeschütteter Neurotransmitter führen (Anatomie und Physiologie, Tortora et al. 2008 und Molekularbiologie der Zelle, Alberts et al. 2008).

Es gibt vier Hauptarten von Bipolarzellen:

- ON- Bipolarzellen
- OFF- Bipolarzellen
- phasische- Bipolarzellen (kurzzeitige Reaktion)
- tonische – Bipolarzellen (andauernde Reaktion)

Der ausgeschüttete Neurotransmitter, Glutamat wirkt gegengleich auf die ON- und OFF-Bipolarzelle.

Als Folge von Lichteinstrahlung gibt es weniger Transmitter an den Membranrezeptoren der Bipolarzellen. Die OFF-Bipolarzellen werden dadurch hyperpolarisiert und es kommt zu einer verminderten Neurotransmitter Ausschüttung in Richtung der Ganglienzellen.

Anders hingegen reagieren darauf die ON-Bipolarzellen. Diese werden depolarisiert, wodurch vermehrt Neurotransmitter freigesetzt werden (Anatomie und Physiologie, Tortora et al. 2008 und Molekularbiologie der Zelle, Alberts et al. 2008).

9.2.6 Vererbare Netzhautdystrophien

Im Allgemeinen werden vererbare Netzhauterkrankungen in 3 Gruppen eingeteilt (retinascience.de):

- Retinitis pigmentosa
- Zapfen-Stäbchendystrophien
- Makuladystrophien

Netzhauterkrankungen welche die gesamte Netzhaut betreffen, lassen sich von denen, die nur einzelne Bereiche betreffen, unterscheiden (retinascience.de).

Zu den generalisierten Netzhautdystrophien gehört zum Beispiel die Retinitis Pigmentosa, wo die Dystrophie in der peripheren Netzhaut beginnt und sich zur Mitte hin ausbreiten kann (retinascience.de). Zapfen-Stäbchen Dystrophien gehören zu jener Krankheitsform, die vom Zentrum aus nach außen fortschreitet. Bei Makuladystrophien handelt es sich meistens um regional begrenzte Dystrophien der zentralen Netzhaut (retinascience.de).

Oft haben Retinaerkrankungen einen genetischen Hintergrund. Genmutationen können ihren Träger negativ beeinflussen, indem sie eine fehlerhafte Funktion wichtiger Proteine bewirken (retinascience.de).

Im Laufe der letzten Jahre ist die Anzahl an identifizierten Genen die mit Retinaerkrankungen assoziiert sind exponentiell gestiegen (Abbildung 4). 293 chromosomale Genloci und 256 Gene konnten bestimmt werden (aus RetNet 2017).

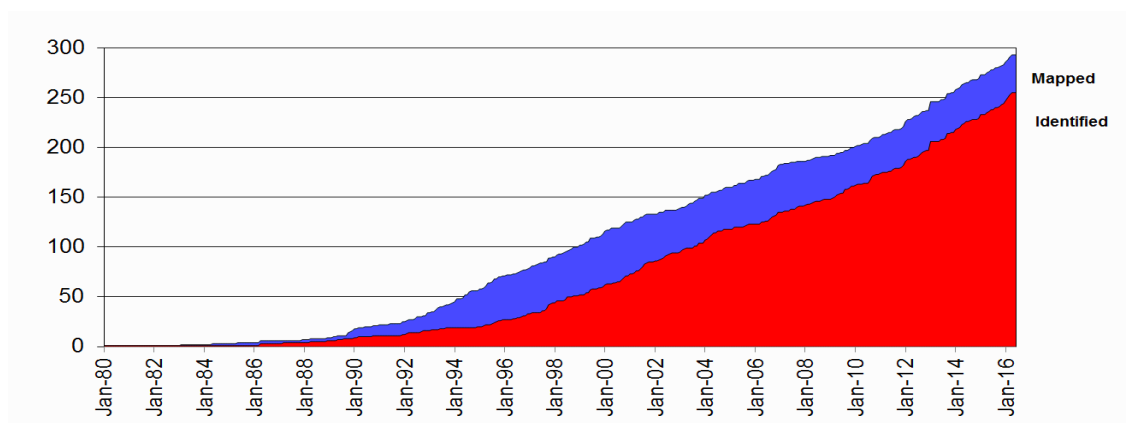


Abbildung 4 Mit den Jahren angestiegene Anzahl der identifizierten Gene für retinale Erkrankungen (rot: identifiziert, blau: einem Locus zugeordnet (RetNet 2017))

Das Krankheitsbild kann stationär oder progressiv verlaufen. Zu den progressiven Netzhauterkrankungen zählen die Retinitis Pigmentosa sowie Photorezeptor Dystrophien. Stationäre Netzhauterkrankungen sind zum Beispiel die Kongenitale stationäre Nachtblindheit (CSNB) und Achromatopsie (Farbenblindheit) (Wissinger et al.2009).

Einige Retinaerkrankungen im kurzen Überblick (angelehnt an das Buch „Anatomie und Physiologie, Tortora et al. 2008):

Retinaablösung:

Die Ablösung der Netzhaut kann als Folge eines Traumas, bei verschiedenen Augenerkrankungen wie auch der altersbedingten Degeneration auftreten. Sie tritt zwischen der Neurschicht und dem Pigmentepithel auf, es kommt zu Flüssigkeitsansammlung und als Folge zur verzehten Sicht oder Blindheit.

Altersbedingte Maculaerkrankung (AMD):

Wird auch als Makuladegeneration bezeichnet und ist eine degenerative Störung der Netzhaut bei älteren Personen.

Retinitis Pigmentosa:

Dieses Krankheitsbild tritt auf, wenn das an die Photorezeptorschicht benachbarte Pigmentepithel durch eine Störung nicht mehr in der Lage ist Abfallstoffe der Photorezeptoren zu phagozitimieren. Es kommt dadurch zur Zerstörung der Photorezeptoren und somit zur Erkrankung.

Farbenblindheit und Nachtblindheit:

Farbenblindheit tritt auf, wenn eines der drei Zapfentypen fehlt oder nicht in ausreichender Anzahl vorhanden ist. Die häufigste Form (vor allem beim männlichen Geschlecht) ist die Rot-Grün-Schwäche, wobei Rot und Grün von einander nicht unterschieden werden kann. Hierbei fehlen rotempfindliche oder grünempfindliche Zapfen oder sie sind in ihrer Funktion beeinträchtigt.

Nachtblindheit schränkt bzw. macht das Sehen in Dunkelheit unmöglich. Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit richtet sich auf die Erkrankung „Nachtblindheit“ und wird im nachfolgenden Kapitel behandelt.

10 Kongenitale Stationäre Nachtblindheit (CSNB)

Bei der Kongenitalen Stationären Nachtblindheit (CSNB) handelt es sich um eine erbliche Retinopathie (angelehnt an das Buch Augenheilkunde, Albert J. Augustin, 2013). Sie wird vor allem mit Funktionsstörungen oder Degeneration der Stäbchen assoziiert.

CSNB ist bereits bei der Geburt manifest. CSNB ist eine genetisch heterogene Erkrankung, deren Formen autosomal dominant, autosomal rezessiv und x-chromosomal vererbt werden können (humangenetik-regensburg.de).

Klinische Symptome von CSNB sind Hemeralopie und eine leicht reduzierte Sehschärfe. Es lässt sich kein auffälliger Augenhintergrund feststellen und es besteht kein eingeschränktes Gesichtsfeld.

Zusätzlich zu der Verminderten Sehleistung bei Dämmerung und Dunkelheit tritt eine verzögerte Dunkeladaptation und Lichtempfindlichkeit auf (humangenetik-regensburg.de).

Bei der rezessiven Form fehlt im Elektroretinogramm (ERG) die b-Welle, wobei die a-Welle normal erscheint. Dabei handelt es sich um Messkurven von Spannungsveränderungen der Netzhaut auf Lichtblitze (Orpha.net April 2017).

Bei der dominanten Form tritt die b-Welle auf, das Rhodopsin ist normal vorhanden und es treten eventuell Störungen der Signaltransduktion auf (Orpha.net April 2017).

Bisher sind 11 Gene identifiziert worden, die mit der rezessiv vererbten Form von CSNB in Verbindung stehen (siehe Tabelle 1) (RetNet 2017).

Gen	Chromosom	Region	Referenz
<i>CABP4</i>	11	q13.2	Haeseleer et al. 2004
<i>GNAT1</i>	3	p21.31	Dryja et al. 1996
<i>GNB3</i>	12	p13.31	Tummala et al. 2006
<i>GPR179</i>	17	q12	Audo et al. 2011
<i>GRK1</i>	13	q34	Yamamoto et al. 1997
<i>GRM6</i>	5	q35.3	Masu et al. 1995
<i>LRIT3</i>	4	q25	Zeitz et al. 2013
<i>RDH5</i>	12	q13.2	Cideciyan et al. 2000
<i>SAG</i>	2	q37.1	Fuchs et al. 1995
<i>SLC24A1</i>	15	q22.31	Sharon et al. 2002
<i>TRPM1</i>	15	q13.3	van Genderen et al. 2009

Tabelle 1 bekannte Gene für die rezessive Form von CSNB (RetNet 2017)

11 TRPM1 Gen

Das *TRPM1* Gen codiert für das Protein „Transient receptor potential cation channel subfamily member 1“ (TRPM1) und gehört zur Familie der TRP-Ionenkanäle. *TRPM1* besteht aus 24 Exons und wird alternativ gespliced, was in zahlreichen Transkriptvarianten resultiert.

Die Expression des *TRPM1* wird von „Microphthalmia associated transcription factor“ reguliert (MITF). Dieser Transkriptionsfaktor wird vom *MITF*-Gen am Chromosom 3 codiert (Miller et al. 2004, Hoek et al. 2008).

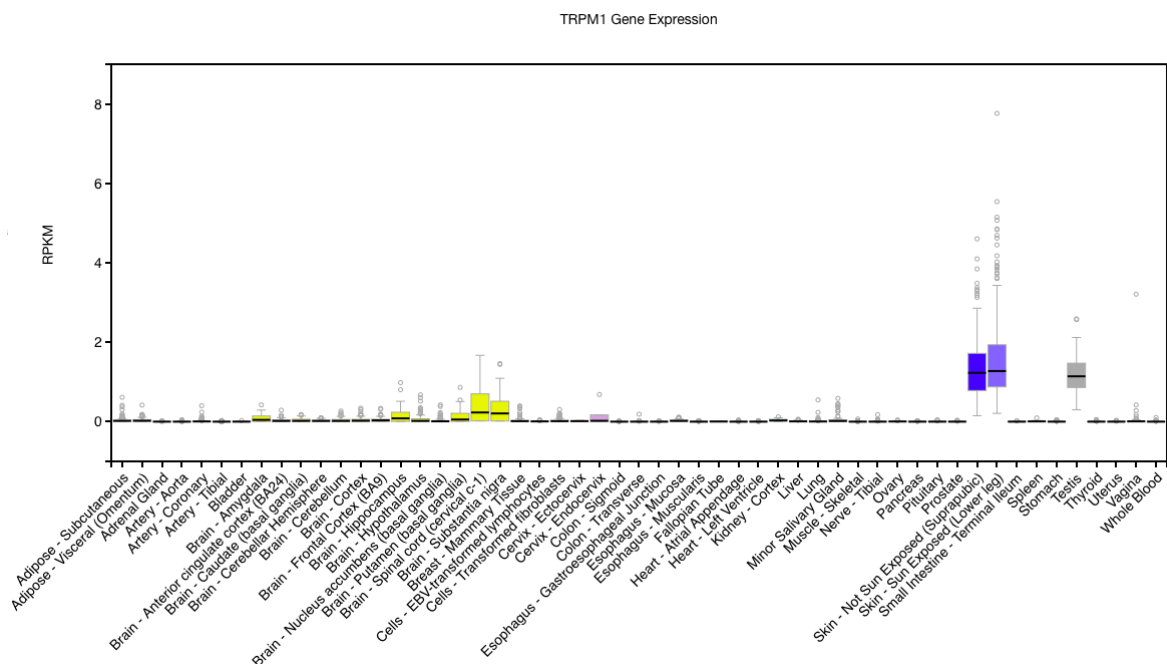


Abbildung 5 TRPM1 Gen-Expression, GTEx Analysis Release V6p, RPKM: Reads per Kilobase per Million mapped reads (Methode zur Quantifizierung der Gen-Expression aus RNA-Sequenz (Mortazavi et al. 2008)) <https://gtexportal.org/home/gene/ENSG00000134160.9>

TRPM ist eines der ca. 28 TRP-Kanäle, die alle strukturell ähnlich aufgebaut sind und besitzt selbst als Unterfamilie 8 Mitglieder (TRPM1-TRPM8).

Namensgebend für die TRPM Unterfamilie war das erste identifizierte Protein Melastatin. Dieses wurde bei einem vergleichenden Screen zwischen benignen und malignen Melanozyten entdeckt (Duncan et al. 1998, Hunter et al. 1998, Deeds, Cronin & Duncan 2000, Harteneck, Klose & Krautwurst 2011).

Diese Kanäle sind für das Empfinden von Schmerz, Hitze/Kälte, Geschmack, Druck und Sicht verantwortlich.

TRP-Kanäle gehören zu den unspezifischen Kationenkanälen, wobei TRPM1 eine Calcium permeable Variante ist.

Das Gen wird vor allem in Melanozyten exprimiert (Abbildung 5) und wahrscheinlich spielt es eine Rolle bei der Synthese von Melanin (genome.ucsc.edu).

Die Hautflecken bei Appalosa Pferden sind ebenfalls auf das Fehlen von TRPM1 zurückzuführen und sind somit ein weiterer Hinweis auf die wichtige Rolle von TRPM1 in der Melanogenese (Bellone et al. 2008).

Der alternative Splicevorgang des *TRPM1* Gens resultiert in einer langen Form (TRPM1-L) und einer kurzen (TRPM1-S) N-terminalen Form ohne transmembrane Segmente (Duncan et al. 1998, Hunter et al. 1998, Koike et al. 2010).

11.1 Funktion des TRPM1 und seine Mutationen

Ein ausschlaggebender Vorgang in der visuellen Verarbeitung ist die Segregation der visuellen Signale in ON- und OFF- Transduktionswegen der retinalen Bipolarzellen.

Der von den Photorezeptoren freigesetzte Neurotransmitter, Glutamat beeinflusst die On-Bipolarzellen. Dies geschieht über „metabotropic glutamate receptor 6“ (mGluR6) und G-Protein, welche Kationenkanäle regulieren (Koike et al. 2010, Dhingra et al. 2000, Masu et al. 1995).

Wie schon erwähnt reagieren Photorezeptoren auf Licht mit einer Hyperpolarisation und einer darauffolgenden Reduktion der Glutamat-Freisetzung. Dies bewirkt eine Depolarisierung der On-Bipolarzellen und umgekehrt eine Hyperpolarisation der OFF-Bipolarzellen.

Diese Signalweiterleitung kann zum Verschließen des Transduktions-Kanals und zu einer Hyperpolarisierung der ON-Bipolarzellen in Dunkelheit führen (Yamashita, Wassle 1991).

TRPM1 ist wichtig für die Depolarisierung der On-Bipolarzellen und ist eine Komponente des dafür verantwortlichen Kationenkanals (Morgans et al. 2009). Gen-Expressionsanalysen zeigten, dass TRPM1 vermehrt in ON-Bipolarzellen vorkommt (Morgans et al. 2009).

Die Bestätigung dafür lieferten in situ Hybridisierungs-Experimente, die TRPM1 mRNA in Zellen der inneren nuklearen Schicht der Retina (Abbildung 3) zeigten (Morgans et al. 2009).

Ebenso zeigte die Fluoreszenzmikroskopie die Expression von TRPM1 in den Dendriten der On-Bipolarzellen von Mäusen und Makaken (Morgans et al. 2009).

Das gemeinsame Vorkommen von TRPM1-L und mGluR6 ist auf die dendritischen Spitzen der On-Bipolarzellen beschränkt (Koike et al. 2010).

TRPM1-L ist eine wichtige Komponente des ON-Bipolar Transduktions-Kannels, downstream des mGluR6 der ON-Bipolarzellen (Koike et al. 2010).

ERG von TRPM1 *-/-* Mäusen zeigten eine normale a-Welle jedoch keine b-Welle, was auf einen Reaktionsverlust der Bipolarzellen hindeutet (Morgans et al. 2009). Ebenso zeigten ERGs bei Appaloosa Pferden keine b-Welle (Bellone et al. 2008).

Durch die „Patch-Clamp-Technik“ der ganzen Zelle konnte gezeigt werden, dass in TRPM1 *-/-* defizienten Mäusen keine chemisch stimulierte Lichtreaktion der ON-Bipolarzellen der Stäbchen stattgefunden hat und die Bipolarzellen-Antwort der Zapfen drastisch verändert war (Morgans et al. 2009).

Die „Patch-Clamp-Technik“ ist eine Messmethode, um den Strom durch einzelne Ionenkanäle in der Zellmembran darstellen und messen zu können (Neher & Sakmann 1976).

Weiters sind Mutationen im *TRPM1*-Gen als Ursache für CSNB beschrieben (Audo et al. 2009, Nakamura et al. 2010, van Genderen et al. 2009, Li et al. 2009).

Die Erkenntnis, dass TRPM1 als ein mit mGluR6 gekoppelter Kationenkanal fungiert, zählt als ein wichtiger Schritt am Weg zum Verständnis des Sehvorgangs (Morgans et al. 2009, Xu et al. 2012).

12 Rezessive Erbkrankheiten

Es sind bis heute tausende rezessiv vererbte Krankheiten beschrieben worden. Die Bandbreite an Symptomen reicht hier von „harmlos“ bis „lebensbedrohlich“.

12.1 Homozygotie

Ein diploider Organismus besitzt von jedem Gen auf einem homologen Chromosomenpaar zwei Kopien. Die verschiedenen Varianten dieser Gene werden als Allele bezeichnet.

Ein Individuum ist auf ein Merkmal bezogen dann homozygot, wenn beide Allele für dieses Merkmal gleich sind.

Liegen zwei unterschiedliche Allele eines Gens vor, wird dieser Zustand als „heterozygot“ bezeichnet.

12.2 Rezessive Vererbung

Mutationen von Genen, die für bestimmte Proteine codieren und eine wichtige Rolle im Organismus spielen, können negative Auswirkungen auf das Gen-Produkt (Protein) und in weiterer Folge auf den Organismus haben.

Wenn ein Allel eines Gens eine Erkrankung verursachen kann, wird dessen Protein entweder überhaupt nicht gebildet oder es codiert für seine fehlerhafte Abweichung.

Heterozygote Individuen weisen bei rezessiven Erbkrankheiten einen normalen Phänotyp auf. In einem solchen Fall kann das normale Allel in ausreichender Proteinmenge hergestellt werden.

Diese Individuen werden als „Mutationsträger“ bezeichnet und können die Mutation an ihre Nachkommen weiter vererben.

Bei Elternpaaren die beide Träger einer Mutation sind, beträgt die Wahrscheinlichkeit auf gesunde ebenso heterozygote Kinder 50%, 25% auf eine

homozygote Wildtyp-Variante und 25% auf eine homozygote Mutation, wodurch es zur Erkrankung kommt (Abbildung 6).

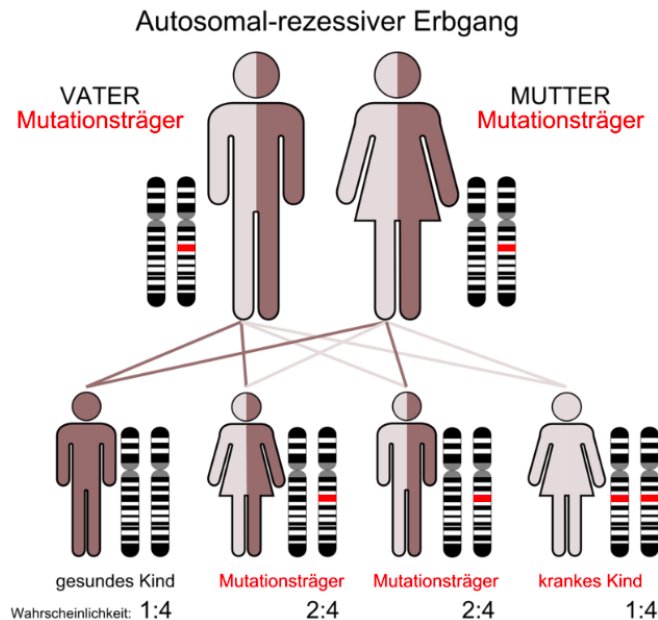


Abbildung 6 Autosomal-rezessiver Erbgang;
https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AAutorecessive_01.png

Das Erscheinungsbild der Erkrankung tritt deshalb nur in homozygoter Form auf.

Die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Mutationsträger für eine seltene rezessive Erbkrankheit zusammentreffen und Nachkommen haben, ist gering. Konsanguine Verbindungen erhöhen die Wahrscheinlichkeit des Auftretens rezessiver Erkrankungen erheblich.

12.3 Konsanguinität

Die klinische Genetik beschreibt die Blutsverwandtschaft (Konsanguinität) als eine Vereinigung zwischen zwei Individuen mit einem Inzuchtkoeffizienten (F) von $\geq 0,156$ (1,56%). Dies betrifft Cousins 2. Grades oder näher verwandter Personen (Hamamy 2012).

Der Inzuchtkoeffizient eines Individuums ist ein Maß für seinen Anteil der Loci, von dem erwartet wird, dass dieser aufgrund der Konsanguinität seiner Eltern homozygot ist. Es ist eine Wahrscheinlichkeit, dass an einem beliebigen Locus zwei Gene die aufgrund ihrer Herkunft genetisch identisch sind (Bittles et al. 2001, Read et al 2008).

Bei etwa 1/5 der Weltbevölkerung wird die Verwandtenehe praktiziert (Hamamy 2012). Gebiete die überwiegend dazugehören sind der mittlere Osten, Westasien und Nordafrika (Abbildung 7).

Pakistan, mit seiner Tradition zur Verwandtenehe zählt zu den Ländern mit der höchsten Rate weltweit. Hier werden mehr als 50% aller Ehen im eigenen Familienkreis geschlossen (Bittles et al. 2001, Hamamy et al. 2012). Das Risiko der Expression von autosomal rezessiven Mutationen steigt je höher der genetische Verwandtschaftsgrad der Eltern ist. Im Durchschnitt liegen 6,25% aller Genloci autozygot im Genom der Nachkommen von Verwandten 1. Grades vor. Dies liegt an dem gemeinsamen Genomanteil von 12,5% bei Cousins 1. Grades.

Nahe Verwandtschaft der Eltern (Cousins 1. Grades) erhöht das Risiko einer genetischen Erkrankung für die Nachkommen, um etwa 1,7% - 2,8% (Bennett et al. 2001).

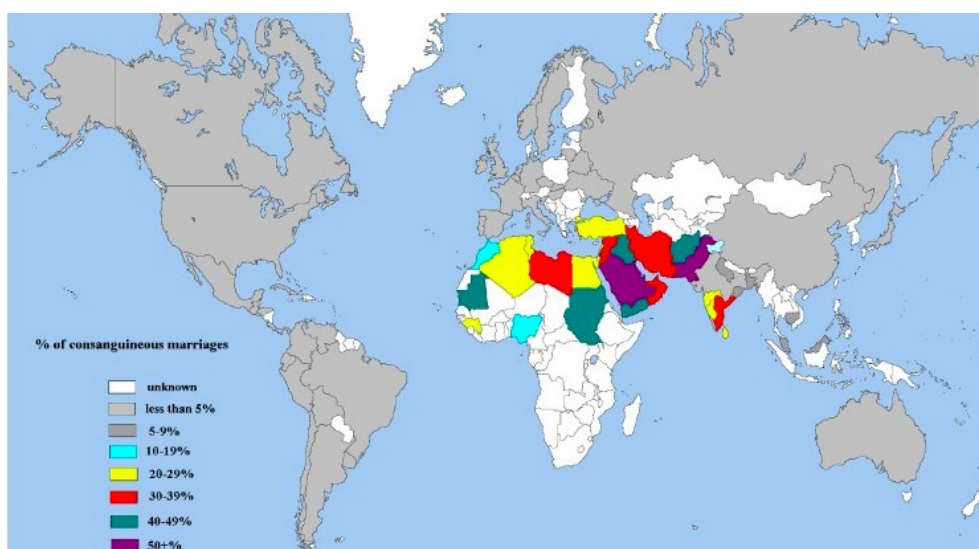


Abbildung 7 Konsanguinität Global (Hamamy et al. 2012)

13 Fallbeschreibung

Diese Arbeit befasst sich mit einer konsanguinen Familie (NB1) aus Pakistan, in der eine Augenerkrankung in ihrer letzten Generation vorkommt. Vier männliche Mitglieder sind betroffen. Die Eltern sind Cousins ersten Grades und weisen keinen Phänotyp auf (siehe Stammbaum Abbildung 8). Deren Kinder leiden unter einem kompletten Sehverlust bei Nacht und an einer starken Myopie bei Tageslicht (Informationen von Dr. Muzammil Ahmad Khan, Hamad Medical Corporation Doha, Qatar; Proben in anonymisierter Form versendet.)

Nach ersten Untersuchungen der Betroffenen konnte ein Nystagmus und Strabismus der Augen ausgeschlossen werden. Die Indexpatienten wiesen weder eine Lichtempfindlichkeit noch eine ersichtliche Fehlstellung der Augen auf. Des Weiteren ließ sich keine Linsentrübung und Verformung der Hornhaut feststellen. Zum Zeitpunkt der DNA-Probenentnahme waren die Patienten nicht diabetisch und zeigten ein normales peripheres Sichtfeld sowie eine unauffällige Licht-Pupillenreaktion. Der Innenaugendruck hielt sich ebenso im Normalbereich. Die Beschriebenen Symptome scheinen nicht progressiv zu sein und lassen eine kongenitale stationäre Nachtblindheit diagnostizieren (Informationen von Dr. Muzammil Ahmad Khan, Hamad Medical Corporation Doha, Qatar).

13.1 Stammbaum der Familie NB1

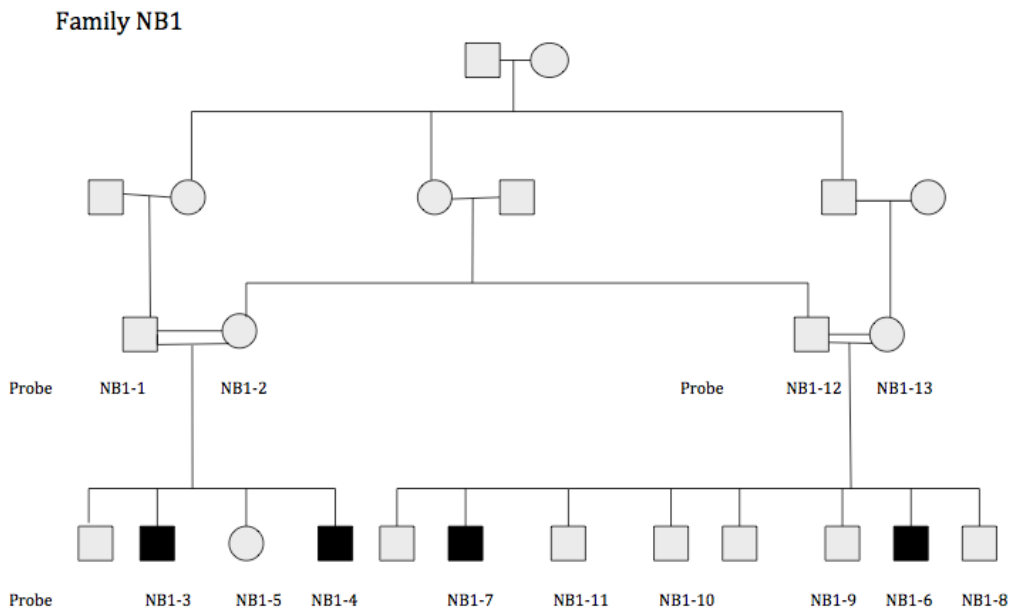


Abbildung 8 Stammbaum der Familie NB1

Von allen im Stammbaum nummerierten Personen waren DNA-Proben für die Analyse vorhanden (NB1-1 bis NB1-13). Weibliche Individuen werden vom Kreissymbol und männliche vom Quadratsymbol dargestellt. Die Symbole der Merkmalsträger sind schwarz markiert. Verwandtenehe (Konsanguinität) wird durch doppelte Linien gekennzeichnet. Man kann die konsanguinen Verhältnisse bis in die 4. Generation verfolgen.

13.2 Vorhergehende Mutationsanalysen der Familie NB1

Im Vorfeld dieser Arbeit standen wichtige Analyseergebnisse der Familie NB1 zur Verfügung.

Diese Familie wurde von Dr. Muzammil Ahmad Khan (Hamad Medical Corporation Doha, Qatar) rekrutiert. Das Ethikkomitee genehmigte ihre genetische Analyse.

Das Probenmaterial wurde in Form von Blut mit einer anschließenden DNA-Extraktion von betroffenen und nicht betroffenen Familienmitgliedern entnommen.

Die Patienten haben eine Einverständniserklärung für die Verwendung ihrer

klinischen Daten und der Stammbäume unterzeichnet (Informationen von Dr. Muzammil Ahmad Khan, Hamad Medical Corporation Doha, Qatar).

Das anonymisierte Probenmaterial, welches an das Humangenetische Institut der Universität Graz versandt wurde und für diese Arbeit zu Verfügung stand, beinhaltete 13 Familienmitglieder.

Die Ergebnisse umfassen eine Sequenzierung des gesamten Exoms eines der betroffenen Familienmitglieder (NB1-3) und einen SNP-Array der Betroffenen NB1-3 und NB1-7 am Chromosom 8 (Gehmacher, 2015).

Nach Anwendung verschiedener Filterungsschritte wurden das mit der Krankheit assoziierte Gen und die dafür wahrscheinlich verantwortliche Mutation identifiziert. Die Segregation der ermittelten Mutation wurde bei Betroffenen und nicht Betroffenen überprüft.

Die Ergebnisse wurden mit Literatur- und Datenbankrecherchen abgeglichen (Gehmacher, 2015).

13.2.1 Homozygotie-Mapping

Die Proben NB1-3 und NB1-7 wurden mit einem „Affymetrix GeneChip Human Mapping 250K Nspl“- Array analysiert. Die Analyse der Rohdaten fand am Institut für Humangenetik in Graz statt. Ein gemeinsamer homozygoter Bereich konnte am Chromosom 8 festgestellt werden: 8q11.23-q21.11; Position 53,328,330-74,041,049 (Gehmacher, 2015).

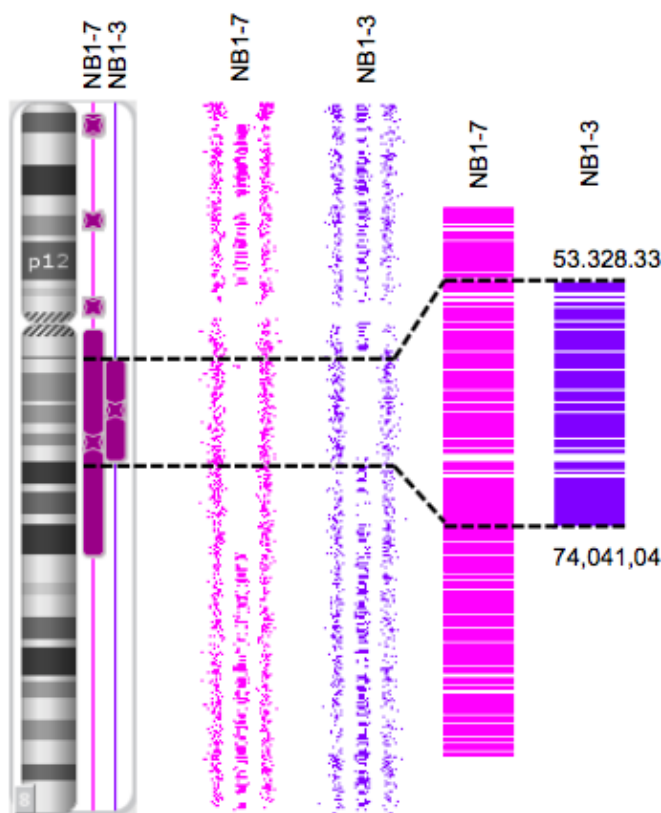


Abbildung 9 SNP-Array von NB1-3 und NB1-7 (Gehmacher, 2015); Software Affymetrix Chromosome Analysis Suite 3.0.

Die Abbildung 9 stellt homozygote Bereiche am Chromosom dar. Diese werden als violette Blöcke neben dem abgebildeten Chromosom dargestellt. Rechts daneben, wird der Verlust der Heterozygotie durch Lücken in den „Allel-Peak-Linien“ gekennzeichnet. Die hervorgehobenen Homozygotie-Stellen markieren ihre chromosomale Position (Gehmacher, 2015).

Nach Vergleich der Genotypisierungsdaten, konnte kein Bereich auf Chromosom 15 mit dem Kandidatengen TRPM1 im Homozygoty Mapper identifiziert werden. Dafür sind wahrscheinlich die wenigen SNP's, die in die Analyse eingeflossen sind verantwortlich (<http://www.homozygotymapper.org>).

Die Analyse mit Exon-Daten ist demnach viel ungenauer als die mit „high-density SNP genotyping“- Karten.

Weitere SNP-Analysen der betroffenen Familienmitglieder NB1-3, NB1-4 und NB1-6 wurden mit „Infinium HumanCoreExome-24 BeadChips“ von Illumina in Toronto/Kanada durchgeführt. Die darauffolgende Auswertung ergab keinen gemeinsamen homozygoten Bereich aller drei Merkmalsträger. Wie man es der Tabelle 2 entnehmen kann, teilen sich jedoch NB1-3 und NB1-4 mehrere homozygote Gebiete (Gehmacher, 2015).

Chromosom	Region	Begrenzende SNPs	Position
6	p25.3-p25.2	Tel-rs4959232	1-3,302,233
8	q11.23-q21.11	rs1317186 -rs7842420	52,406,084 -73,126,759
10	p13-p12.2	rs10752058 - rs11013053	16,673,195 - 22,575,280
10	q26.11-q26.13	rs10787868 - rs1991398	118,824,699 -123,802,031
12	q23.3-q24.22	rs12426430 -rs11068445	105,611,260 -117,307,124
13	q31.3	rs9523441 -rs9561401	91,871,778 -93,576,493
15	q13.1-q14	rs11858397 -rs8030397	29,155,854 -33,652,110
17	q25.3	rs12939525-tel	81,219,955 -83,257,441
19	p13.3	tel-rs8102902	1-3,769,051
20	q13.13-q13.2	rs6020922 -rs4535114	51,033,052 -53,879,462

Tabelle 2 Gemeinsame Homozygote Bereiche von NB1-3 und NB1-4 (Gehmacher, 2015)

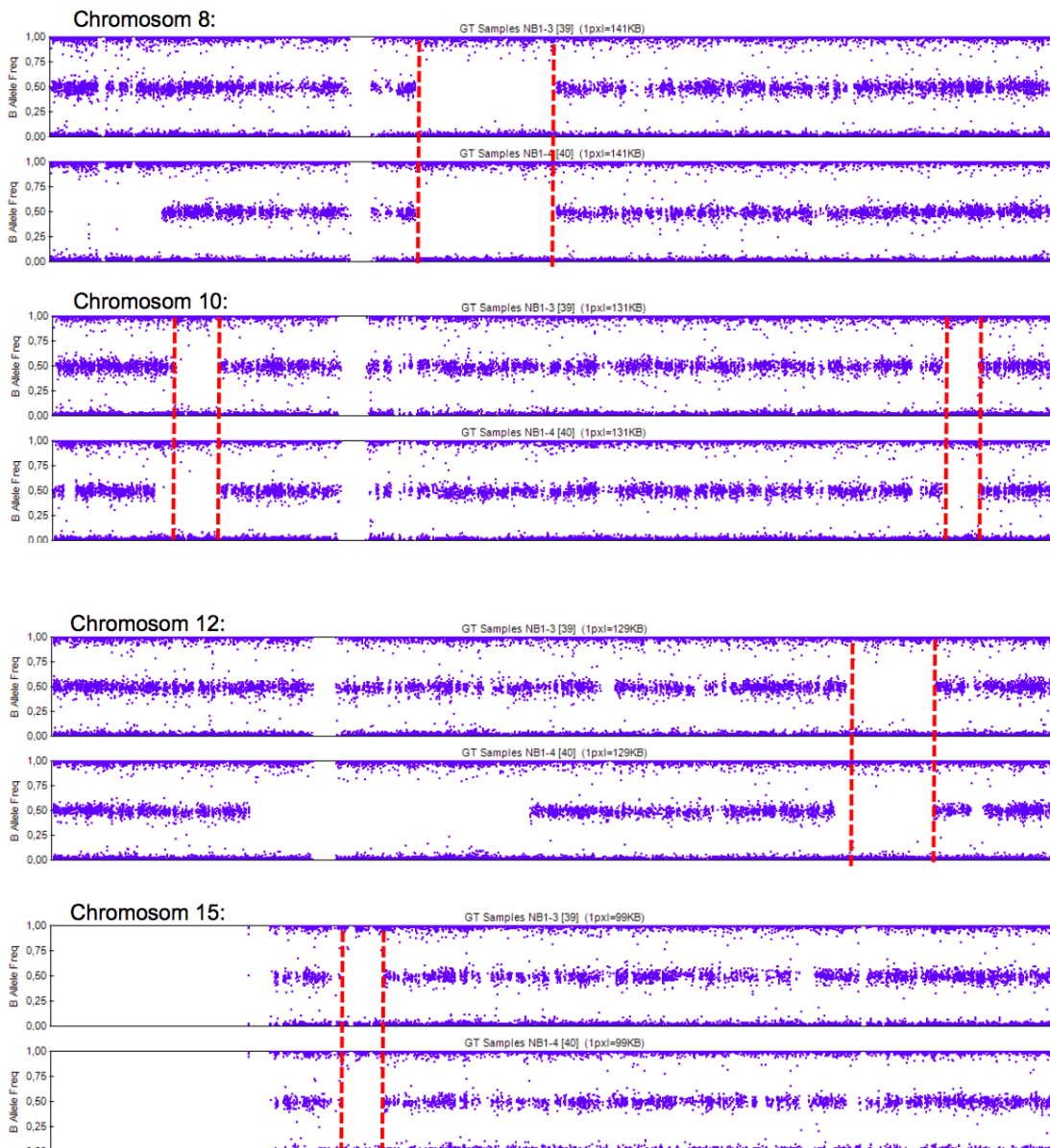


Abbildung 10 SNP-Analyse von NB1-3 und NB1-4 (Gehmacher 2015); Software Affymetrix Chromosome Analysis Suite 3.0.

Am Chromosom 8, 10, 12 und 15 konnten fünf homozygote Bereiche mit einer Mindestgröße von 4MB festgestellt werden. Diese Bereiche sind durch Lücken in der jeweiligen mittleren Allel-Peak-Linie in Abbildung 10 dargestellt und stellen Regionen mit fehlender Heterozygotie dar (Homozygotie Bereiche) (Gehmacher, 2015).

13.2.2 Suche nach Kandidatengen

Ein Gen (*RP1*) welches mit Augenkrankheiten im Zusammenhang steht konnte mit dem UCSC Genome Browser ausfindig gemacht werden. Dieses wurde innerhalb der gemeinsamen homozygoten Region von NB1-3 und NB1-7 am Chromosom 8 ermittelt (Gehmacher, 2015).

RP1 steht unter anderem im Zusammenhang mit Erkrankungen wie Retinitis pigmentosa und der Leberschen kongenitalen Amaurose (Pierce et al. 1999, Eisenberger et al. 2013).

Ein weiteres Gen am Chromosom 15 (*TRPM1*) wurde entdeckt, indem man die gemeinsamen homozygoten Regionen von NB1-3 und NB1-4 verglichen hat. *TRPM1* wird mit kongenitaler stationärer Nachtblindheit assoziiert, was wiederum die gestellte Diagnose bestätigte (Gehmacher, 2015).

Zusätzlich wurde das *PDE6G*-Gen am Chromosom 17 (NB1-3 und NB1-4) beschrieben, welches ebenfalls für Retinitis pigmentosa als kausal gilt (Gehmacher, 2015).

Es konnten keine weiteren Kandidatengene durch das Vergleichen der gemeinsamen homozygoten Bereiche gefunden werden (Gehmacher, 2015).

13.2.3 Exom-Sequenzierung der NB1-Familie

Die Exom-Sequenzierung führte Dr. Muzamil Ahmad Khan an der Hamad Medical Corporation in Doha, Qatar durch. Dafür wurde Nextera® Rapid Capture Exome-Kits von Illumina sowie NextSeq® 500 Mid Output-Kits v2 an einem NextSeq® 500-System von Illumina verwendet (Gehmacher, 2015).

Die codierenden DNA-Bereiche der NB1-3-Probe wurden sequenziert.

Varianten-Filterungsstrategie (angelehnt an Gehmacher, 2015):

1. Herausfiltern von Varianten die Qualitätskriterien, wie die Mindestanzahl an Reads oder einen minimalen Prozentsatz an Reads, nicht erfüllten.
2. Suche nach Varianten die innerhalb der gemeinsamen homozygoten Bereiche der Betroffenen liegen.
3. Varianten mit einer Minor-Allele-Frequenz von $< 1\%$ wurden in Betracht gezogen.
4. Nur homozygot vorliegende Varianten durften den Filter passieren
5. Von den übrig gebliebenen Varianten wurden die intronischen Varianten entfernt.
6. Stille Mutationen würden nicht betrachtet.

Nach den eben genannten Filterungsmaßnahmen der Software VariantStudio Variant Analyses von Illumina lieferte die Exom-Sequenzierung eine Gesamtzahl von 32.252 Varianten (Gehmacher, 2015).

Die Varianten die in der gemeinsamen homozygoten Region der Betroffenen NB1-3 und NB1-7 am Chromosom 8 gefunden wurden, stehen allerdings nicht mit Augenerkrankungen im Zusammenhang. Auch im Kandidatengen RP1 wurde keine homozygote Mutation gefunden (Gehmacher, 2015).

Auf diese Weise konnte eine überschaubare Liste an möglichen krankheitsassoziierten Varianten erstellt werden.

Die Filterung nach Varianten in der gemeinsamen homozygoten Region von NB1-3 und NB1-4 reduzierte die Anzahl auf 19 mögliche krankheitsverursachende Mutationen in 10 unterschiedlichen Genen (Tabelle 3) (Gehmacher, 2015).

Nach weiteren Datenfilterungen und genauen Datenbank- und Literaturrecherchen konnte eine Mutation im *TRPM1*-Gen als Krankheitsverursachend eingestuft werden.

Diese Mutation im *TRPM1*-Gen mit der rs-Nummer rs200514769 (NM_002420.5: c.215A>G) wurde schon von Audo et al. 2009 als Ursache für kongenitale, stationäre Nachtblindheit beschrieben (Audo et al. 2009).

Gen	Variante	Chromosom	Position	Reads	Konsequenz	Änderung DNA	Änderung Protein	dbSNP_ID
PCMTD1	A>G/G	8	52811681	6	5_prime_UTR_variant	NM_052937.2:c.-287T>C		rs10106734
LOC100-996304	C>T/T	8	55632762	40	missense_variant	XM_003846249.1:c.1331C>T	XP_003846297.1:p.Thr444Met	rs1437782
PREX2	C>T/T	8	69143564	28	splice_region_variant, intron_variant	NM_024870.2:c.4776-4C>T		rs201940757
PTPLA	C>A/A	10	17659131	12	missense_variant	NM_014241.3:c.208G>T	NP_055056.3:p.Val70Phe	rs11254692
EBLN1	A>T/T	10	22498749	66	missense_variant	NM_001199938.1:c.164T>A	NP_001186867.1:p.Val55Asp	rs2478476
MMAB	C>G/G	12	109992132	239	3_prime_UTR_variant	NM_052845.3:c.*2701G>C		rs2241201
MMAB	C>T/T	12	109992491	146	3_prime_UTR_variant	NM_052845.3:c.*2342G>A		rs72650176
MMAB	A>G/G	12	109992881	229	3_prime_UTR_variant	NM_052845.3:c.*1952T>C		rs61940463
MMAB	C>T/T	12	109993023	189	3_prime_UTR_variant	NM_052845.3:c.*1810G>A		rs73414076
MMAB	G>A/A	12	109993366	51	3_prime_UTR_variant	NM_052845.3:c.*1467C>T		rs1061440
MMAB	C>A/A	12	109993603	249	3_prime_UTR_variant	NM_052845.3:c.*1230G>T		rs11067231
MMAB	C>G/G	12	109993976	140	3_prime_UTR_variant	NM_052845.3:c.*857G>C		rs877710
MMAB	A>G/G	12	109994018	139	3_prime_UTR_variant	NM_052845.3:c.*815T>C		
MMAB	A>C/C	12	109994112	108	3_prime_UTR_variant	NM_052845.3:c.*721T>G		rs11831226
MMAB	A>G/G	12	109994641	129	3_prime_UTR_variant	NM_052845.3:c.*192T>C		rs8228
CUX2	G>C/C	12	111786082	69	missense_variant	NM_015267.3:c.4414G>C	NP_056082.2:p.Val1472Leu	rs6490073
TBX5	C>T/T	12	114793240	206	3_prime_UTR_variant	NM_181486.2:c.*97G>A		rs883079
LINC00173	C>T/T	12	116972636	160	non_coding_exon_variant, nc_transcript_variant	NR_027345.1:n.907C>T		
TRPM1	T>C/C	15	31360294	115	splice_region_variant	NM_001252020.1:c.332A>G	NP_001238949.1:p.Tyr111Cys	rs200514769

Tabelle 3 Varianten nach der Filterung (Gehmacher, 2015)

13.2.4 Sanger Sequenzierung

Die homozygot vorliegende Mutation (NM_002420.5: c.215A>G) am Exon 4 des *TRPM1*- Gens, konnte durch eine Sanger Sequenzierung bei den betroffenen Individuen des linken Stammbaumzweiges NB1-3 und NB1-4 bestätigt werden. NB1-6 stellte sich als heterozygoter Mutationsträger heraus. Da damals nicht genug DNA-Material von der NB1-7 Probe vorhanden war, konnten mit dieser Probe keine weiteren Analysen durchgeführt werden (Gehmacher, 2015).

Nicht Betroffene sind entweder keine Mutationsträger (WT) oder tragen die Mutation c.215A>G heterozygot. Die Individuen NB1-3 und NB1-4 tragen die Mutation homozygot (Gehmacher, 2015).

13.3 Ziel dieser Arbeit

Mit der Entdeckung einer bisher noch nicht beschriebenen Mutation c.1450G>A (pG484R, rs770197134; NM_002420.5) in Exon 12 des *TRPM1* Gens in Individuum NB1-7, (Muzammil Ahmad Khan, persönliche Kommunikation, 2016) stellte sich die Frage, ob diese Mutation kausal für kongenitale stationäre Nachtblindheit ist?

Dies veranlasste eine erneute Probenentnahme des Betroffenen NB1-7 zur weiteren Abklärung der familiären Segregation dieser Variante.

Diese Probe wurde einer weiteren „Whole Exome“ - Sequenzierung, im besonderen Hinblick auf das *TRPM1* Gen unterzogen. Die „Whole Exome“ - Sequenzierung erfolgte in gleicher Weise, wie zuvor für die NB1-3 und NB1-4 Individuen beschrieben. In allen weiteren Krankheitsgenen konnte keine kausale Variation identifiziert werden. Im NB1-7 wurde eine Mutation für die bekannte familiäre Mutation im Exon 4 des *TRPM1* Gens (NM_002420.5: c.215A>G) im heterozygotem Zustand gefunden, sowie auch die noch nicht im Zusammenhang mit CSNB beschriebene Variante im Exon 12 des *TRPM1* Gens (NM_002420.5, c.1450G>A) im heterozygotem Status gefunden.

Um einen möglichen kausalen Zusammenhang mit der vorliegenden Erkrankung zu bestimmen, wurde eine Segregationsanalyse mit allen Proben der zu Verfügung stehenden Individuen durchgeführt.

Zusätzlich wurde nochmal das Exon 4 des *TRPM1* Gens die zuvor beschriebene Mutation c.215A>G sequenziert und mit in die Interpretation der molekulargenetischen Ergebnisse einbezogen.

14 Material und Methoden

Alle Proben der Familie NB1 und alle Geräte sowie Reagenzien wurden vom Institut der Humangenetik für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Bei den Proben handelte es sich um extrahierte DNA der Familienmitglieder (NB1-1 bis NB1-13) welche in gefrorener Form am Institut für Humangenetik aufbewahrt wurden.

Für die Analyse waren spezifische Primer für die Exons 4 und 12 des *TRPM1*-Gens notwendig.

14.1 Primer Design

Beim Erstellen der Primer waren einige Punkte zu beachten (ThermoFischer 2017):

- Die optimale Länge eines Primers liegt zwischen 18-30bp. Diese Spannweite ist lang genug für eine hohe Spezifität und kurz genug um problemlos am Template binden zu können.
- Die Schmelztemperatur (T_m) der Primer sollte zwischen 65 - 75°C betragen. Die Formel dafür lautet: $T_m(^{\circ}\text{C}) = \{\Delta H / \Delta S + R \ln(^{\circ}\text{C})\} - 273.15$
- Der Temperaturunterschied zwischen dem Primerpaar sollte nicht mehr als 5°C betragen.
- Ein GC-Gehalt von 40-60% ist ideal.
- Ratsam ist es Sekundärstrukturen zu vermeiden und eine balancierte GC- und AT-reiche Verteilung zu schaffen.
- Nukleotid-Wiederholungen wie zum Beispiel: ACCCC oder ATATAT sollten gemieden werden.

14.1.1 Primer für das Exon 4 des TRPM1-Gens:

Forward Primer (TRPM1_E4F)

Sequenz: 5' GGC CTC CAT GCA CAG ATA TT 3'

Länge: 20bp

GC-Gehalt: 50%

T_m: 56,4 °C

Reverse Primer (TRPM1_E4R)

Sequenz: 5' GGC AGT TCT TGC TTG GAC AT 3'

Länge: 20bp

GC-Gehalt: 50%

T_m: 57,2 °C

Annealing-Temperatur für beide Primer: 51,4 °C (HotStarTaq DNA Polymerase)

14.1.2 Primer für das Exon 12 des TRPM1-Gens:

Forward Primer (TRPM1_E12F)

Sequenz: 5' CGC TTC CTT CCC TTT TTC TA 3'

Länge: 20bp

GC-Gehalt: 45%

T_m: 53,9 °C

Reverse Primer (TRPM1_E12R)

Sequenz: 5' CCC TTT CCT CTG TGT TTC CA 3'

Länge: 20bp

GC-Gehalt: 50%

T_m: 56,2 °C

Annealing-Temperatur für beide Primer: 48,9 °C (HotStarTaq DNA Polymerase)

(ThermoFischer, © 2016 Thermo Fisher Scientific Inc. All Rights Reserved. 2017)

Die Primer für die Amplifikation der kodierenden Exons des TRPM1 Gens wurden mittels des Online-tools „Primer3“ (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) mit den „default“ Einstellungen selektioniert. Die humane „Mispriming Library“ wurde aktiviert um redundante Sequenzbereiche aus der Suche auszuschließen.

14.2 Primer Vorbereitung

Die Primer wurden in einer gefriergetrockneten Form vom Hersteller geliefert.

Zu diesen wurde ein vom Hersteller angegebenes dH₂O-Volumen hinzugefügt, um eine Konzentration von 100µM zu erreichen:

Primer	Volumen für 100µM
TRPM1_E4F	445 µl
TRPM1_E4R	427µl
TRPM1_E12F	382µl
TRPM1_E12R	427µl

Tabelle 4 Primer Aufbereitung mit Nuklease freiem H₂O

Weiterst wurden die Primer 1:10 verdünnt:

Für ein Endvolumen von 200µl wurden 180µl Nuklease freies Wasser mit 20µl aufbereiteten Primer verwendet.

Mit dieser Verdünnung wurde weiter gearbeitet. Die unverdünnten Primer wurden eingefroren.

14.3 DNA-Quantifizierung

Die DNA-Konzentrationen der aufgetauten Proben der Familie NB1 wurden mit NanoDrop® ND1000 bestimmt (Tabelle 5).

Dabei wurde die aufgereinigte DNA spektrophotometrisch vermessen.

Um eine gleichmäßige Vermischung zu gewährleisten, wurden die Proben vorsichtig auf- und abpipettiert.

Für die Messung wurde 1,5µl Proben-DNA benötigt. (Weitere Informationen im Anhang zu finden).

Probe	DNA-Konzentration
NB1-1	86,13 ng/µl
NB1-2	189,44 ng/µl
NB1-3	66,8 ng/µl
NB1-4	70,48 ng/µl
NB1-5	277,77 ng/µl
NB1-6	266,45 ng/µl
NB1-7	51,60 ng/µl
NB1-8	149,35 ng/µl
NB1-9	68,11 ng/µl
NB1-10	15,31 ng/µl
NB1-11	216,31 ng/µl
NB1-12	91,90 ng/µl
NB1-13	27,46 ng/µl

Tabelle 5 DNA Konzentration mittels NanoDrop® ND 1000

14.4 Polymerase Chain Reaktion (PCR)

Im Allgemeinen handelt es sich bei der PCR, um eine Methode zur Vervielfältigung einer bestimmten DNA Sequenz, welche man im Anschluss analysieren möchte.

Die dafür benötigten Komponenten sind:

- DNA
- Spezifische Primer
- DNA Polymerase
- Desoxynukleosidtriphosphat
- Magnesium-Ionen als Cofaktor für die Polymerase
- Pufferlösung für die Stabilisierung der Polymerase

Der Ablauf verläuft in 25-40 Zyklen in einem Thermocycler.

Ein Zyklus besteht aus drei aufeinanderfolgenden Schritten:

1. Denaturierung:

Die doppelsträngige DNA wird auf etwa 95°C erhitzt, dabei werden Wasserstoff-Brücken aufgelöst und somit die DNA-Stränge voneinander getrennt.

2. Primer-Hybridisierung (Primerannealing):

Die Temperatur wird auf 50-65°C abgesenkt und die Primer können sich an die denaturierte DNA anlagern.

3. Elongation:

Die fehlenden Stränge der DNA werden durch die DNA-Polymerase mit Nukleotiden vervollständigt. Abhängig von der verwendeten Polymerase beträgt hier die Temperatur zwischen 68- 72°C.

Für die Amplifikation der Exons 4 und 12 wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

Temperatur	Zeit	Zyklen
94°C	15 Minuten	1
95°C	25 Sekunden	33
57°C	30 Sekunden	
72°C	1 Minute	
6°C	∞	

Tabelle 6 Temperatur und Zyklusdauer im Thermocycler

14.4.1 PCR-Ansatz:

		Master-Mix
HotStarTag	6µl	90µl
dH2O	4µl	60µl
Forw.Primer	0,5µl	7,5µl
Rev.Primer	0,5µl	7,5µl
DNA	1µl	
End Vol.	12µl	165µl

Tabelle 7 PCR-Ansatz pro Reaktion und Master-Mix

Für den PCR-Ansatz wurde jeweils ein Master-Mix für Exon 4 und Exon 12 vorbereitet (MM_E12 und MM_E4).

Der Master-Mix beinhaltet alle für die PCR benötigten Reagenzien für 13 DNA-Proben + Reserve.

Bei den Proben mit einer höheren DNA-Konzentration (NB1-2, NB1-5, NB1-6, NB1-8 und NB1-11; Tabelle 5), wurde die für den PCR-Ansatz nötige DNA-Menge verringert. Somit wurden anstatt 1µl DNA, 0,5µl DNA + 0,5µl dH₂O verwendet, um auch hier auf ein Endvolumen von 12µl/Reaktion zu kommen.

Insgesamt lagen 26 PCR-Tubes für die Reaktion vor. Diese wurden vor dem Start des Thermocycler gut durchmischt und an der Tischzentrifuge kurz zentrifugiert.

Laufzeit der Reaktion betrug ~ 1,5 h.

14.5 Gelelektrophorese

Um überprüfen zu können, ob die PCR-Reaktion funktioniert hat wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt.

Dafür wurde am Ende der PCR-Laufzeit ein 1% Agarose-Gel vorbereitet:

1% Agarose-Gel

1xTBE Puffer	100ml
Biozym LE Agarose	1g

Tabelle 8 Herstellen eines 1% Agarose-Gels

Daraufhin wurde die Suspension zugedeckt ~ 2 min. in der Mikrowelle zum Kochen gebracht.

Dabei war es wichtig, dass das Agarosepulver vollständig im Puffer gelöst war (keine wahrnehmbaren Partikel).

In der Zwischenzeit würde die Gießform mit dem Kamm vorbereitet.

Nach dem Abkühlen kamen 10µl DNA-interkalierendes Reagenz, GelRed™ hinzu.

GelRed™ macht es möglich unter UV-Licht die DNA sichtbar zu machen.

Die Flüssigkeit wurde zügig in die Form gegossen und ~ 30 min. bei Raumtemperatur auspolymerisieren gelassen.

Für die Proben Vorbereitung wurde jeweils 5µl PCR-Produkt mit jeweils 1µl STOP Solution in zusätzliche Gefäße hergerichtet.

Bei der STOP Solution handelt es sich um ein Gemisch aus Glycerin mit blauer Farbe, damit die Probe beim Gel-Laden in die Kammtasche absinken kann und mit dem freien Auge sichtbar ist.

Aus dem auspolymerisierten Gel wurde der Kamm vorsichtig herausgezogen, das Gel samt der Form in die Apparatur überführt und alles bis zu Fühllinie am Beckenrand mit 1xTBE Puffer bedeckt.

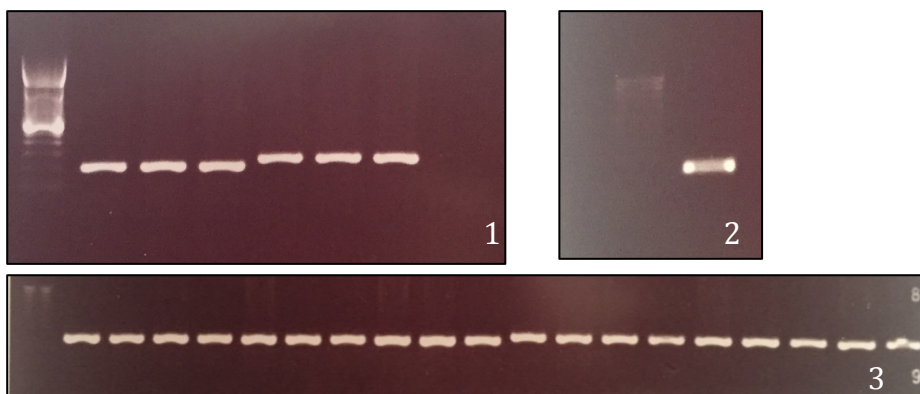


Abbildung 11 Fotos nach Gelelektrophorese; Probenidentifikation (links nach rechts):

1: M, E4_NB1-1, E4_NB1-2, E4_NB1-6, E12_NB1-1, E12_NB1-2, E12_NB1-6;

2: M, E12_NB1-13

3: M, E4_NB1-3, E4_NB1-4, E4_NB1-5, E4_NB1-7, E4_NB1-8, E4_NB1-9, E4_NB1-10, E4_NB1-11, E4_NB1-12, E4_NB1-13, E12_NB1-3, E12_NB1-4, E12_NB1-5, E12_NB1-7, E12_NB1-8, E12_NB1-9, E12_NB1-10, E12_NB1-11, E12_NB1-12,

In die erste Tasche kamen 5 µl von einem 100bp Größenstandard (M) hinein. Weitere Taschen wurden mit jeweils 5µl DNA-Proben Gemisch befüllt.

Die Apparatur wurde ordnungsgemäß verschlossen und auf 130V für 30 min. eingestellt.

Nach der vorgesehenen Laufzeit wurde das Gel vorsichtig entnommen und unter UV-Licht fotografiert (Abbildung 11).

14.6 Sanger-Sequenzierung

Diese Methode dient zur Bestimmung der Nukleotid Abfolge. Hierbei können maximal 600-1000 Basenpaare gelesen werden. Das Ablaufprinzip entspricht der PCR. Es laufen zwei separate Reaktionen für die Forward-Primer und Reverse-Primer ab.

Zusätzlich zu den dNTP's werden farbig markierte dideoxynTP's (ddNTP's) der Reaktion zugesetzt. Diese werden zufällig durch die Polymerase eingebaut. Da nach Einbau eines ddNTP's, das 3'-OH zur weiteren Synthese fehlt, kommt es zum Synthese-Abbruch.

Statistisch betrachtet findet an jeder Stelle ein Kettenabbruch statt. Die Produkte können somit der Größe nach aufgetrennt werden. Dabei befinden sich die längsten Stücke am Ende und die kürzesten am Anfang der Aufreihung.

Durch einen Leser lässt sich die Farbe des markierten ddNTP's und somit die Basenabfolge bestimmen.

14.7 DNA-Sequenzierung

Reaktions-Ansatz

	Master-Mix	
dH ₂ O	6,8 µl	102µl
Big Dye	0,5µl	7,5µl
ABI Sequenzier-Puffer	1,4µl	21µl
Primer	0,3µl	4,5µl
PCR-Produkt	1µl	-
Endvolumen	10µl	

Tabelle 9 Reaktionsansatz für die Sanger-Sequenzierung, pro Reaktion und Master-Mix

In dieser Reaktion wurde nur einer der Primer-Paare verwendet. In diesem Ansatz wurden jeweils die reversen Primer verwendet.

- TRPM1_E4R (1:10)
- TRPM1_E12R (1:10)

Auch hier wurde zuvor ein Master-Mix (MMS_E4, MMS_E12) für 13 Proben + Reserve vorbereitet.

Somit lagen 26 PCR-Tubes für die Sanger-Reaktion bereit. Diese wurden ebenfalls vor dem Start des Thermocycler gut durchmischt und an der Tischzentrifuge kurz zentrifugiert.

Protokoll und Reaktionsbedingungen sind der Tabelle 10 zu entnehmen.

Temperatur	Zeit	Zyklen
96°C	30 Sekunden	24
50°C	15 Sekunden	
60°C	4 Minuten	
8°C	∞	

Tabelle 10 Temperatur und Zyklusdauer, Sequenzierungs-Ansatz

14.7.1 Size Exclusion Chromatographie (Gel-Filtration)

Unter der Gel-Filtration versteht man eine Protein-DNA Aufreinigung nach Molekülgröße.

Für die Aufreinigung wurde das Gel „Sephadex“ verwendet.

Dabei handelt es sich um ein Dextran-Epichlorhydrin-Copolymer. Dieses Copolymere wird durch Vernetzung des Homoglykans Dextran mit Epichlorhydrin erzeugt. In Verbindung mit einer wässrigen Lösung kommt es zu einem formstabilen Gel mit relativ einheitlichen Poren (Wikipedia 2017).

Dieses Gel dient der stationären Phase bei der Chromatografie. Durch Zentrifugations-Schritte werden die großen Moleküle von den kleineren getrennt. Die großen Moleküle passieren problemlos das Gel, da sie von ihrer Größe nicht in die Poren des Gels hineinpassen. Die kleinen Moleküle dringen in die Gel-Poren ein und werden im Gel gefangen. Auf diese Weise kann man kleine Moleküle wie zum Beispiel Nukleotide, Cofaktoren, Inhibitoren sowie auch Salze, die folgende Reaktionen beeinträchtigen könnten, entfernen (Abbildung 12).

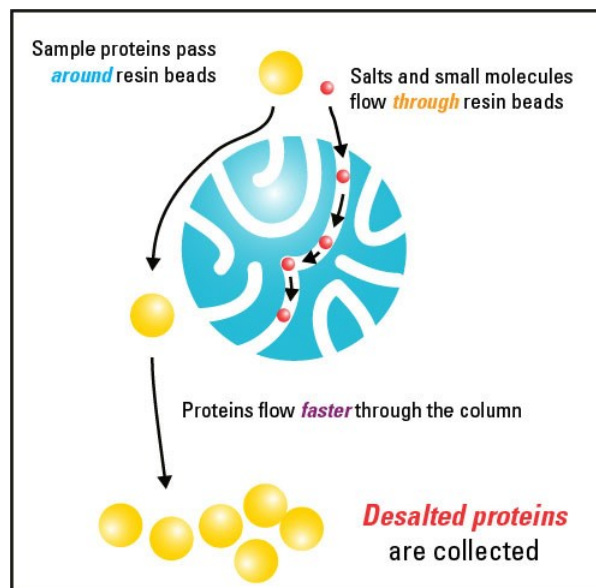


Abbildung 12 Gel-Filtrierung,
Potcherboy, lizenziert unter Creative Commons 3.0,
https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3ASample_desalting_using_gel_filtration_chromatography.jpg,
keine Änderungen vorgenommen

14.7.1.1 Aufreinigung der Sequenzier-Produkte der Familie NB1 mit Sephadex-Säulchen

Zuallererst wurden alle Proben 1:1 mit Wasser verdünnt (10µl Probeninhalt + 10 µl dH₂O).

Die Röhrchen für die „Gel-Säulchen“ wurden mit H₂O gesäubert. Dafür wurden sie für 30 Sekunden bei 750rcf zentrifugiert.

Weiter wurden jeweils 500µl Sephadex G-50 superfine in die sauberen Röhrchen pipettiert (für 26 Proben) und für 30 Sekunden bei 750rcf zentrifugiert, das

Durchflusswasser entfernt und nochmal für 1 Minute bei 750rcf zentrifugiert. Auf diese Weise entsteht die „Säule“ aus dem Gel.

Daraufhin wurde jeweils 20µl der Proben vorsichtig auf das Gel hinab pipettiert.

Die Säulchen wurden in ein sauberes „8´ter Strip“ (4x) überführt und 2 Minuten bei 750rcf zentrifugiert.

Der Durchfluss nach der Zentrifugation aller Säulchen entspricht den aufgereinigten Proben.

Diese wurden in weiterer Folge in eine 96 Well-Platte pipettiert und für die weitere Auftrennung mit dem Genetic Analyzer (Applied Biosystems) bereitgestellt.

Dabei musste genau die Reihenfolge und Probenbezeichnung beachtet werden.

14.8 Sequenzier-Lauf und Auswertung

Die Auftrennung der Proben erfolgte durch Kapillarelektrophorese der

aufgereinigten Sequenzierprodukte mit dem „ABI PRISM ® 3100 Genetic Analyzer - Applied Biosystems“ mittels POP7 Polymer am Institut für Humangenetik in Graz.

Für die darauf folgende Auswertung diente die Software 4Peaks for Mac.

Die Sequenzen wurden mit humanen Genom (UCSC Genombrowser) verglichen.

14.9 Segregationsanalyse

Dabei handelt es sich um den Nachweis von möglichem Einfluss von Erbfaktoren auf den Phänotyp. Dafür ist eine Identifizierung des Erbmodelles sowie eine Stammbaumanalyse notwendig (Bieber et al. 2008).

So gesehen ist die Segregationsanalyse eine Statistische Methode, um aus Familiendaten die Vererbungsform eines bestimmten Merkmals zu bestimmen und bildet somit die Grundlage der Humangenetik (Harris et al. 1981; Elston et al. 1981).

Die Segregationsanalyse lässt sich in zwei Klassen einteilen (Ganten et al, 2003):

1. Klassische Segregationsanalyse

Hier werden Transmissionswahrscheinlichkeiten eines Phänotyps innerhalb eines Stammbaums untersucht und mit Werten verglichen, die nach den Mendel-Regeln erwartet werden.

2. Komplexe Segregationsanalyse

Im Unterschied zu der klassischen Form werden hier deutlich komplexe Modelle, die multifaktorielle Einflüsse berücksichtigen und Haupt- wie auch Nebengene mitprüfen verwendet (Lalovel et al. 1983).

15 Ergebnisse

Im Zuge dieser Arbeit wurden alle verfügbaren DNA- Proben der Familie NB1 mittels Sanger Sequenzierung auf die Mutationen im Exon 4 und Exon 12 des *TRPM1*- Gens analysiert. Daraufhin konnte man die beiden Mutationen innerhalb der Familie segregieren. Als Referenz-Genom diente NM_002420.5, hg19 (UCSC Genombrowser).

15.1 Segregation der Mutation im Exon 4 Des *TRPM1* Gens; c.215 A>G

Ausgehend von dem konsanguinen Elternpaar NB1-1 und NB1-2 im Hinblick auf die Mutation im Exon 4; c.215 A>G, rs200514769, pY72C, NM_002420.5.1, Allel Frequenz: 0.0001823 (ExAC-Database, 23.6.17), wird ein autosomal rezessiver Erbgang auf die Nachkommen NB1-3, NB1-4, NB1-5 ersichtlich (Abbildung 17). NB1-1 und NB1-2 sind beide für die Mutation c.215 A>G am Exon 4 heterozygot. Die Aufteilung auf die Nachkommen folgt dem Modell des autosomal rezessiven Erbgangs.

Bei beiden betroffenen Söhnen NB1-3 und NB1-4 liegt die Mutation homozygot vor. Ihre nicht betroffene Schwester hingegen trägt die Mutation, genau wie ihre Eltern, heterozygot (Abbildung 14).

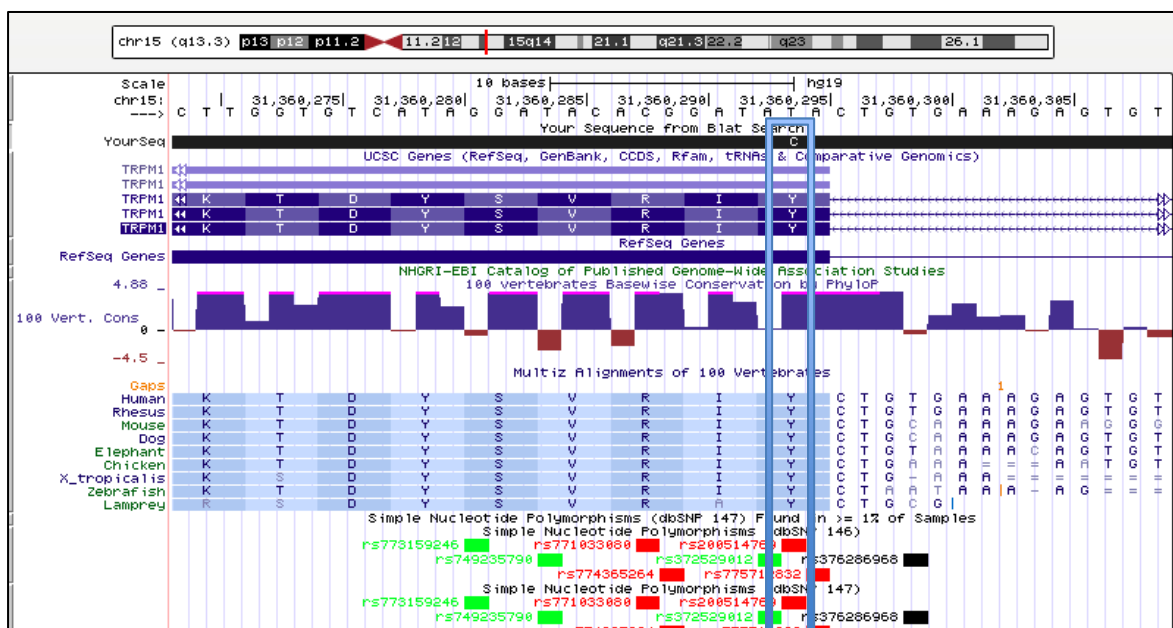


Abbildung 13 c.215A>G, hg 19 ,NB1-4, konversierter Sequenzabschnitt, UCSC Genombrowser, Blat Search,

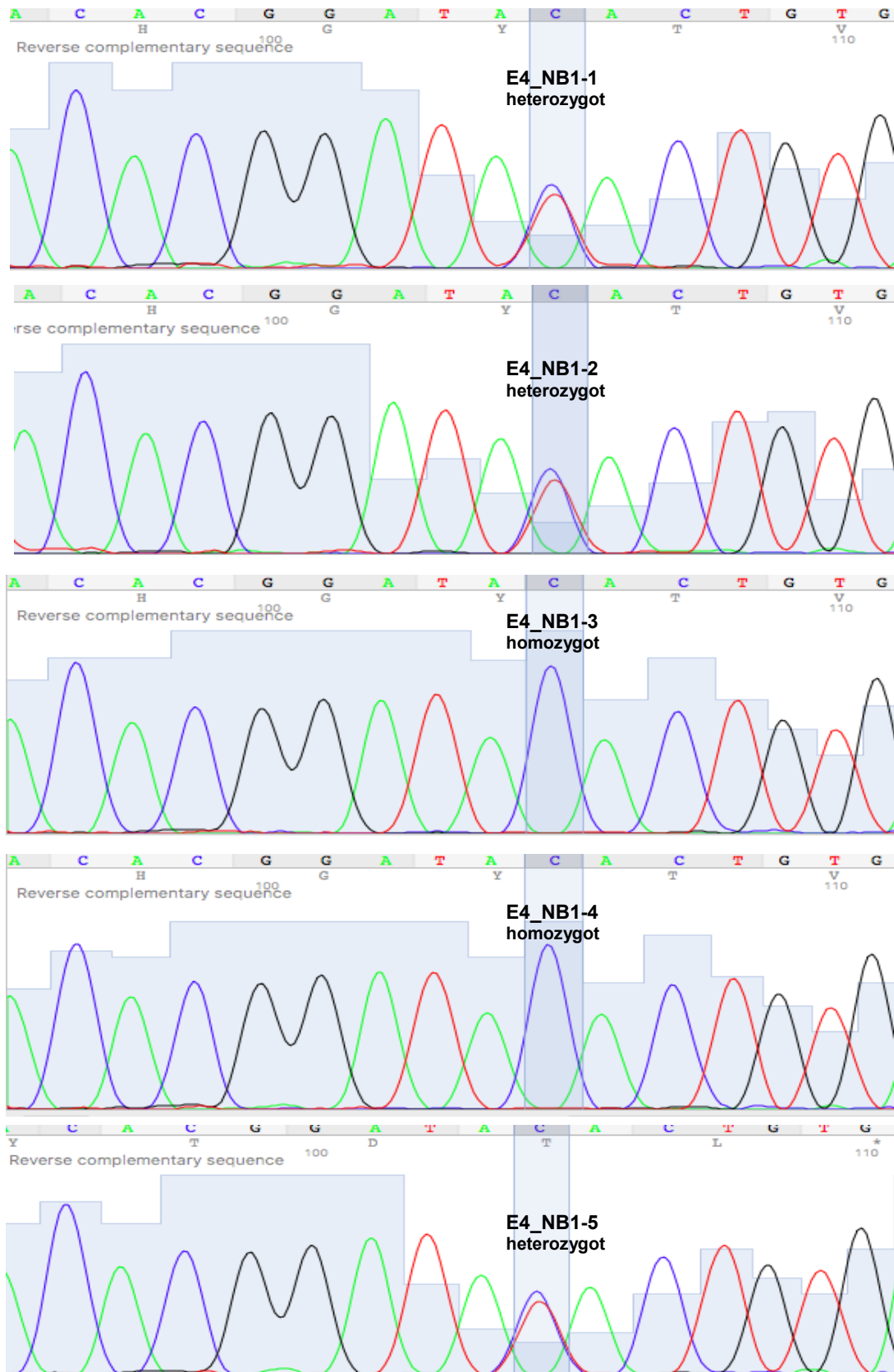


Abbildung 14 DNA Sequenz von Exon 4 des *TRPM1* Gens, linke Stammbaum-Hälfte, Software 4Peaks for Mac

Der Abbildung 15 kann man entnehmen, dass der Vater (NB1-12) für die Mutation c.215 A>G am Exon 4 heterozygot ist und die Mutter (NB1-13) eine homozygote WT-Variante trägt.

Die blutsverwandten Eltern haben acht gemeinsame Kinder, von denen zwei von der Krankheit betroffen sind (NB1-7 und NB1-6).

NB1-7 ist heterozygot für die c.215 A>G Mutation am Exon 4 und sein ebenfalls kranker Bruder (NB1-6) homozygot WT.

In den weiteren Individuen ist die Krankheit nicht manifest.

NB1-11, NB1-9 und NB1-8 tragen homozygote WT-Varianten, wo hingegen NB1-10 heterozygoter Träger der Variante ist.

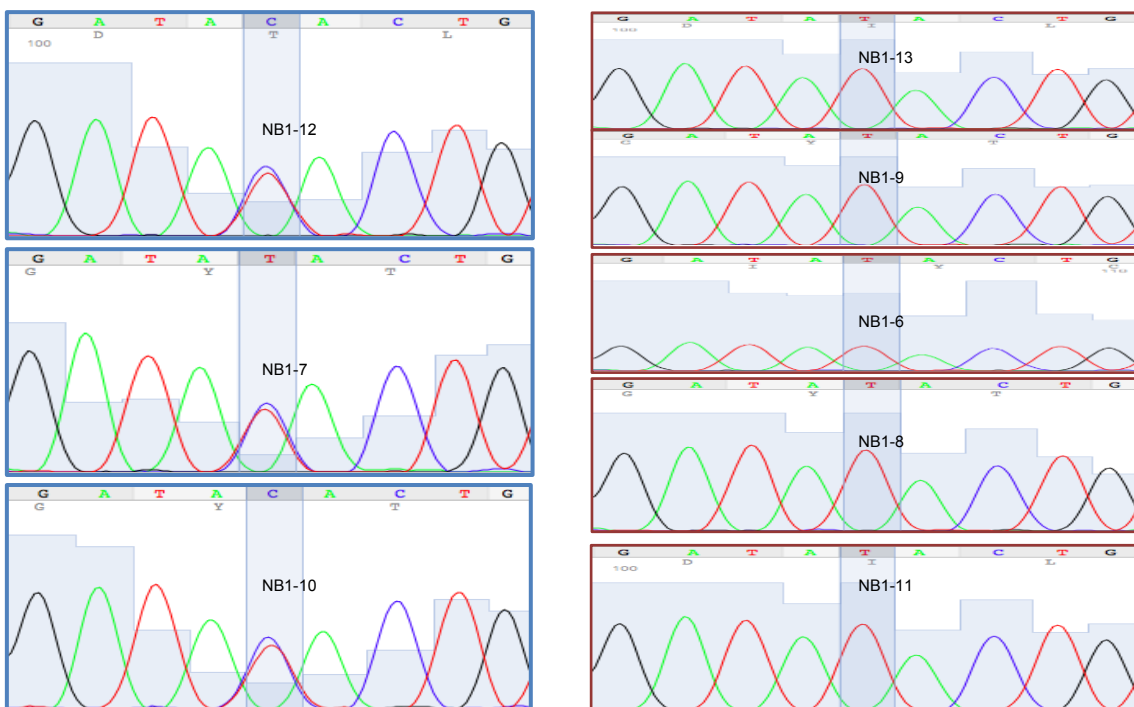


Abbildung 15 DNA Sequenzen von Exon 4 des *TRPM1* Gens, rechte Stammbaum-Hälfte, Revers komplementäre Sequenz (Blau: heterozygot; Rot: homozygot), Software 4Peaks for Mac

15.2 Segregation der Mutation im Exon 12 Des *TRPM1* Gens, c.1450G>A

Keiner der Familienmitglieder der linken Stammbaumseite (NB1-1 bis NB1-5) ist Träger der Mutation NM_002420.5, c.1450 G>A; pG484R, rs 770197134, Exon 12 des *TRPM1*, Allel Frequenz: 2,484e-05 (ExAC-Database, 23.6.17).

In NB1-13 kommt die Mutation heterozygot vor, dies macht diese Person zum Träger der Variante.

Weitere heterozygote nicht betroffene Träger der Mutation sind NB1-11 und NB1-8. Der betroffene Sohn NB1-7 ist ebenfalls heterozygoter Träger dieser Variante.

Der Vater (NB1-12) wie auch seine beiden nicht betroffenen Söhne (NB1-10 und NB1-9) entsprechen einer homozygoten WT-Variante.

Der Merkmalsträger NB1-6 entspricht ebenfalls einer homozygoten WT-Variante (Abbildung 16).

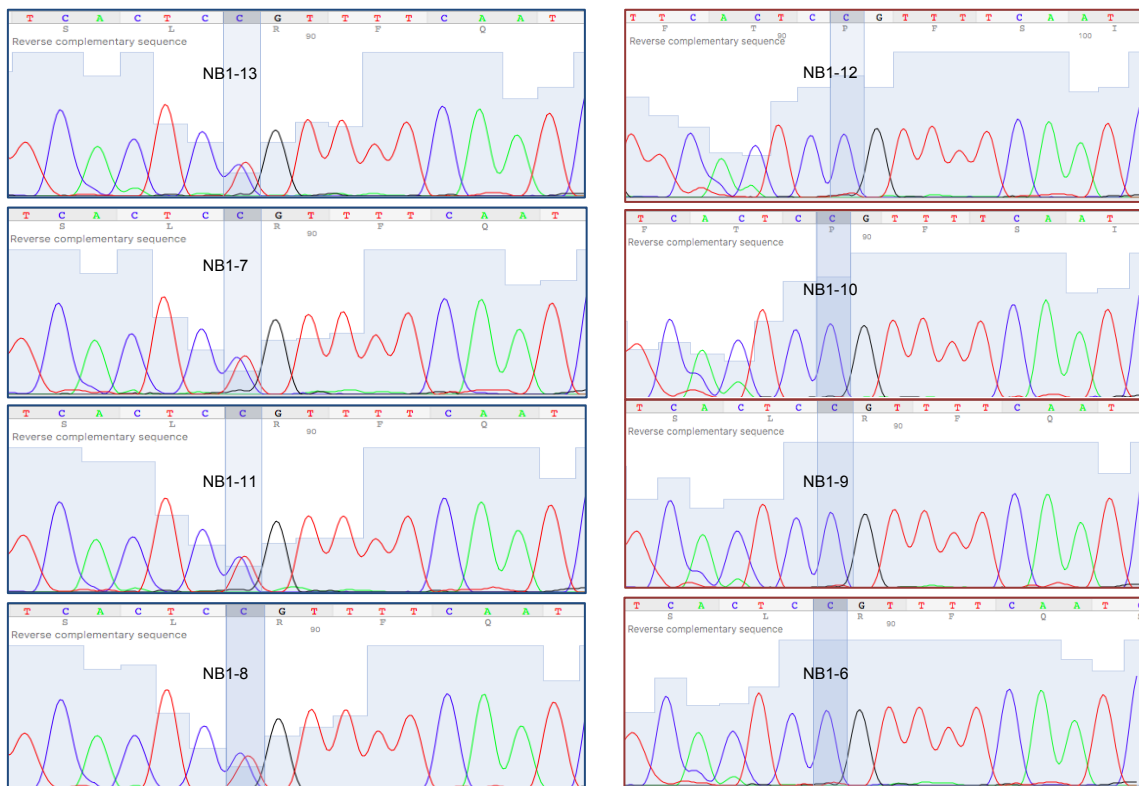


Abbildung 16 DNA Sequenzen des Exon 12 des *TRPM1* Gens, rechte Stammbaum-Hälfte, Revers komplementäre Sequenz (Blau: heterozygot, Rot: homozygot), Software 4Peak for Mac

15.3 Stammbaum nach der Segregationsanalyse

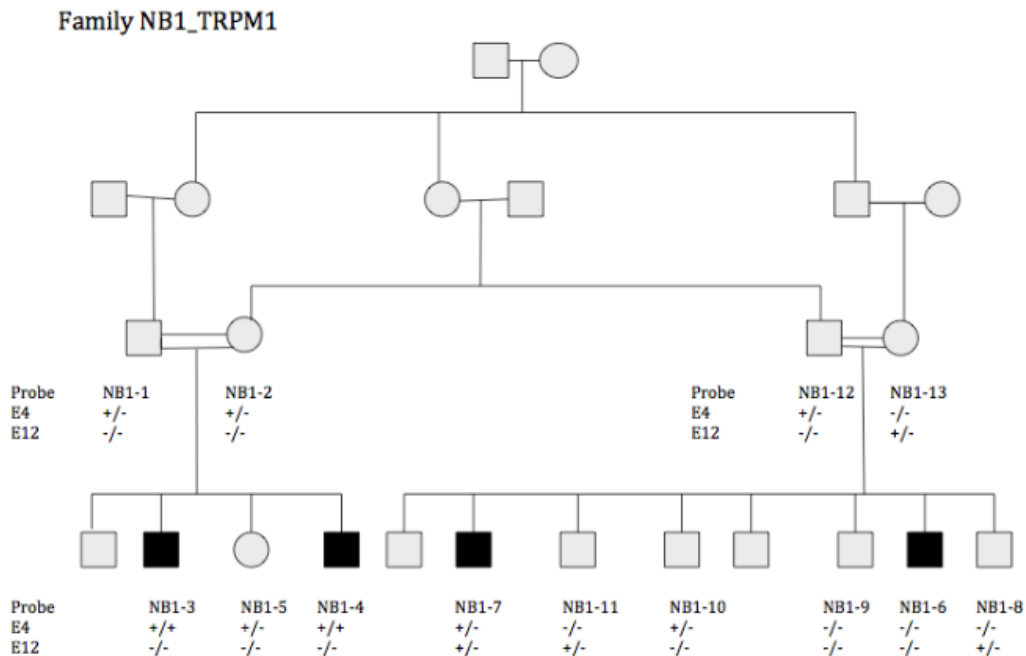


Abbildung 17 Stammbaum nach der Segregationsanalyse der Mutationen am Exon 4 und Exon 12

Eine bessere Übersicht der Segregation der beiden Mutationen am Exon 4 und Exon 12 im *TRPM1* Gen liefert der Stammbaum in Abbildung 17.

Hier wird deutlich, dass beim erkrankten Individuum NB1-7 eine komplexe Heterozygotie (auch Compound-Heterozygotie genannt) bezüglich der beiden Varianten in *TRPM1* vorliegt.

Für das betroffene Individuum NB1-6 konnte keine der beiden familiären Varianten in *TRPM1* nachgewiesen werden.

16 Diskussion

Nach dem Betrachten des Stammbaums (Abbildung 17) kann ein dominanter Erbgang ausgeschlossen werden, da nicht jede Generation von der Erkrankung betroffen ist.

Des Weiteren können X- und Y-chromosomale Erbgänge formalgenetisch weitestgehend ausgeschlossen werden.

Aufgrund der gegebenen Konsanguinität ist von einem autosomal rezessiven Erbgang auszugehen.

Die Symptome der erkrankten Familienmitglieder sind ein kompletter Verlust der Sehkraft in Dunkelheit und eine starke Kurzsichtigkeit bei Tag. Die Betroffenen leiden an sonst keiner Auffälligkeit und die Erkrankung scheint nicht progressiv zu sein was auf CSNB schließen lässt (Informationen von Dr. Muzammil Ahmad Khan, Hamad Medical Corporation Doha, Qatar).

Frühere Analysen der NB1-Familie ergaben homozygote Bereiche an den Chromosomen 8, 10,12 und 15. Darunter zwei Chromosomen (Chromosom 8 und 15) die Gene tragen, welche mit Augenerkrankungen zusammenhängen (*RP1* und *TRPM1*) (Gehmacher, 2015).

Das *TRPM1* Gen befindet sich am Chromosom 15 und stimmt mit der Verdachtsdiagnose CSNB überein.

Insgesamt werden 35 Mutationen im *TRPM1* Gen mit Nachtblindheit in Verbindung gebracht und als krankheitsverursachend mit CSNB klassifiziert (Li et al. 2009, Audo et al. 2009, van Genderen et al. 2009, Nakamura et al. 2010).

Bei den meisten Mutationen in diesem Gen handelt es sich um Missense/Nonsense- Mutationen aber auch um Splice-Mutationen und kleine Deletionen (HGMD Datenbank aufgerufen am 11.5.2017 (Stenson et al. 2003)).

Wie bereits ausführlich beschreiben, ist *TRPM1* eine wichtige Komponente des Kationenkanals, welcher ausschlaggebend für die Depolarisierung der ON-Bipolarzellen der Retina und somit unentbehrlich für die visuelle Verarbeitung ist. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die in der Familie gefundenen Mutationen im *TRPM1* Gen in enger Korrelation mit den Symptomen der Erkrankung stehen.

Im Falle einer konsanguinen Familie ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass beide Elternpaare Mutationsträger sind. Die leiblichen Eltern der Betroffenen könnten Träger der Mutation sein und diese an ihre Nachkommen vererbt haben. In so einem Fall würde man die Manifestation der Erkrankung leicht nachvollziehen können. Dies ist tatsächlich in der linken Stammbaum-Hälfte ersichtlich.

Bei der Mutation c.215A>G am Exon 4 des *TRPM1* handelt es sich um einen Einzelbasenaustausch von Adenin zu Guanin. Dieser resultiert in einem Aminosäureaustausch von Tyrosin zu Cystein und wird laut der HGMD-Datenbank (Stenson et al. 2003) als eine krankheitsverursachende Mutation eingestuft. Diese Mutation führt wahrscheinlich zu einer Veränderung der Splice-Seite und somit zu einer Modifikation der Proteineigenschaften (MutationTaster, Schwarz et al. 2014).

In einer compound-heterozygoten Form wurde diese Mutation bereits in einem französischen und italienischen Patienten mit CSNB beschrieben (Audo et al. 2009).

Betrachtet man die linke Stammbau-Seite der NB1 Familie bezüglich der Mutation c.215A>G in Exon 4 des *TRPM1* Gens, so Segregiert diese Mutation mit der Erkrankung.

Nur bei homozygoten Nachkommen der heterozygoten Eltern kommt es zur Manifestation der Krankheit. Heterozygote als auch WT homozygote Nachkommen sind symptomfrei.

Die Analyse der rechten Hälfte des Familienstammbaums in Bezug auf die Mutation c.215A>G am Exon 4 zeigte, dass alle gesunde Familienmitglieder entweder heterozygot oder homozygot für das WT Allel für diese Mutation sind. Dabei bilden die Betroffenen NB1-6 und NB1-7 eine Ausnahme, da

NB1-6 ein homozygote WT und NB-7 ein heterozygoter Träger der Variante ist.

Dies legt nahe, dass vielleicht eine weitere Mutation im *TRPM1* Gen in

Kombination mit c.215A>G für die Erkrankung verantwortlich ist.

Da jedoch NB1-6 kein Träger der c.215A>G Variante ist, kann man diesbezüglich

nur Vermutungen aufstellen. Dies könnte auch bedeuten, dass bei diesem

Individuum eine Phänokopie vorliegt, oder ein anderer Genlocus für die

Erkrankung verantwortlich ist.

Bei der Probe NB1-6 zeigte sich jedoch eine Unstimmigkeit zu den

hervorgegangenen Untersuchungen (siehe Masterarbeit Gehmacher, 2015).

Damals würde der Betroffene als heterozygot für die Mutation c.215A>G am Exon

4 beschrieben und sei diesbezüglich eine weitere Abklärung nötig, da dies nicht

seinen Phänotyp erklärt (Siehe Text weiter unten). Die Heterozygotie konnte bei

der erneuten Analyse der Probe nicht wiedergefunden werden, was durch eine

mögliche Probenverwechslung bei der Probenabnahme oder eine falsche

Beschriftung der Probe bedingt sein könnte.

Es sollte daher in jedem Fall neuerlich eine Probe abgenommen werden um diese

diskrepanten Ergebnisse abzuklären.

Betrachtet man die Ergebnisse der Segregationsanalyse für die Mutation

c.1450G>A im Exon 12 des *TRPM1* Gens, so lässt sich daraus keine klare

Aussage ableiten.

Diese Mutation ist ein Einzelbasenaustausch von Guanin nach Adenin und in

weiterer Folge die Änderung der Aminosäuren von Glycin nach Arginin. Sie wird

gleichfalls von der Software „MutationTaster“ als krankheitsverursachend

eingestuft (Schwarz et al. 2014). Die Pathogenität dieser Variante kann letztlich

nur durch funktionelle Experimente oder mit einem geeigneten Tiermodell

verifiziert werden.

NB1-13 ist heterozygote Trägerin dieser Variante und hat diese sichtlich auf vier ihrer Nachkommen (NB1-7, NB1-8, NB1-10, NB1-11) weitervererbt.

Nur einer (NB1-7) der Mutationsträger ist von CSNB betroffen.

Alle vier Nachkommen sind ebenso wie die Mutter heterozygot im Hinblick auf die

Mutation c.1450G>A. NB1-8, NB1-10 und NB1-11 sind jedoch für die Mutation

c.215A>G am Exon 4 des gleichen Gens homozygot WT. Nur NB1-7 ist Träger beider Varianten.

Die gewonnenen molekulargenetischen Ergebnisse für NB1-6 sind zum jetzigen Stand mit der vorliegenden Erkrankung nicht vereinbar. Dieser Betroffene trägt nach dieser Analyse weder die Mutation am Exon 4 noch am Exon 12. Dies könnte natürlich auf einen Fehler in der Sequenzierung hindeuten. Da jedoch die Sequenzierung der Probe im Zuge dieser Arbeit separat und zweifach erfolgte und leider in der vorangegangenen Arbeit kein Sequenzierergebnis zum Vergleich vorliegt, liegt es nahe, dass das Individuum NB1-6 homozygot WT für beide Varianten ist.

Würde man davon ausgehen, dass der NB1-6 Betroffene heterozygot für die Mutation am Exon 4 sei, so müsste eine zusätzliche bisher noch nicht beschriebene Mutation vorhanden sein, um letztlich das Krankheitsbild erklären zu können. Dies gilt natürlich gleichfalls für den Fall, dass NB1-6 homozygot WT für diese Mutation sei. In beiden Fällen könnten weitere Mutationen im gleichen Gen für seine diagnostizierte CSNB verantwortlich sein.

Es wäre auch sicherlich anzuraten eine weitere klinische Evaluierung des zuvor diagnostizierten Krankheitsbildes vornehmen zu lassen, um etwaige Phänokopie ausschließen zu können. Es könnte sich auch um eine unabhängig von der bisher diagnostizierten familiären CSNB vererbte Erkrankung handeln.

Eine „Whole Exom Sequenzierung“ des Individuums NB1-6 wäre in diesem Fall sinnvoll.

Eine letztliche genetische Abklärung der CSNB für diese Familie scheint trotz umfassender genetischer Analysen nur möglich, wenn sich die Familienmitglieder zu einer eingehenderen ophthalmologischen Untersuchung bereiterklären und eventuell weitere Familienmitglieder rekrutiert werden können. Dies könnte dazu führen, die zugrundeliegenden molekular-genetischen Ursache für die Erkrankung abzuklären und der Familie eine adäquate genetische Beratung in Zukunft anbieten zu können.

17 Literaturverzeichnis

- Agosto, M. A., Zhang, Z., He, F., Anastassov, I. A., Wright, S. J., McGehee, J., et al. (2014). Oligomeric state of purified transient receptor potential melastatin-1 (TRPM1), a protein essential for dim light vision. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(39), 27019-27033.
- Ajmal, M., Khan, M. I., Neveling, K., Khan, Y. M., Ali, S. H., Ahmed, W., et al. (2012). Novel mutations in RDH5 cause fundus albipunctatus in two consanguineous pakistani families. *Molecular Vision*, 18, 1558-1571.
- Audo, I., Bujakowska, K., Orhan, E., Poloschek, C. M., Defoort-Dhellemmes, S., Drumare, I., et al. (2012). Whole-exome sequencing identifies mutations in GPR179 leading to autosomal-recessive complete congenital stationary night blindness. *American Journal of Human Genetics*, 90(2), 321-330.
- Audo, I., Kohl, S., Leroy, B.P., Munier, F.L., Guillonneau, X., Mohand-Said, S., Bujakowska, K., Nandrot, E.F., Lorenz, B., Preising, M., Kellner, U., Renner, A.B., Bernd, A., Antonio, A., Moskova-Doumanova, V., Lancelot, M.E., Poloschek, C.M., Drumare, I., Defoort-Dhellemmes, S., Wissinger, B., Leveillard, T., Hamel, C.P., Schorderet, D.F., De Baere, E., Berger, W., Jacobson, S.G., Zrenner, E., Sahel, J.A., Bhattacharya, S.S. & Zeitz, C. 2009, "TRPM1 is mutated in patients with autosomal-recessive complete congenital stationary night blindness", *American Journal of Human Genetics*, vol. 85, no. 5, pp. 720-729.
- Baden, Tom, Esposti, Federico, Nikolaev, Anton, & Lagnado, Leon.
- Barlow, H. B., Hill, R. M., & Levick, W. R. (1964). Retinal ganglion cells responding selectively to direction and speed of image motion in the rabbit. *The Journal of Physiology*, 173, 377-407.
- Bellone, R.R., Brooks, S.A., Sandmeyer, L., Murphy, B.A., Forsyth, G., Archer, S., Bailey, E. & Grahn, B. 2008, "Differential gene expression of TRPM1, the potential cause of congenital stationary night blindness and coat spotting patterns (LP) in the Appaloosa horse (*Equus caballus*)", *Genetics*, vol. 179, no. 4, pp. 1861-1870.
- Bellone, R. R., Forsyth, G., Leeb, T., Archer, S., Sigurdsson, S., Imsland, F., et al. (2010). Fine-mapping and mutation analysis of TRPM1: A candidate gene for leopard complex (LP) spotting and congenital stationary night blindness in horses. *Briefings in Functional Genomics*, 9(3), 193-207.
- Bennett, R. L., Hudgins, L., Smith, C. O., & Motulsky, A. G. (1999). Inconsistencies in genetic counseling and screening for consanguineous couples and their offspring: The need for practice guidelines. *Genetics in Medicine : Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 1(6), 286-292.

- Bittles, A. (2001). Consanguinity and its relevance to clinical genetics. *Clinical Genetics*, 60(2), 89-98.
- Borghuis, B. G., Looger, L. L., Tomita, S., & Demb, J. B. (2014). Kainate receptors mediate signaling in both transient and sustained OFF bipolar cell pathways in mouse retina. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(18), 6128-6139.
- Brown, R. L., Xiong, W. H., Peters, J. H., Tekmen-Clark, M., Strycharska-Orczyk, I., Reed, B. T., et al. (2015). TRPM3 expression in mouse retina. *PLoS One*, 10(2), e0117615.
- Cao, Y., Masuho, I., Okawa, H., Xie, K., Asami, J., Kammermeier, P. J., et al. (2009). Retina-specific GTPase accelerator RGS11/G beta 5S/R9AP is a constitutive heterotrimer selectively targeted to mGluR6 in ON-bipolar neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(29), 9301-9313.
- Cao, Y., Sarria, I., Fehlhauer, K. E., Kamasawa, N., Orlandi, C., James, K. N., et al. (2015). Mechanism for selective synaptic wiring of rod photoreceptors into the retinal circuitry and its role in vision. *Neuron*, 87(6), 1248-1260.
- Cleland, B. G., & Levick, W. R. (1974). Brisk and sluggish concentrically organized ganglion cells in the cat's retina. *The Journal of Physiology*, 240(2), 421-456.
- de Wit, J., & Ghosh, A. (2014). Control of neural circuit formation by leucine-rich repeat proteins. *Trends in Neurosciences*, 37(10), 539-550.
- Deeds, J., Cronin, F. & Duncan, L.M. 2000, "Patterns of melastatin mRNA expression in melanocytic tumors", *Human pathology*, vol. 31, no. 11, pp. 1346-1356.
- Der Kaloustian, V. M., & Baghdassarian, S. A. (1972). The autosomal recessive variety of congenital stationary night-blindness with myopia. *Journal of Medical Genetics*, 9(1), 67-69.
- Dhingra, A., Lyubarsky, A., Jiang, M., Pugh, E.N., Jr, Birnbaumer, L., Sterling, P. & Vardi, N. 2000, "The light response of ON bipolar neurons requires G[alpha]o", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 20, no. 24, pp. 9053-9058.
- Dhingra, A., Ramakrishnan, H., Neinstein, A., Fina, M. E., Xu, Y., Li, J., et al. (2012). Gbeta3 is required for normal light ON responses and synaptic maintenance. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(33), 11343-11355.

- Duncan, L.M., Deeds, J., Hunter, J., Shao, J., Holmgren, L.M., Woolf, E.A., Tepper, R.I. & Shyjan, A.W. 1998, "Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis", *Cancer research*, vol. 58, no. 7, pp. 1515-1520.
- Eisenberger, T., Neuhaus, C., Khan, A.O., Decker, C., Preising, M.N., Friedburg, C., Bieg, A., Gliem, M., Issa, P.C., Holz, F.G., Baig, S.M., Hellenbroich, Y., Galvez, A., Platzer, K., Wollnik, B., Laddach, N., Ghaffari, S.R., Rafati, M., Botzenhart, E., Tinschert, S., Börger, D., Bohring, A., Schreml, J., Körtge-Jung, S., Schell-Apacik, C., Bakur, K., Al- Aama, J., Neuhann, T., Herkenrath, P., Nürnberg, G., Nürnberg, P., Davis, J.S., Gal, A., Bergmann, C., Lorenz, B. & Bolz, H.J. 2013, "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*, vol. 8, no. 11, pp. e78496.
- Farrow, K., & Masland, R. H. (2011). Physiological clustering of visual channels in the mouse retina. *Journal of Neurophysiology*, 105(4), 1516-1530.
- Gayet-Primo, J., & Puthussery, T. (2015). Alterations in kainate receptor and TRPM1 localization in bipolar cells after retinal photoreceptor degeneration. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 486.
- Gehmacher, Katharina Theresa, Molekulargenetische Charakterisierung retinaler Erkrankungen bei zwei konsanguinen pakistanischen Familien, 2015
- Gilissen, C., Hoischen, A., Brunner, H. G., & Veltman, J. A. (2012). Disease gene identification strategies for exome sequencing. *European Journal of Human Genetics : EJHG*, 20(5), 490-497.
- Gregg, R. G., Kamermans, M., Klooster, J., Lukasiewicz, P. D., Peachey, N. S., Vessey, K. A., et al. (2007). Nyctalopin expression in retinal bipolar cells restores visual function in a mouse model of complete X-linked congenital stationary night blindness. *Journal of Neurophysiology*, 98(5), 3023-3033.
- Hamamy, H. 2012, "Consanguineous marriages: Preconception consultation in primary health care settings", *Journal of Community Genetics*, vol. 3, no. 3, pp. 185-192.
- Harteneck, C., Klose, C. & Krautwurst, D. 2011, "Synthetic modulators of TRP channel activity", *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 704, pp. 87-106.
- Hoek, K.S., Schlegel, N.C., Eichhoff, O.M., Widmer, D.S., Praetorius, C., Einarsson, S.O., Valgeirsdottir, S., Bergsteinsdottir, K., Schepsky, A., Dummer, R. & Steingrimsdottir, E. 2008, "Novel MITF targets identified using a two-step DNA microarray strategy", *Pigment cell & melanoma research*, vol. 21, no. 6, pp. 665-676.

- Hunter, J.J., Shao, J., Smutko, J.S., Dussault, B.J., Nagle, D.L., Woolf, E.A., Holmgren, L.M., Moore, K.J. & Shyjan, A.W. 1998, "Chromosomal localization and genomic characterization of the mouse melastatin gene (*Mln1*)", *Genomics*, vol. 54, no. 1, pp. 116-123.
- Ichinose, T., & Hellmer, C. B. (2016). Differential signalling and glutamate receptor compositions in the OFF bipolar cell types in the mouse retina. *The Journal of Physiology*, 594(4), 883-894.
- Klose, C., Straub, I., Riehle, M., Ranta, F., Krautwurst, D., Ullrich, S., et al. (2011). Fenamates as TRP channel blockers: Mefenamic acid selectively blocks TRPM3. *British Journal of Pharmacology*, 162(8), 1757-1769.
- Koike, C., Obara, T., Uriu, Y., Numata, T., Sanuki, R., Miyata, K., Koyasu, T., Ueno, S., Funabiki, K., Tani, A., Ueda, H., Kondo, M., Mori, Y., Tachibana, M. & Furukawa, T. 2010, "TRPM1 is a component of the retinal ON bipolar cell transduction channel in the mGluR6 cascade", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, no. 1, pp. 332-337.
- Kondo, M., Sanuki, R., Ueno, S., Nishizawa, Y., Hashimoto, N., Ohguro, H., et al. (2011). Identification of autoantibodies against TRPM1 in patients with paraneoplastic retinopathy associated with ON bipolar cell dysfunction. *PLoS One*, 6(5), e19911.
- Kraft, R., & Harteneck, C. (2005). The mammalian melastatin-related transient receptor potential cation channels: An overview. *Pflügers Archiv : European Journal of Physiology*, 451(1), 204-211.
- Krizaj, D., Huang, W., Furukawa, T., Punzo, C., & Xing, W. (2010). Plasticity of TRPM1 expression and localization in the wild type and degenerating mouse retina. *Vision Research*, 50(23), 2460-2465.
- Li, Z., Sergouniotis, P.I., Michaelides, M., Mackay, D.S., Wright, G.A., Devery, S., Moore, A.T., Holder, G.E., Robson, A.G. & Webster, A.R. 2009, "Recessive mutations of the gene TRPM1 abrogate ON bipolar cell function and cause complete congenital stationary night blindness in humans", *American Journal of Human Genetics*, vol. 85, no. 5, pp. 711-719.
- Mace, E., Caplette, R., Marre, O., Sengupta, A., Chaffiol, A., Barbe, P., et al. (2015). Targeting channelrhodopsin-2 to ON-bipolar cells with vitreally administered AAV restores ON and OFF visual responses in blind mice. *Molecular Therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 23(1), 7-16.

- Maddox, D. M., Vessey, K. A., Yarbrough, G. L., Invergo, B. M., Cantrell, D. R., Inayat, S., et al. (2008). Allelic variance between GRM6 mutants, Grm6nob3 and Grm6nob4 results in differences in retinal ganglion cell visual responses. *The Journal of Physiology*, 586(18), 4409-4424.
- Maria, M., Ajmal, M., Azam, M., Waheed, N. K., Siddiqui, S. N., Mustafa, B., et al. (2015). Homozygosity mapping and targeted sanger sequencing reveal genetic defects underlying inherited retinal disease in families from pakistan. *PloS One*, 10(3), e0119806.
- Masland, R. H. (2012). The neuronal organization of the retina. *Neuron*, 76(2), 266-280.
- Masu, M., Iwakabe, H., Tagawa, Y., Miyoshi, T., Yamashita, M., Fukuda, Y., Sasaki, H., Hiroi, K., Nakamura, Y. & Shigemoto, R. 1995, "Specific deficit of the ON response in visual transmission by targeted disruption of the mGluR6 gene", *Cell*, vol. 80, no. 5, pp. 757-765.
- Miller, A.J., Du, J., Rowan, S., Hershey, C.L., Widlund, H.R. & Fisher, D.E. 2004, "Transcriptional regulation of the melanoma prognostic marker melastatin (TRPM1) by MITF in melanocytes and melanoma", *Cancer research*, vol. 64, no. 2, pp. 509-516.
- Morgans, C.W., Zhang, J., Jeffrey, B.G., Nelson, S.M., Burke, N.S., Duvoisin, R.M. & Brown, R.L. 2009, "TRPM1 is required for the depolarizing light response in retinal ON-bipolar cells", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 106, no. 45, pp. 19174-19178.
- Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L., & Wold, B. (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-seq. *Nature Methods*, 5(7), 621-628.
- Naeem, M. A., Chavali, V. R., Ali, S., Iqbal, M., Riazuddin, S., Khan, S. N., et al. (2012). GNAT1 associated with autosomal recessive congenital stationary night blindness. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 53(3), 1353-1361.
- Nakamura, M., Sanuki, R., Yasuma, T.R., Onishi, A., Nishiguchi, K.M., Koike, C., Kadowaki, M., Kondo, M., Miyake, Y. & Furukawa, T. 2010, "TRPM1 mutations are associated with the complete form of congenital stationary night blindness", *Molecular vision*, vol. 16, pp. 425-437.
- Neuille, M., Cao, Y., Caplette, R., Guerrero-Given, D., Thomas, C., Kamasawa, N., et al. (2017). LRIT3 differentially affects connectivity and synaptic transmission of cones to ON- and OFF-bipolar cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 58(3), 1768-1778.
- Neuille, M., El Shamieh, S., Orhan, E., Michiels, C., Antonio, A., Lancelot, M. E., et al. (2014). Lrit3 deficient mouse (nob6): A novel model of complete congenital stationary night blindness (cCSNB). *PloS One*, 9(3), e90342.

- Neuille, M., Morgans, C. W., Cao, Y., Orhan, E., Michiels, C., Sahel, J. A., et al. (2015). LRIT3 is essential to localize TRPM1 to the dendritic tips of depolarizing bipolar cells and may play a role in cone synapse formation. *The European Journal of Neuroscience*, 42(3), 1966-1975.
- Peachey, N. S., Pearing, J. N., Bojang, P., Jr, Hirschtritt, M. E., Sturgill-Short, G., Ray, T. A., et al. (2012). Depolarizing bipolar cell dysfunction due to a Trpm1 point mutation. *Journal of Neurophysiology*, 108(9), 2442-2451.
- Peachey, N. S., Ray, T. A., Florijn, R., Rowe, L. B., Sjoerdsma, T., Contreras-Alcantara, S., et al. (2012). GPR179 is required for depolarizing bipolar cell function and is mutated in autosomal-recessive complete congenital stationary night blindness. *American Journal of Human Genetics*, 90(2), 331-339.
- Pierce, E.A., Quinn, T., Meehan, T., McGee, T.L., Berson, E.L. & Dryja, T.P. 1999, "Mutations in a gene encoding a new oxygen-regulated photoreceptor protein cause dominant retinitis pigmentosa", *Nature genetics*, vol. 22, no. 3, pp. 248-254.
- Pinto, L. H., Vitaterna, M. H., Shimomura, K., Siepka, S. M., Balannik, V., McDearmon, E. L., et al. (2007). Generation, identification and functional characterization of the nob4 mutation of Grm6 in the mouse. *Visual Neuroscience*, 24(1), 111-123.
- Qian, H., Ji, R., Gregg, R. G., & Peachey, N. S. (2015). Identification of a new mutant allele, Grm6(nob7), for complete congenital stationary night blindness. *Visual Neuroscience*, 32, E004.
- Renteria, R. C., Tian, N., Cang, J., Nakanishi, S., Stryker, M. P., & Copenhagen, D. R. (2006). Intrinsic ON responses of the retinal OFF pathway are suppressed by the ON pathway. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(46), 11857-11869.
- Sandmeyer, L. S., Bellone, R. R., Archer, S., Bauer, B. S., Nelson, J., Forsyth, G., et al. (2012). Congenital stationary night blindness is associated with the leopard complex in the miniature horse. *Veterinary Ophthalmology*, 15(1), 18-22.
- Sandmeyer, L. S., Grahn, B. H., & Breaux, C. B. (2006). Diagnostic ophthalmology. congenital stationary night blindness (CSNB). *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne*, 47(11), 1131, 1133.
- Schmidt, T. M. (2009). Role of melastatin-related transient receptor potential channel TRPM1 in the retina: Clues from horses and mice. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(38), 11720-11722.

- Schwarz, J.M., Cooper, D.N., Schuelke, M. & Seelow, D. 2014, "MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age", *Nat Meth*, vol. 11, no. 4, pp. 361- 362.
- Scott, M. L., John, E. E., Bellone, R. R., Ching, J. C., Loewen, M. E., Sandmeyer, L. S., et al. (2016). Redundant contribution of a transient receptor potential cation channel member 1 exon 11 single nucleotide polymorphism to equine congenital stationary night blindness. *BMC Veterinary Research*, 12(1), 121-016-0745-1.
- Stenson, P.D., Ball, E.V., Mort, M., Phillips, A.D., Shiel, J.A., Thomas, N.S.T., Abeyasinghe, S., Krawczak, M. & Cooper, D.N. 2003, "Human Gene Mutation Database (HGMD®): 2003 update", *Human mutation*, vol. 21, no. 6, pp. 577-581.
- Sumbul, U., Song, S., McCulloch, K., Becker, M., Lin, B., Sanes, J. R., et al. (2014). A genetic and computational approach to structurally classify neuronal types. *Nature Communications*, 5, 3512.
- Thompson, D. A., Lyons, R. J., Liasis, A., Russell-Eggitt, I., Jagle, H., & Grunewald, S. (2012). Retinal on-pathway deficit in congenital disorder of glycosylation due to phosphomannomutase deficiency. *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill.: 1960)*, 130(6), 712-719.
- Tummala, S. R., Dhingra, A., Fina, M. E., Li, J. J., Ramakrishnan, H., & Vardi, N. (2016). Lack of mGluR6-related cascade elements leads to retrograde trans-synaptic effects on rod photoreceptor synapses via matrix-associated proteins. *The European Journal of Neuroscience*, 43(11), 1509-1522.
- Ueno, S., Nishiguchi, K. M., Tanioka, H., Enomoto, A., Yamanouchi, T., Kondo, M., et al. (2013). Degeneration of retinal on bipolar cells induced by serum including autoantibody against TRPM1 in mouse model of paraneoplastic retinopathy. *PLoS One*, 8(11), e81507.
- Ullah, E., Nadeem Saqib, M. A., Sajid, S., Shah, N., Zubair, M., Khan, M. A., et al. (2016). Genetic analysis of consanguineous families presenting with congenital ocular defects. *Experimental Eye Research*, 146, 163-171.
- van Genderen, M.M., Bijveld, M.M., Claassen, Y.B., Florijn, R.J., Pearing, J.N., Meire, F.M., McCall, M.A., Riemsdag, F.C., Gregg, R.G., Bergen, A.A. & Kamermans, M. 2009, "Mutations in TRPM1 are a common cause of complete congenital stationary night blindness", *American Journal of Human Genetics*, vol. 85, no. 5, pp. 730-736.
- Volgyi, B., Chheda, S., & Bloomfield, S. A. (2009). Tracer coupling patterns of the ganglion cell subtypes in the mouse retina. *The Journal of Comparative Neurology*, 512(5), 664-687.

- Witzel, D. A., Smith, E. L., Wilson, R. D., & Aguirre, G. D. (1978). Congenital stationary night blindness: An animal model. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 17(8), 788-795.
- Xu, Y., Dhingra, A., Fina, M.E., Koike, C., Furukawa, T. & Vardi, N. 2012, "mGluR6 deletion renders the TRPM1 channel in retina inactive", *Journal of neurophysiology*, vol. 107, no. 3, pp. 948-957.
- Xu, Y., Orlandi, C., Cao, Y., Yang, S., Choi, C. I., Pagadala, V., et al. (2016). The TRPM1 channel in ON-bipolar cells is gated by both the alpha and the betagamma subunits of the G-protein go. *Scientific Reports*, 6, 20940.
- Yamashita, M. & Wassle, H. 1991, "Responses of rod bipolar cells isolated from the rat retina to the glutamate agonist 2-amino-4-phosphonobutyric acid (APB)", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 11, no. 8, pp. 2372-2382.
- Zeit, C., Jacobson, S. G., Hamel, C. P., Bujakowska, K., Neuille, M., Orhan, E., et al. (2013). Whole-exome sequencing identifies LRIT3 mutations as a cause of autosomal-recessive complete congenital stationary night blindness. *American Journal of Human Genetics*, 92(1), 67-75.
- Zhou, L., Li, T., Xing, Y. Q., Li, Y., Wu, Q. S., & Zhang, M. J. (2016). Novel TRPM1 mutations in two chinese families with early-onset high myopia, with or without complete congenital stationary night blindness. *International Journal of Ophthalmology*, 9(10), 1396-1402.

17.1 Internetverzeichnis

- http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html (aufgerufen am 21.4.2017)
- <https://www.thermofisher.com/at/en/home/products-and-services/product-types/primers-oligos-nucleotides/invitrogen-custom-dna-oligos/primer-design-tools.html> (aufgerufen am 21.4.2017)
- <http://www.thermofisher.com/at/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html?CID=fl-we120377> (aufgerufen am 22.4.2017)
- <https://en.wikipedia.org/wiki/Sephadex> (aufgerufen am 24.4.2017)
- <https://de.wikipedia.org/wiki/Dextran-Epichlorhydrin-Copolymer> (aufgerufen am 24.4.2017)
- <http://www.cell.com/current-biology/abstract/S0960-9822%2812%2901315-2> (aufgerufen am 27.4.2017)
- <https://sph.uth.edu/retnet/> (aufgerufen am 29.4.2017)
- http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=DE&Expert=215 (aufgerufen am 29.4.2017)
- http://consang.net/index.php/Main_Page (aufgerufen am 30.4.2017)
- <https://gtexportal.org/home/gene/ENSG00000134160.9> (aufgerufen am 2.5.2017)
- <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=TRPM1> (aufgerufen am 11.5.2017)
- <http://www.mutationtaster.org/cgi-bin/MutationTaster/MutationTaster69.cgi> (aufgerufen am 11.5.2017)
- <http://retinascience.de/index.php?nav=info&site=erkrankung&ID=7> (aufgerufen am 22.6.2017)

- http://www.humangenetik-regensburg.de/files/humangenetik/institut/downloads_aerzte/netzhauterkrankungen/Kongenitale_stationaere_Nachtblindheit.pdf (aufgerufen am 22.6.2017)
- <http://www.homozygositymapper.org>
- <http://exac.broadinstitute.org>
- <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>

17.2 Bücher

- "Biometrische und epidemiologische Methoden", Karl-Ernst-Bieber und Bernd Jäger, 2008
- „Grundlagen der Molekularen Medizin“, Detlev Ganten, Klaus Ruckpaul, Springer, Volume 1, 2003
- „Advances in Human Genetics 11“, Harry Harris, Kurt Hirschhorn, 1981
- „Evolution, Ein Lese-lehrbuch“, J. Zrzavy, D.Storch, S.Muhulka, 2009
- „Anatomie und Physiologie“, G.J Tortora, B.H Derrickson, 2008
- „Entwicklungsbiologie“, Müller, Hassel, 4.Auflage, 2005
- „Mensch, Körper, Krankheit“, Renate Huch, Klaus D. Jürgens, 2015
- „Molekularbiologie der Zelle“ , Alberts, Lewis, 2011
- „Angewandte Humangenetik“ , Read, Donnai, 2008
- „Genetik“, Klug, Cummings, 2007
- „Biologie“ , Campbell, Reece, 2011
- Augenheilkunde, Albert J. Augustin, 2013



260/280 and 260/230 Ratios

NanoDrop® ND-1000 and ND-8000 8-Sample Spectrophotometers

As absorbance measurements will measure any molecules absorbing at a specific wavelength, nucleic acid samples will require purification prior to measurement to ensure accurate results. Nucleotides, RNA, ssDNA, and dsDNA all will absorb at 260 nm and contribute to the total absorbance.

260/280

The ratio of absorbance at 260 nm and 280 nm is used to assess the purity of DNA and RNA. A ratio of ~ 1.8 is generally accepted as "pure" for DNA; a ratio of ~ 2.0 is generally accepted as "pure" for RNA. If the ratio is appreciably lower in either case, it may indicate the presence of protein, phenol or other contaminants that absorb strongly at or near 280 nm.

Some researchers encounter a consistent 260/280 ratio change when switching from a standard cuvette spectrophotometer to the NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer. The three main explanations for this observation are listed below:

CHANGE IN SAMPLE ACIDITY

Small changes in the pH of the solution will cause the 260/280 to vary*. Acidic solutions will under-represent the 260/280 ratio by 0.2-0.3, while a basic solution will over-represent the ratio by 0.2-0.3. If comparing the ND-1000 or ND-8000 spectrophotometer to other spectrophotometers, it is important to ensure that the pH of an undiluted sample measured on the ND-1000 or ND-8000 is at the same pH and ionic strength as the diluted sample measured on the second spectrophotometer.

* William W. Wilfinger, Karol Mackey, and Piotr Chomczynski, Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity: *BioTechniques* 22:474-481 (March 1997)

WAVELENGTH ACCURACY OF THE SPECTROPHOTOMETERS

Although the absorbance of a nucleic acid at 260 nm is generally on a plateau, the absorbance curve at 280 nm is quite steeply sloped. A slight shift in wavelength accuracy will have a large effect on 260/280 ratios.

For example, a ± 1 nm shift in wavelength accuracy will result in a ± 0.2 change in the 260/280 ratio. Since many spectrophotometers claim a 1 nm accuracy specification, it is possible to see as much as a 0.4 difference in the 260/280 ratio when measuring the same nucleic acid sample on two spectrophotometers that are both within wavelength accuracy specification.

NUCLEOTIDE MIX IN YOUR SAMPLE

The five nucleotides that comprise DNA and RNA exhibit widely varying 260/280 ratios**. The following represent the 260/280 ratios estimated for each nucleotide if measured independently:

Guanine:	1.15
Adenine:	4.50
Cytosine:	1.51
Uracil:	4.00
Thymine:	1.47

The resultant 260:280 ratio for the nucleic acid being studied will be approximately equal to the weighted average of the 260/280 ratios for the four nucleotides present. It is important to note that the generally accepted ratios of 1.8 and 2.0 for DNA and RNA respectively, are "rules of thumb". The actual ratio will depend on the composition of the nucleic acid. Note: RNA will typically have a higher 260/280 ratio due to the higher ratio of Uracil compared to that of Thymine.

** Leninger, A. L. *Biochemistry*, 2nd ed., Worth Publishers, New York, 1975

260/230

This ratio is used as a secondary measure of nucleic acid purity. The 260/230 values for “pure” nucleic acid are often higher than the respective 260/280 values. Expected 260/230 values are commonly in the range of 2.0-2.2. If the ratio is appreciably lower than expected, it may indicate the presence of contaminants which absorb at 230 nm.

Typical spectral pattern for Nucleic Acid (Figure 1)

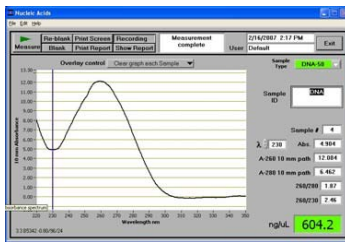


Figure 1.

EDTA (Figure 2), carbohydrates and phenol all have absorbance near 230 nm. The TRIzol reagent is a phenolic solution which absorbs in the UV both at 230 nm and ~270 nm (Figure 3).

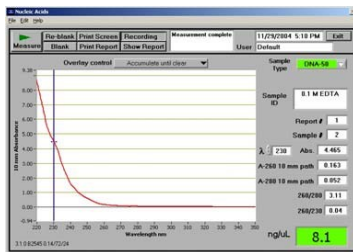


Figure 2.

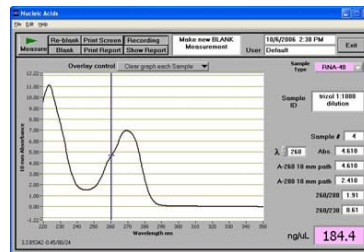


Figure 3.

Guanidine HCL used for DNA isolations will absorb at ~230 nm (Figure 4) while guanidine isothiocyanate, used for RNA isolations will absorb at ~260 nm (Figure 5).

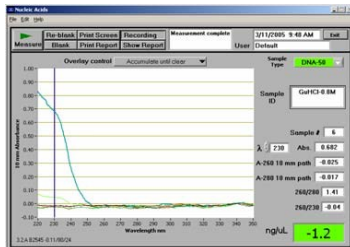


Figure 4.

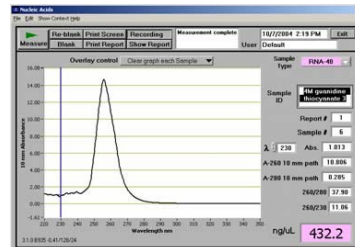


Figure 5.

Please contact Technical Support at 302-479-7707 or send an email to info@nanodrop.com for further information.

Rev 5/07