

Masterarbeit

**Optimierung der molekulargenetischen
Diagnostik von Retinitis pigmentosa**

eingereicht von

Hanna Reindl, BSc.

Zur Erlangung des akademischen Grades

**Master of Science
(MSc)**

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt im

Universitätslehrgang Medizinische Genetik

unter der Anleitung von Dr.scient.med. Julie Waldispühl-Geigl

Graz, August 2023

Eidesstattliche Erklärung

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

Graz, August 2023

Unterschrift eh.

Danksagung

Allen voran möchte ich mich bei meiner Erstbetreuerin Dr.scient.med. Julie Waldispühl-Geigl und bei meiner Zweitbetreuerin Univ.-Prof. Mag. Dr.rer.nat. Ellen Heitzer für die Ermöglichung meines Masterprojekts am Diagnostik- und Forschungsinstitut für Humangenetik in Graz bedanken. Auch dem Laborpersonal in der Diagnostik und Forschung möchte ich meinen Dank für ihre Unterstützung aussprechen. Dabei möchte ich besonders Doritt Franziska Franz, BSc. hervorheben, ohne deren tatkräftige Betreuung die praktische Umsetzung nicht möglich gewesen wäre.

Ich möchte mich herzlich bei meiner Schwester Marina für die sorgfältige Korrektur der vorliegenden Masterarbeit bedanken. Mein größter Dank gebührt meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht und mich stets ermutigt haben, meine Ziele zu verfolgen.

Zusammenfassung

Erbliche Netzhauterkrankungen sind eine Gruppe von genetisch heterogenen Erkrankungen, für die eine Degeneration oder Funktionsstörung der Photorezeptoren in der Retina charakteristisch ist. Die häufigste ist Retinitis pigmentosa (RP) mit einer weltweiten Prävalenz zwischen 1:3000 und 1:7000. In bis zu 20% der Fälle wird die Erkrankung X-chromosomal vererbt und stellt die schwerwiegendste Form von RP dar. Dreiviertel der dafür ursächlichen Mutationen befinden sich im Mutationshotspot Exon ORF15 im Retinitis-pigmentosa-GTPase-Regulator-Gen (*RPGR*). Durch die repetitive Natur dieser Region ist es bis dato unmöglich diese Sequenz mittels Next Generation Sequencing (NGS) zu sequenzieren.

Im Rahmen dieser Masterthesis wurde eine deskriptive Übersicht aller molekulargenetischen Untersuchungen erstellt, die zwischen 2018 und Februar 2023 im Kontext klinischer Verdachtsdiagnosen erblich bedingter Augenerkrankungen am Diagnostik- und Forschungsinstitut für Humangenetik an der Medizinischen Universität Graz vorgenommen wurden. Weiters wurde an der Etablierung einer Methode gearbeitet, um die Sequenzierung von Exon ORF15 zu ermöglichen. Dazu wurde eine sogenannte Long-Range PCR etabliert, die ein 1,7 kb langes Amplikon generiert, welches die repetitive Sequenz umfasst. Nach einer umfassenden Testung mit Kontroll-DNA wurden ungelöste Fälle mit Verdacht auf RP analysiert.

Allerdings blieb aufgrund der Limitation von Short-Read Sequencing Technologien trotz einer größeren Sequenziertiefe und einer geringen Erhöhung der zugeordneten Reads in der stark repetitiven Region die Coverage im Bereich von c.2420 bis c.3080 weiterhin unzureichend. Die aus der Taggmentierung resultierende Länge der einzelnen Fragmente ist zu kurz, um beim Mapping von der Software richtig an das Referenzgenom aligniert zu werden.

Abstract

Inherited retinal diseases (IRDs) are a group of disorders characterized by degeneration or dysfunction of photoreceptors in the retina. The most common among them is retinitis pigmentosa (RP), with a worldwide prevalence of between 1 in 3000 to 1 in 7000. In up to 20% of cases, the disease is X-linked which represents the most severe form of RP. Three-quarters of the causal mutations are located in the mutation hotspot Exon ORF15 of the retinitis pigmentosa GTPase regulator (*RPGR*). Due to the repetitive nature of this region, it has been impossible to sequence this exon using next generation sequencing (NGS).

As part of this master's thesis, a descriptive overview of all molecular genetic examinations conducted between 2018 and February 2023 in the context of clinically suspected hereditary eye diseases at the Diagnostik- und Forschungsinstitut für Humangenetik in Graz was created. Furthermore, work was done on establishing a method to enable the sequencing of Exon ORF15. Amplified 1.7 kb long amplicons generated through long-range PCR were sequenced using NGS over the course of the project.

Due to the limitation of short-read sequencing technologies, coverage in the region from c.2420 to c.3080 remained insufficient despite a greater sequencing depth and a small increase in aligned reads in the highly repetitive region. The length of individual fragments resulting from tagmentation is too short to be properly aligned to the reference genome by the software during mapping.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Anatomie des Auges	1
1.2	Die Netzhaut	2
1.2.1	Photorezeptoren	3
1.2.2	Augenhintergrund	3
1.3	Retinitis pigmentosa	4
1.3.1	Diagnose	6
1.3.2	<i>RPGR</i> und <i>ORF15</i>	8
2	Zielsetzung	11
3	Material und Methoden	12
3.1	Probenauswahl und Probengewinnung	12
3.2	PCR Etablierung	13
3.2.1	Long-Range PCR	14
3.2.2	PCR für Sanger-Sequenzierung	16
3.2.3	Überprüfung am Agarosegel	18
3.3	Aufreinigung der PCR-Produkte	19
3.4	DNA-Quantifizierung	20
3.4.1	NanoDrop	20
3.4.2	Qubit	20
3.5	Library Preparation	21
3.5.1	Qualitätskontrolle der Libraries	21
3.5.2	Quantifizierung der Libraries mittels qPCR	23
3.6	Next Generation Sequencing	25
3.7	Sanger-Sequenzierung	26
3.8	Auswertung	28
4	Ergebnisse	28

4.1	Ophthalmologische Abklärungen von 2018 bis 2023	28
4.2	Coverage.....	33
4.2.1	Coverage der LR-Proben.....	33
4.2.2	Gegenüberstellung der Abdeckungen von WES und LR-Daten	33
4.2.3	Region mit unzureichender Coverage	35
4.3	Analyse des Exons ORF15 des <i>RPGR</i> -Gens	36
4.3.1	Artefakte	36
4.3.2	Identifizierte Mutationen.....	37
5	Diskussion.....	40
6	Literaturverzeichnis	42

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
ACMG-Standards	Standards des American College of Medical Genetics and Genomics
bp	Basenpaar
BR	Broad-Range
ca.	circa
D&F	Diagnostik- und Forschungsinstitut
DMSO	Dimethylsulfoxid
ERG	Elektroretinographie
g	Gramm
gnomAD	Genome Aggregation Database
H ₂ O	Wasser
HGMD	Human Gene Mutation Database
HGVS	Human Genome Variation Society
HS	High Sensitivity
IRDs	inherited retinal diseases
kb	Kilobasen
LR	Long range
MgCl	Magnesiumchlorid
Mio	Millionen
ng/µl	Nanogramm pro Mikroliter
NGS	Next Generation Sequencing
nM	Nanomolar
pM	Pikomolar
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
rcf	relative centrifugal force
RP	Retinitis pigmentosa
RP3	Retinitis pigmentosa (Lokus) 3
RT	Raumtemperatur
SNP	Single Nucleotide Polymorphism

SOP	Standard Operating Procedure
TBE-Puffer.....	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TSO	TruSight One
V	Volt
WES	Whole Exome Sequencing
XLRP	X-linked Retinitis pigmentosa
ZSD	Zapfen-Stäbchen-Dystrophie

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Beispiel von Amplikons der LR PCR auf einem Agarosegel nach der Gelelektrophorese. neg K = negativ Kontrolle, Ladder = 500 bp Molecular Ruler, # = Proben der Patient*innen. Laut Standard entsprechen sie der erwarteten Länge von 2,1 kb..... 18

Abbildung 2: Libraries von Probe #8 und #9 1:5 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt zur Veranschaulichung. Auf der x-Achse sind Fluorescent Units (FU) und auf der y-Achse die Basenpaarlänge (bp) aufgetragen. Die dünnen Peaks links und rechts sind die Lower und Upper Marker und die Peaks in der Mitte Libraries. 22

Abbildung 3: Amplifikationsplot der PhiX Control v3 Library Standardreihe. Von links nach rechts sind Konzentrationen von 32 pM, 16 pM, 8 pM, 4pM, 2 pM und 1 pM zu sehen. Die Triplikate liegen jeweils übereinander und die Abstände zwischen den Kurven sind regelmäßig. Der Threshold liegt bei 5,2. 24

Abbildung 4: Amplifikationsplot der Verdünnungsstufen von 1:1000, 1: 2000, 1:4000 und 1:8000 von Pool Nummer 3. Die Triplikate liegen jeweils übereinander und die Abstände zwischen den Kurven sind regelmäßig. Der Threshold liegt bei 5,2. 25

Abbildung 5: Darstellung der häufigsten Indikationen von Anfang 2018 bis Februar 2023. 30

Abbildung 6: Das Säulendiagramm veranschaulicht die zehn Gene, in denen am häufigsten Mutationen gefunden wurden. 31

Abbildung 7: Unterteilung der Ergebnisse. 32

Abbildung 8: Darstellung der Mutationshäufigkeiten (1-6) innerhalb einer Probe. 32

Abbildung 9: Bildausschnitt der Benutzeroberfläche des SEQUENCE Pilot.
Dargestellt ist die Auswertung der WES-Daten der Probe 39. Der rot markierte Bereich c.2375-c.3082 ist mit weniger als 20 Reads abgedeckt. 35

Abbildung 10: Bildausschnitt der Benutzeroberfläche des SEQUENCE Pilot.
Dargestellt ist die Auswertung der LR-Daten der Probe 39. Der rot markierte Bereich weist eine geringe Coverage auf und kann nicht ausgewertet werden. .. 35

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primersequenzen und deren Anwendung für die Amplifikation und Sequenzanalyse von Exon ORF15 des RPGR-Gens.....	14
Tabelle 2: Komponenten inklusive Volumina für die LR PCR für eine Probe mit einem Endvolumen von 25 µl.	15
Tabelle 3: Primersequenzen und Produktlänge für die Analyse der LR PCR Amplikons mittels Sanger-Sequenzierung. Die Sequenzabfolgen der Primer sind Tabelle 1 zu entnehmen.	17
Tabelle 4: Komponenten inklusive Volumina für die PCR die als Grundlage für die Durchführung der Sanger-Sequenzierungen dient. Die Angaben sind für eine Probe mit einem Endvolumen von 12 µl.	17
Tabelle 5: Komponenten inklusive Volumina für die qPCR für eine Reaktion.	23
Tabelle 6: Komponenten inklusive Volumina für die Sequenzierreaktionen für die Sanger-Sequenzierung. Die Mengen sind für eine Reaktion und werden nach Bedarf vervielfältigt.	27
Tabelle 7: Eckpunkte für die Vorbereitung des ABI 3730 laut Handbuch.	27
Tabelle 8: Überblick der Coverage an den Positionen der Mutationen. Vergleich der früheren Analysen (WES) und der Abdeckung, die durch Long-Range PCR und NGS (LR) erreicht werden konnte.	34
Tabelle 9: Identifizierte Mutationen im RPGR-Gen in Exon ORF15. Die Mutationen sind im Transkript NM_001034853.2, welches in der Netzhaut exprimiert wird, im	

RPGR-Gen in Exon ORF15 lokalisiert und wurden laut HGVS-Nomenklatur beschrieben..... 39

1 Einleitung

1.1 Anatomie des Auges

Die Orbita (Augenhöhle) ist eine kegelförmige, knöcherne Struktur. In ihr ist der Bulbus oculi (Augapfel) lokalisiert, der einen Durchmesser von ca. 24 mm aufweist und aus drei Schichten besteht. Für die äußerste Schicht ist deren mechanisch Stabilität bezeichnend, in der Mitte befinden sich die Gefäße und innen die Nervenzellen. Die äußerste Schicht des Sehapparats ist die Cornea, die auch als Hornhaut bezeichnet wird. Dieser Abschnitt weist die Form eines Uhrglases auf und zeichnet sich durch seine Widerstandsfähigkeit gegenüber mechanischen Einflüssen wie auch Infektionen aus. Zudem ist diese Wölbung maßgeblich am lichtbrechenden Apparat beteiligt und ursächlich für zwei Drittel der Gesamtbrechkraft des Auges. Die unter dem Sulcus sclerae angrenzende Schicht ist die undurchsichtige weniger gekrümmte Sclera (Lederhaut), welche den Großteil der außenliegenden Wand ausmacht. Cornea und Sclera bilden gemeinsam die äußere Augenhaut, durch die auf der Netzhaut ein reelles Bild entstehen kann (1,2).

Zu der Uvea (mittlere Augenhaut) zählen Iris, Ziliarkörper und Choroidea (Aderhaut). Ihre Hauptaufgaben bestehen in der Blutversorgung und der Adaption der Lichtstrahlen an den Rezeptorapparat in der Netzhaut. Die Aufgabe der Iris ist es, als Blendenapparat zu wirken, indem sie den Durchmesser der Pupille, der im neutralen Zustand 4 mm beträgt, entweder verengt oder erweitert. Die Aderhaut befindet sich zwischen der Sklera und der Netzhaut und ermöglicht den Durchfluss von 85% der Blutmenge, die das Auge erreicht. Sie ist dafür verantwortlich, die Photorezeptoren der Netzhaut und das Pigmentepithel mit Nährstoffen zu versorgen (1,2).

Zu den Bestandteilen des lichtbrechenden Apparats des Auges zählen die Cornea mit dem Tränenfilm, das Kammerwasser, die Linse und der Glaskörper. Das Scharfstellen naher oder ferner Objekte erfolgt durch eine Formveränderung der elastischen und bikonkaven Linse, die durch die Anpassung des Ziliarmuskels und der Zonulafasern ermöglicht wird. Der Bereich zwischen der Linse und der Netzhaut wird von einer transparenten, zähflüssigen Struktur ausgefüllt, die als Glaskörper bezeichnet wird. Neben seiner Funktion als Stoßdämpfer bewirkt er, dass sich die Netzhaut durch den Quelldruck gleichmäßig an die äußeren Schichten anlegt (1,2).

1.2 Die Netzhaut

Entwicklungsgeschichtlich und funktionell betrachtet, handelt es sich bei der Retina (Netzhaut) um einen vorgeschobenen Teil des Gehirns, der die innere Augenhaut zwischen der Choroidea und dem Glaskörper bildet. Anatomisch wird dieser Bestandteil des Sehapparats in die außenliegende, lichtempfindliche Pars optica retinae, die den Augenhintergrund auskleidet, und in die innenliegende lichtunempfindliche Pars caeca retinae unterteilt. Diese zwei Schichten bestehen jeweils aus zwei Blättern, wovon das äußere aus einer einschichtigen Lage von Pigmentzellen aufgebaut ist und als Stratum pigmentosum retinae bezeichnet wird. Im Bereich der Photorezeptoren erstreckt es sich bis zu den Außensegmenten und ist unter anderem für den Stoffaustausch zwischen der Choroidea, den Rezeptoren und den Nervenzellen des Stratum nervosum verantwortlich. Die Ora serrata bezeichnet den gezackten Übergangsbereich zwischen der Pars caeca retinae, die im vorderen Abschnitt des Augapfels liegt, und der dahinterliegenden Pars optica retinae. (1,3).

Die lichtbrechenden Bestandteile des Auges nutzen die Pars nervosa retinae als Projektionsfläche, um ein reelles Bild zu produzieren. An dieser Stelle werden optische Reize von Photorezeptoren in elektrische und anschließend in chemische Signale umgewandelt. Diese Schicht baut sich von außen nach innen aus den ersten drei Neuronen der Sehbahn auf, nämlich aus Photorezeptoren, Bipolar- sowie Ganglienzellen. In diesem strukturellen Kontext übernehmen die Interneuronen, speziell Horizontal- und Amakrinzellen, die Aufgabe der horizontalen Informationsweitergabe innerhalb der Netzhaut. Das Stratum nervosum retinae wiederum ist in neun Schichten gegliedert. Von der Choroidea hin zum Glaskörper werden sie in die äußerste Schicht der Photorezeptoren, äußere Grenzmembran, äußere Körnerschicht, äußere plexiforme Schicht, innere Körnerschicht, innere plexiforme Schicht, Ganglienzellschicht, Nervenfaserschicht und innere Grenzmembran eingeteilt (1–3).

1.2.1 Photorezeptoren

Im menschlichen Auge sind zwei verschiedene Arten von Photorezeptoren zu finden, die in der Netzhaut lokalisiert sind. Etwa 110-125 Mio. lichtempfindliche Stäbchen ermöglichen das Sehen bei niedriger Lichtintensität oder auch Dämmerungssehen, während 6,3-7 Mio. farbempfindliche Zapfen für das Tages- und Farbsehen zuständig sind. Diese Rezeptoren befinden sich in der äußersten Schicht der Netzhaut, auch äußere Körnerschicht genannt, die Richtung Aderhaut liegt. Dort nehmen sie die Lichtreize mittels Membranscheiben in ihren Rezeptoraußengliedern auf. Bei den Stäbchen sind diese intrazellulär lokalisiert und enthalten Rhodopsin. Im Gegensatz dazu weisen die Membrandisci der mitochondrienreichen Zapfen Verbindungen zum Extrazellulärraum auf und enthalten Iodopsin. Nach der Aufnahme der Lichtsignale werden ebendiese durch bipolare Zellen, Horizontalzellen und amakrine Zellen (innere Körnerschicht) weitergeleitet. Die Ganglienzellen, die sich an der Innenseite der Netzhaut dem Glaskörper zugerichtet befinden, erhalten die Signale und ziehen ihre 1,1 Mio. Axone zur Papille, um den Sehnerv zu bilden (2,3).

Durch die Belichtung der Photorezeptoren wird ein photochemischer Prozess ausgelöst, der zur Hyperpolarisation der Rezeptormembran führt. Diese Veränderung des Membranpotenzials wird über Bipolarzellen an die retinalen Ganglienzellen weitergeleitet. Dort werden aus den langsamen Potenzialen frequenzmodulierte Aktionspotenziale erzeugt. Anschließend gelangen diese über den Sehnerv in das Gehirn (2,3).

1.2.2 Augenhintergrund

Der 3-5 mm große Bereich mit den meisten Photorezeptoren wird Macula lutea oder auch gelber Fleck genannt und liegt auf der Sehachse im Zentrum der Netzhaut. In der Mitte befindet sich die trichterförmige Fovea centralis, die Stelle des schärfsten Sehens. Dieser Bereich ist ausschließlich mit Zapfen dicht besiedelt. Hier fehlt die inneren Netzhautschichten, was dazu führt, dass das einfallende Licht direkt die farbempfindlichen Photorezeptoren erreicht. Im Zentrum befindet sich die am tiefsten liegende Foveola mit einem Radius von 0,4 mm und eine Netzhautdicke von 0,1 mm, in der die Zapfen völlig frei liegen.

In diesem Abschnitt sind die Zapfen nahezu im Verhältnis eins zu eins mit Optikusganglienzellen verknüpft. Das Gewebe wird durch die zentrale Eindellung nicht reduziert, sondern verschoben, weshalb die Sehgrube von der verdickten Parafovea umschlossen wird. Diese ist mit zunehmender Entfernung vom Zentrum sukzessive dichter mit Stäbchen durchsetzt. Angrenzend befindet sich die äußerste Randzone der Makula, die als Perifovea bezeichnet wird. Sie umfasst bereits deutlich weniger Zapfen und grenzt an Netzhautbereiche mit der höchsten Stäbchendichte.

Die Netzhaut zeigt einen Funktionsgradienten von der Peripherie zum Zentrum hin. Dieses Phänomen wird als Zentralisation der Netzhaut bezeichnet. Eine Sehschärfe von 100% wird lediglich in der Foveola erreicht. Die Netzhautperipherie arbeitet unterstützend und hat die Aufgabe Informationen weiterzuleiten. Beispielsweise erkennt sie Gegenstände und registriert ihre Bewegungen, um sie dann über die Fovea einer detaillierteren Analyse zu unterziehen (2,4).

1.3 Retinitis pigmentosa

Erbliche Netzhauterkrankungen (engl. inherited retinal diseases (IRDs)) sind eine Gruppe von Erkrankungen, für die eine Degeneration oder Funktionsstörung der Photorezeptoren charakteristisch ist. Sie weisen eine hohe phänotypische Variabilität, genetische Heterogenität und unterschiedliche Vererbungsmodi auf. In der Regel ist mit diesen Krankheiten ein schwerwiegender Sehverlust verbunden, der sich fortlaufend entwickeln kann. IRDs können die gesamte Netzhaut betreffen oder auf die Makula beschränkt sein. Das Manifestationsalter kann von der Geburt bis ins späte Erwachsenenalter variieren (5–7).

Eine der häufigsten Ursachen des Sehverlustes ist Retinitis pigmentosa (RP), eine Gruppe von genetisch bedingten Netzhauterkrankungen, die durch die Degeneration der Photorezeptoren in der Netzhaut gekennzeichnet ist (8). Die weltweite Prävalenz liegt zwischen 1:3000 und 1:7000, weshalb in Summe Millionen von Menschen betroffen sind. Bei der genetisch sehr heterogenen nicht-syndromalen RP sind mehr als 80 Gene bekannt, deren Mutationen für die Entstehung der Krankheit verantwortlich gemacht werden. Die Genotyp-Phänotyp-Korrelation ist oft nicht eindeutig, auch wenn bestimmte Genotypen für teilweise

typische Merkmale des Phänotyps bekannt sind oder teilweise prädiktiv für die Progression sein können (9). In 30-40% der Fälle wird RP autosomal dominant vererbt, zu 50-60% autosomal rezessiv und bei 5-15% liegt ein X-chromosomaler Erbgang vor. Letzterer führt bei männlichen Patienten zum raschen Fortschreiten der Erkrankung.

Bei weiblichen Trägerinnen (Konduktorinnen) von X-chromosomal vererbter Retinitis pigmentosa (XLRP) kann ein breites Spektrum an klinischen Manifestationen auftreten – von asymptomatischen Fällen bis hin zu schweren Verläufen, ähnlich wie bei hemizygoten männlichen Trägern. In einigen Fällen kann dies bei der Auswertung des Familienstammbaums zu einer falschen Annahme einer autosomal dominanten Vererbung führen. Zum Großteil beschränkt sich die Erkrankung auf die Augen, allerdings weisen 20-30% der Patient*innen nicht ophthalmologische Begleiterscheinungen auf, die mehr als 30 verschiedenen Syndromen zugeordnet werden können. Das Usher-Syndrom, bei dem zusätzlich eine Hörbeeinträchtigung vorliegt, ist hier das vorherrschende Krankheitsbild. Zudem ist das Bardet-Biedl-Syndrom, für das RP, Polydaktylie, kognitive Beeinträchtigung, Nierenerkrankung, Fettleibigkeit und Hypogenitalismus charakteristisch sind, ebenfalls ein häufig auftretendes Syndrom. (7,10–12)

RP zeigt eine hohe Variabilität in Hinblick auf damit einhergehende Krankheitsverläufe. Während einige Patient*innen bereits in der Kindheit symptomatischen Sehverlust erleiden, bleiben andere bis ins mittlere Erwachsenenalter asymptomatisch. Häufig beginnt die Erkrankung im Jugendalter mit Schwierigkeiten beim Dämmerungssehen und führt weiter bis hin zur Nyktalopie. Mit dem Fortschreiten der Krankheit geht das periphere Sehvermögen im jungen Erwachsenenalter verloren und entwickelt sich allmählich zu einem Tunnelblick. Schließlich tritt im Alter von etwa 60 Jahren der Verlust des zentralen Sehvermögens ein. Anhand der Symptome lässt sich erkennen, dass zuerst ein Verlust der Stäbchen auftritt, die für das Hell-Dunkel-Sehen zuständig sind. Später folgt der Untergang der Zapfen, die das Farb- und Scharfsehen bei Licht ermöglichen. Die äußere Kernschicht der Netzhaut, die die Photorezeptorkerne beinhaltet, ist bei Patient*innen mit RP auf Grund von Apoptose massiv geschädigt. Dies äußert sich durch eine reduzierte Dicke der betroffenen Schicht sowie durch das Auftreten von Läsionen und/oder retinalen Pigmentablagerungen am

Augenhintergrund, die basierend auf ihrer Optik als „Knochenkörperchen“ bezeichnet werden. Im Gegensatz dazu bleiben die Ganglienzellschicht wie auch die innere Kernschicht bestehend aus bipolaren, amakrinen und horizontalen Zellneuronen intakt. Jedoch degenerieren viele dieser Zellen, wenn die Erkrankung weiter fortschreitet und aufgrund der progressiven Einschränkung des Gesichtsfeldes sind viele Betroffene im Alter von 40 Jahren im Sinne des Gesetzes blind. In der Regel übersteigt bei RP der Verlust der Stäbchenfunktion den Rückgang der Zapfenempfindlichkeit. Bei manchen Formen ist der Rückgang der Photorezeptoren ähnlich ausgeprägt. Der Begriff Zapfen-Stäbchen-Dystrophie (ZSD) wird verwendet, um den degenerativen Prozess zu beschreiben, bei dem zuerst die Zapfen und anschließend die Stäbchen betroffen sind (5,7,11).

1.3.1 Diagnose

Die frühen Symptome von RP sind oft schwer zu erkennen, da sie beim Sehen in Dämmerungssituationen aufgrund der vorhandenen elektrischen Beleuchtung in unserer Umgebung oft nicht sofort bemerkbar sind. Wenn sich die Betroffenen dieser Einschränkung bewusstwerden, ist häufig bereits eine zusätzliche Verringerung der Zapfenempfindlichkeit eingetreten. Häufig bemerken betroffene Menschen keine subjektiven Schwierigkeiten bei der Bewältigung alltäglicher Aufgaben, solange das verbleibende zentrale Gesichtsfeld noch einen Durchmesser von etwa 50 Grad aufweist. Eine Verringerung der Sehschärfe tritt möglicherweise erst bei einem Verlust von 90% der Zapfen in der Fovea auf (11).

Zu den diagnostischen Verfahren zählen die Perimetrie, Ophthalmoskopie, Bestimmung des Visus, optische Kohärenztomographie (engl. optical coherence tomography (OCT)), Elektroretinographie (ERG) und molekulargenetische Analysen. Diese Untersuchungen werden durchgeführt, um die Einschränkung des Gesichtsfeldes zu erfassen, den Verlust von Photorezeptoren oder eine verringerte beziehungsweise fehlende Signalantwort festzustellen sowie um Pigmentablagerungen auf der Netzhaut oder Vasokonstriktionen der retinalen Gefäße zu identifizieren (13). Bei der Vermessung des Gesichtsfeldes können Skotome in der mittleren Peripherie festgestellt werden, die auf den Verlust von Photorezeptoren zurückzuführen sind. Skotome dehnen sich mit dem Fortschreiten

der Erkrankung immer weiter aus, bis sie diesen Bereich komplett ausfüllen. Die Testung des Farbsehens, die beispielsweise mittels Ishihara-Platten durchgeführt wird, kann entweder normal ausfallen oder ein Problem bei der Erkennung der Farbe Blau aufzeigen, was typisch für ein fortgeschrittenes Stadium der RP ist.

Zusätzlich wird der Grad der Nachtblindheit gemessen. Um die niedrigste wahrnehmbare Lichtintensität von weißem Licht zu bestimmen, werden die Augen für 30 Minuten zugeklebt und anschließend eine Bewertung durchgeführt. Wenn die Lichtintensität mindestens 100mal stärker ist als bei gesunden Menschen, liegt ein schwerer Verlust der Stäbchen vor und die Person sollte in der Dämmerung oder bei Nacht nicht mehr mit dem Auto fahren. Des Weiteren wird die Kontrastsensitivität mittels Kontrasttafel ermittelt. Bei der Hälfte der Betroffenen zeigt die Ophthalmoskopie posterior subkapsuläre Katarakte und häufig sind Zellen im Glaskörper vorhanden. Typischerweise liegen auch Verengungen der Netzhautgefäße und intraretinale Pigmentablagerungen im Fundus vor. Letztgenannte entstehen, wenn das retinale Pigmentepithel als Reaktion auf das Absterben der Photorezeptorzellen in die neurale Netzhaut eindringt (11).

Die Elektroretinographie ist eine weitere essenzielle Methode zur Diagnose von RP. Dabei handelt es sich um eine grundlegende elektrophysiologische Augenuntersuchung, bei der bioelektrische Reaktionen der Netzhaut erfasst werden. In der Durchführung wird die Netzhaut mit geeigneten Lichtblitzen stimuliert, während entweder eine Kontaklinselektrode auf der örtlich betäubten Hornhaut oder eine Elektrode auf dem Augenlid verwendet wird, um die elektrische Reaktion zu messen. Die Elektroretinographie ermöglicht eine funktionelle Beurteilung der Netzhautaktivität durch die Aufzeichnung der elektrischen Potentialdifferenzen. Die ERG-Messungen werden unter Verwendung einer Aufzeichnungselektrode in Kombination mit einer Referenz- und einer Erdungselektrode durchgeführt (11,14).

Bei einzelnen Lichtblitzen von weißem Licht zeigen sich bei der ERG charakteristische Muster. Eine anfängliche a-Welle veranschaulicht eine Hyperpolarisation der Photorezeptoren und eine nachfolgende b-Welle entsteht durch die Depolarisation von Zellen in der inneren Kernschicht. Bei Patient*innen mit RP sind die Amplituden der Stäbchen- und Zapfenreaktionen reduziert, weshalb

sie zeitlich verzögert auftreten. Die Amplituden der a- und b-Wellen können je nach Vererbungsmodus entweder mäßig reduziert oder praktisch nicht nachweisbar sein, wie beispielsweise bei Betroffenen mit X-chromosomaler vererbter RP. Die zeitlichen Intervalle zwischen den Stimuli und den Spitzenwerten der Antworten sind typischerweise verlängert.

ERG-Ergebnisse sind objektive Messwerte für die Netzhautfunktion und haben einen großen Stellenwert bei der Diagnose wie auch Beurteilung des Schweregrades, Evaluierung der Reaktion auf Therapien, Überwachung des Krankheitsverlaufs und Erstellung einer Prognose (11,15).

1.3.2 *RPGR* und ORF15

X-chromosomal vererbte RP (XLRP) ist eine der schwersten Formen der Erkrankung und macht 10 bis 20% aller RP-Fälle aus. Auf dem X-Chromosom befinden sich sechs Loci, die krankheitsversuchend sein können, wovon in ca. 75% der XLRP-Fälle eine Mutation im RP3-Lokus vorliegt. Dieser wurde durch eine Deletionsanalyse sowie einen positionellen Sequenzierungsansatz identifiziert und besteht aus dem Retinitis-pigmentosa-GTPase-Regulator-Gen (*RPGR*), welches für das GTPase-bindende Protein kodiert. Die meisten Fälle stehen in Zusammenhang mit der Stäbchen-Zapfen-Dystrophie, während seltener auch X-chromosomale Zapfen-Stäbchen-Dystrophie, Zapfendystrophie und Makuladegeneration durch Mutationen im *RPGR*-Gen verursacht werden können. Bei der Stäbchen-Zapfen-Dystrophie beginnt die Degeneration bei den Stäbchen und geht dann zu den Zapfen über. Bis heute gibt es keine Heilung für *RPGR*-assoziierte Netzhauterkrankungen. Allerdings haben die Fortschritte in der Forschung zur Entwicklung potenzieller Therapien geführt, darunter der durch Adeno-assoziierte Viren (AAV) vermittelte *RPGR*-Genersatz (16,17).

Das *RPGR*-Gen weist ein komplexes Expressionsmuster auf und unterliegt einem extensiven alternativen Spleißen durch das mindestens zehn verschiedene Isoformen hervorgehen. Eine der beiden wichtigsten *RPGR*-Isoformen ist *RPGR*¹⁻¹⁹, bestehend aus 19 Exons, die für ein 815-aa-Protein kodiert und in Flimmerzellen im gesamten Körper exprimiert wird. Die zweite Isoform ist die für Wirbeltiere spezifische *RPGR*^{ORF15}-Isoform C (NM_001034853.2), welche vornehmlich in der

Netzhaut exprimiert wird, aus 15 Exons besteht, 4767 Nukleotide umfasst und für ein 1152-aa-Protein kodiert. Diese Isoform ist hauptsächlich an der Pathogenese von RP beteiligt. Exons 1 bis 14, die für einen Regulator kodieren, der für die Interaktion von Bindungspartnern unerlässlich ist, sind in beiden Isoformen enthalten. Sie unterscheiden sich jedoch an ihren carboxylterminalen Enden (12,18,19).

Das terminale Exon der *RPGR*^{ORF15}-Isoform, auch als offener Leserahmen 15 oder ORF15 bezeichnet, enthält eine Purin-reiche hochrepetitive Sequenz, die für einen 567-Aminosäuren C-Terminus langen Abschnitt mit geringer Komplexität und einem hohen Gehalt an Glutaminsäure sowie Glycin kodiert. 60% der bisher mehr als 350 im *RPGR*-Gen gefundenen Varianten wurden im Exon ORF15 (c.1754-3459) entdeckt. Die Mutationen sind meist kleine Deletionen oder Duplikationen. Wahrscheinlich ist die hohe Mutationshäufigkeit in Exon ORF15 auf den repetitiven Charakter seiner Sequenz und die Zusammensetzung der Nucleotide zurückzuführen, die zu Fehlern bei der DNA-Replikation führen können. Diese Tatsache stellt eine erhebliche Herausforderung für molekulare und klinische Studien sowie die molekulargenetische Diagnose von RP dar. Obwohl Genotyp-Phänotyp-Korrelationen bereits in mehreren *RPGR*-Kohorten untersucht wurden, gibt es bislang noch keine einheitlichen Erkenntnisse. Studien liefern unterschiedliche Antworten darauf, ob Mutationen in den Exons 1-14 oder ORF15 zu einem schwereren Phänotyp führen. Jedoch konnte herausgefunden werden, dass Mutationen am 3'-Ende von Exon ORF15 zu einem milderem Phänotyp führen als jene am 5'-Ende. Zusätzlich wurde festgestellt, dass Mutationen am 3'-Ende eher zu ZSD als zu RP führen. Dies lässt vermuten, dass diese C-terminale Region für das Überleben von Zapfen von Bedeutung ist. Zwischen Patient*innen mit verschiedenen ORF15-Mutationen und sogar innerhalb von Familien mit der gleichen Mutation kann eine beträchtliche Variabilität im Krankheitsphänotyp beobachtet werden. Die molekulare Grundlage für die klinische Heterogenität bei XLRP ist nur unzureichend bekannt. Sie könnte teilweise durch Modifikatorgene erklärt werden oder auf allelische Heterogenität zurückzuführen sein. Es ist in der Forschung seit Jahren ungeklärt, wie ähnliche Mutationen in Exon ORF15 zu derart unterschiedlichen Phänotypen führen können. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte auch im alternativen Spleißen liegen (5,12,16,19,20).

Exon ORF15 wird vorwiegend in der Netzhaut exprimiert und ist ein Hotspot für Mutationen, die mit RP assoziiert werden. Diese Veränderungen sind fast ausschließlich Frameshift- oder Nonsense-Mutationen, wodurch ein vorzeitiges Stopcodon entsteht und es entweder zu einem verfrühten Abbruch der Proteinsynthese oder zu einem sogenannten Nonsense-mediated mRNA Decay kommt, bei dem die defekte mRNA vorzeitig abgebaut wird. Dies führt zu der Annahme, dass dieses Exon wahrscheinlich eine essenzielle Rolle für die Funktion von *RPGR* in der Netzhaut spielt.

Das Entstehen dieser Mutationen in der 1 kb großen Purin-reichen Region mit geringer Komplexität (c.2184-3162) wird durch das Verrutschen der DNA-Polymerase aufgrund der stark repetitiven Sequenz erklärt. Die Detektion von pathogenen Sequenzveränderungen in Exon ORF15 spielt eine zentrale Rolle bei der Diagnose von XLRP und ist auch für die genetische Beratung und Familienplanung von Bedeutung.

Aufgrund der hohen genetischen Heterogenität von IRDs hat sich das Hochdurchsatz-Verfahren Next Generation Sequencing (NGS) als Standardmethode in der molekulargenetischen Diagnostik etabliert. Trotz einer signifikant höheren diagnostischen Ausbeute im Vergleich zur Sanger-Sequenzierung weist auch NGS Limitationen auf. Beispielsweise handelt es sich bei NGS-Verfahren um sogenannte Short-Read Technologien, d.h. es können nur kurze DNA-Sequenzabschnitte (short reads) von etwa 150 bp sequenziert werden, was für die Sequenzierung von repetitiven Regionen ein Problem darstellt. Aufgrund des großen Anteiles an repetitiven Regionen im humanen Genom werden kurze Sequenzabschnitte mehrfach gemappt und nicht richtig aligned. Daher ist die Sanger-Sequenzierung für die Analyse des hochrepetitiven Exons ORF15 nach wie vor ein wesentlicher Bestandteil des diagnostischen Verfahrens. In den letzten Jahren wurde die Detektion von Sequenzvarianten erheblich verbessert, indem Amplikons verwendet wurden, die durch Long-Range PCR generiert und anschließend mit NGS sequenziert wurden (5,19,21).

2 Zielsetzung

Derzeit werden 317 Loci bzw. 281 Gene mit IRDs assoziiert (22). Am Diagnostik- und Forschungsinstitut (D&F) für Humangenetik an der Medizinischen Universität Graz werden über zwanzig IRD-Indikationen mit rund 150 Genen zur Untersuchung angeboten. Die molekulargenetische Abklärung erfolgt mittlerweile im Rahmen einer NGS-Panel-Diagnostik, wobei eine Exomsequenzierung durchgeführt und basierend auf der Indikation entweder mehrere oder einzelne Gene ausgewertet werden. Im Zeitraum von 2018 bis Anfang 2023 wurden 317 Patient*innen mit Verdacht auf erblichen Augenerkrankungen bzw. erbliche Netzhautdystrophien untersucht. Davon wurden um die 20% molekulargenetisch aufgeklärt, wobei sich die übrigen möglicherweise gelöst und ungelöst aufteilen. Bei mehr als 30% der Betroffenen mit vererbten Netzhautdystrophien werden keine kausalen Mutationen identifiziert.

Laut Literatur werden speziell bei der schwerwiegenden XLRP krankheitsverursachende Mutationen im *RPGR*-Gen identifiziert. 80% davon befinden sich im Exon ORF15 des *RGR*-Gens. Diese Region kann jedoch mit einer klassischen NGS-Panel-Diagnostik nicht ausreichend qualitativ ausgewertet werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, eine Methode zur Sequenzierung des Exons ORF15 des *RPGR*-Gens zu entwickeln, welche auch im Rahmen der molekulargenetischen Diagnostik einsetzbar wäre. Insbesondere bei der Diagnostik von RP bzw. ZSD ist dies von entscheidender Bedeutung, da das Exon ORF15 einen Hotspot für Mutationen darstellt, die für die Erkrankungen ursächlich sind. Möglicherweise könnte in der Zukunft zur aktuellen Stufendiagnostik, bestehend aus den Panels RP Stufe I und Stufe II, eine dritte Stufe hinzugefügt werden. Falls in den ersten beiden Stufen keine ursächliche Mutation gefunden wurde, könnte Exon ORF15 des *RPGR*-Gens durch LR PCR auf eine XLRP überprüft werden. Idealerweise werden mit der Etablierung der Methode ursächliche *RPGR*-Mutationen im Exon ORF15 identifiziert und somit ungelöste Fälle molekulargenetisch aufgeklärt.

3 Material und Methoden

3.1 Probenauswahl und Probengewinnung

Zu Beginn wurde eine Liste sämtlicher Fälle mit ophthalmologischen Fragestellungen erstellt, die am D&F für Humangenetik in Graz von Anfang 2018 bis Februar 2023 bearbeitet wurden. Diese Fälle wurden hinsichtlich ihrer Indikation und des Ergebnisses der molekulargenetischen Testung mit deskriptiver Statistik ausgewertet.

Im nächsten Schritt wurde nach Patient*innen gefiltert, bei denen aufgrund der Indikation die NGS-Panel-Diagnostik RP Stufe I oder Zapfen-Stäbchen-Dystrophie durchgeführt wurden, da diese das *RPGR*-Gen enthalten. Basierend darauf wurden Betroffene identifiziert, bei denen keine molekulargenetische Ursache für deren Erkrankungsbild nachgewiesen werden konnte, oder nur ein unklarer Befund erstellt wurde. Konkret wurden jene Betroffene mit unauffälligen Befunden, oder mit Nachweis einer oder mehreren Varianten mit unklarer Signifikanz (VUS) bzw. mit Nachweis einer heterozygot vorliegenden wahrscheinlich pathogenen oder pathogenen Mutation im Zusammenhang mit einem rezessiven Erbgang (also bei Fehlen einer zweiten *in trans* vorliegenden Mutation) ausgewählt.

Eine weitere Voraussetzung war das Vorliegen eines schriftlichen Einverständnisses zur Durchführung einer genetischen Analyse für eine zukünftige Abklärung sowie für wissenschaftliche Zwecke, das im Zuge des Beratungsgesprächs abgegeben wurde. Unter denselben Bedingungen in Hinblick auf die Einverständniserklärungen wurden zehn Proben mit einer beliebigen nicht ophthalmologischen Fragestellung zufällig als Kontrollen ausgewählt. Zusätzlich wurde ein männlicher Patient als Positivkontrolle herangezogen, der an RP leidet und eine bekannte Mutation im Exon ORF15 des *RPGR*-Gens aufweist. Um die Anonymität zu gewährleisten, erhielten alle Kontrollproben dreistellige Nummern, die im Rahmen des Projekts verwendet wurden.

Basierend auf den oben genannten Kriterien konnten 33 Frauen und 22 Männer identifiziert werden, die sich aufgrund einer klinisch diagnostizierten Netzhautdystrophie bzw. dem Verdacht auf RP oder ZSD, nach einem Beratungsgespräch einer molekulargenetischen Testung unterzogen hatten. Dazu wurden für die Extraktion von hochqualitativer genomischer DNA mind. 4 ml Vollblut

in EDTA-Röhrchen an der Universitäts-Augenklinik am LKH-Universitätsklinikum Graz oder am D&F für Humangenetik in Graz entnommen. Anschließend erfolgte die DNA-Isolierung mit QIASymphony® SP (QIAGEN, Hilden, Deutschland) laut SOP, welche auf dem QIASymphony® DNA Handbuch basiert. Bei diesem Verfahren zur vollautomatischen Extraktion von Gesamt-DNA kommt eine Technologie zum Einsatz, die Magnetpartikel verwendet. Die ausgewählten DNA-Proben wurden im Zeitraum von 09.05.2018 bis 11.08.2022 gewonnen und nach abgeschlossener standardgemäßer diagnostischer Bearbeitung je nach Fragestellung bis zur erneuten Untersuchung bei -15 bis -25°C gelagert. Zur Wahrung der Anonymität wurden ihnen fortlaufende Nummern zugewiesen, die im Zuge dieser Arbeit zur Anwendung kamen. Die praktischen Arbeiten zu diesem Projekt wurden am D&F für Humangenetik an der Medizinischen Universität Graz durchgeführt. Sämtliche Positionsangaben beziehen sich auf das humane Referenzgenom GRCh37 (hg19).

3.2 PCR Etablierung

Da die Region des Exons ORF15 bereits in anderen Studien mittels Long-Range PCR analysiert wurde, wurde als erster Schritt eine Recherche durchgeführt um auf bereits publizierte Primer zurückzugreifen. Die im Paper „Improved Diagnosis of Inherited Retinal Dystrophies by High Fidelity PCR of ORF15 followed by Next-Generation Sequencing“ von Li et al. angeführten Primer wurden im Vorfeld mit Hilfe der *in-silico* PCR des UCSC Genome Browsers überprüft und die am besten geeigneten ausgewählt (10). Alle Primer wurden bei der Firma Microsynth bestellt und sind in Tabelle 1 ersichtlich. Für die Long-Range Polymerase Chain Reaction (LR PCR) war es entscheidend, dass die Primer so platziert wurden, dass das PCR-Produkt das vollständige Exon ORF15 des *RPGR*-Gens mit einer Länge von 1.7 kb sowie die Exon-Intron-Grenzen enthält. Die Amplikons, die durch den forward Primer E15Flr und den reverse Primer E15Rlr entstehen, sind 2.1 kb lang und erfüllen diese Voraussetzungen. Die 100 µM Stock Konzentrationen aller Primer wurden vorab im Verhältnis 1:10 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt, um eine Konzentration von 10 µM zu erhalten.

Tabelle 1: Primersequenzen und deren Anwendung für die Amplifikation und Sequenzanalyse von Exon ORF15 des RPGR-Gens.

Primer	Primersequenz	Verwendung
E15Flr	5'-AGCCAGACAGTTACATGGAAGGTGCAA-3'	LR PCR
E15Rlr	5'-TGTCTTTGGCTCCTTAACACAGCTGCA-3'	LR PCR
E15SF1	5'-AGGCAAGGCAAATCAGTGG-3'	Sanger-Seq.
E15SF2	5'-GTAGAGGAGAAATGGAGAGG-3'	Sanger-Seq.
E15SF3	5'-AAGGAGAAGGGGAAGGGGAGGAT-3'	Sanger-Seq.
E15SF4	5'-AAGGCAGGATGGAGAGGAGT-3'	Sanger-Seq.
E15SF7	5'-TTCTGCTCCTGAACTACCTTCC-3'	Sanger-Seq.
E15SR2	5'-CTCTCCTTCCTCCTTTTCAC-3'	Sanger-Seq.
E15SR3	5'-CCTTCCTCCTCTTCCCCCTCA-3'	Sanger-Seq.
E15SR4	5'-GCCCGTTATATGCAAGGC-3'	Sanger-Seq.
E15SR5	5'-TGTTTGCCATATTTACAGATCCT-3'	Sanger-Seq.
E15SR7	5'- CCAAATCCATGGCAAAGTATG-3'	Sanger-Seq.

3.2.1 Long-Range PCR

Zur Austestung der Primer für die LR PCR wurde das Expand™ Long Template PCR-System Kit von Roche in Kombination mit 2 µl Human Genomic DNA Male / Female (Promega) verwendet. Das PCR-Programm bestand aus:

1. 95°C 15 min
2. 95°C 45 sec
3. 72°C 3,5 min
4. Zurück zu 2. für 34 weitere Zyklen
5. 72°C 15 min
6. 4°C forever

Nachdem die Test-PCR nach Überprüfung auf einem 1%igen Agarosegel (siehe Kapitel 3.2.3) kein spezifisches PCR-Produkt ergab, wurde das verwendete Kit durch das Expand Long-Range, dNTPack Kit von Roche ersetzt. Das gesamte Probenvolumen betrug 25 µl, die genauen Komponenten inklusive ihrer Volumina sind Tabelle 2 zu entnehmen. Die LR PCR wurde am Dyad® Peltier Thermal Cycler von Bio-Rad durchgeführt.

Da abermals kein PCR-Produkt generiert werden konnte, wurde das Volumen der Template-DNA von 2 µl auf 1 µl reduziert sowie eine Gradienten-PCR (64°C – 72°C) zur Bestimmung der optimalen Annealingtemperatur durchgeführt, wobei sich 68°C als optimale Temperatur herausgestellt hat. Für die Analyse der klinischen Proben wurde sodann das folgende LR PCR-Programm verwendet:

1. 94°C 2 min
2. 94°C 30 sec
3. 68°C 30 sec
4. 72°C 2 min
5. Zurück zu 2. für 34 weitere Zyklen
6. 72°C 10 min
7. 4°C forever

Für die Analysen der 55 Patient*innen sowie der 11 Kontrollen wurde je 1 µl DNA eingesetzt.

Tabelle 2: Komponenten inklusive Volumina für die LR PCR für eine Probe mit einem Endvolumen von 25 µl.

Komponenten	Volumina [µl]
MgCl₂	5
PCR Nucleotide Mix	1,25
forward Primer (E15Flr)	0,75
reverse Primer (E15Rlr)	0,75
DMSO	0,75
Expand Long-Range Enzyme mix	0,35
Nuklease-freies H₂O	15,15
Template-DNA	1

3.2.2 PCR für Sanger-Sequenzierung

Da die 2,1 kb großen Amplikons von der LR PCR im weiteren Verlauf für die Bestätigung der Mutationen mit Sanger-Sequenzierung zu groß wären, wurden weitere bereits publizierte Primer eingesetzt, mit der die Long-Range Amplikons in kleinere Abschnitte mit einer Größe von 278 bis 606 bp unterteilt wurden (für Details siehe Tabelle 1) (10). Die Primer wurden in sechs unterschiedliche Paare aufgeteilt, um nahezu das gesamte Exon ORF15 des *RPGR*-Gens abzudecken (Tabelle 3). Bei den Primerpaaren wurde darauf geachtet, dass ihre Schmelztemperaturen miteinander kompatibel waren und dass die Gesamtlänge von 650 bp nicht überschritten wurde. Zwei Bereiche, der 204 bp lange Abschnitt chrX:38146309-38146513 sowie der 299 bp lange Abschnitt chrX:38145435-38145733 (laut Referenzgenom hg19), blieben trotzdem ohne Abdeckung. Daher wurden für diese Regionen neue Primer designt.

Mit Hilfe des Webtools Primer3Plus wurden die Primer E15SF7 und E15SR7 entworfen, deren Amplikon die Region chrX:38146309-38146513 umschließt. Die Einstellungen umfassten eine gewünschte Größe von 250–650 bp, einen GC-Gehalt von 40-60%, eine Primergröße von 18-25 bp und eine Schmelztemperatur von 58-63°C, wobei die Abweichung dieser voneinander nur 1°C betragen durfte. Für den zweiten problematischen Sequenzbereich des Exons chrX:38145435-38145733 konnte aufgrund der hoch repetitiven Sequenzzusammensetzung auch mit großzügig gewählten Einstellungen in Hinblick auf die Schmelztemperatur und den GC-Gehalt keine Primer designt werden konnten.

Für die PCR wurde das HotStarTaq® Master Mix Kit (QIAGEN) laut Quick-Start Protokoll und der Dyad® Peltier Thermal Cycler von Bio-Rad verwendet. Die Komponenten inklusive Volumina sind in Tabelle 4 angeführt. Bei der Etablierung wurde ein Temperaturgradient von 53-67°C verwendet, um die passende Annealingtemperatur von 58°C zu finden. Das finale PCR-Programm lautet wie folgt:

1. 96°C 15 min
2. 94°C 45 sec
3. 58°C 30 sec
4. 68°C 1 min
5. Zurück zu 2. für 34 weitere Zyklen
6. 68°C 10 min
7. 4°C forever

Die Ergebnisse wurden mittels Gelelektrophorese laut 3.2.3 überprüft.

Tabelle 3: Primersequenzen und Produktlänge für die Analyse der LR PCR Amplikons mittels Sanger-Sequenzierung. Die Sequenzabfolgen der Primer sind Tabelle 1 zu entnehmen.

Primerpaare	Forward Primer	Reverse Primer	Länge der Amplikons [bp]
1	E15SF1	E15SR2	409
2	E15SF1	E15SR3	606
3	E15SF2	E15SR2	278
4	E15SF2	E15SR3	475
5	E15SF3	E15SR5	493
6	E15SF4	E15SR4	290
7	E15SF7	E15SR7	293

Tabelle 4: Komponenten inklusive Volumina für die PCR die als Grundlage für die Durchführung der Sanger-Sequenzierungen dient. Die Angaben sind für eine Probe mit einem Endvolumen von 12 µl.

Komponente	Volumen [µl]
HotStarTaq Master Mix	6
forward Primer	1,2
reverse Primer	1,2
Nuklease-freies H₂O	2,6
Template-DNA	1

3.2.3 Überprüfung am Agarosegel

Die PCR-Produkte wurden nach der Amplifikation immer auf einem 1%igem Agarosegel überprüft. Hergestellt wurde es durch Vermischung von 1 g LE Agarose mit 100 ml TBE-Puffer und anschließendem Erhitzen in der Mikrowelle bei 700 Watt für ca. 3 min. Nach dem Aufkochen wurden 10 µl GelRed® Nucleic Acid Stain hinzugefügt und gut gemischt bevor das Gel gegossen wurde. In den ausgesparten Taschen des ausgehärteten Agarosegels wurde für die Proben jeweils ein Gemisch aus 4 µl PCR-Produkt und 6 µl Stopplösung aufgetragen. Um eine Größenordnung der Amplikons zu ermöglichen wurden 2 µl Standard mit 4 µl Nuklease-freiem Wasser und 4 µl Stopplösung vermischt und neben den Proben aufgetragen. Für die Long-Range PCR wurde der 500 bp Molecular Ruler von Bio-Rad und für die kleineren Amplikons für die Sanger-Sequenzierung der DNA Molecular Weight Marker XIV 100 base pair ladder von Roche verwendet. Abschließend wurde die Gelelektrophorese bei 100 V für 50 min am PowerPac 300 von Bio-Rad gestartet. Um die Ergebnisse visualisieren zu können, wurde ein Gel Documentation Imaging System der Firma Vilber verwendet. Abbildung 1 dient der beispielhaften Darstellung.

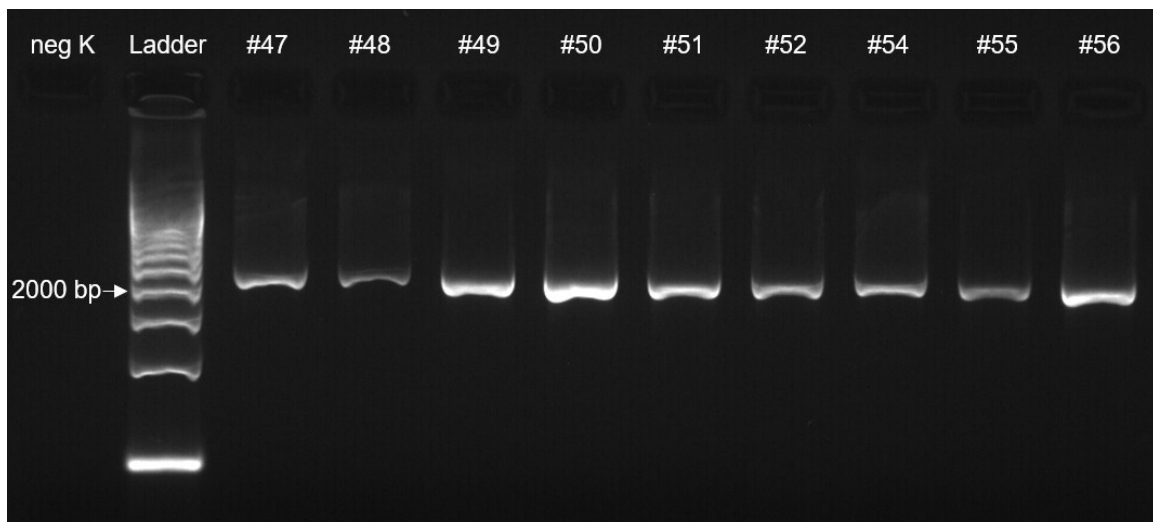


Abbildung 1: Beispiel von Amplikons der LR PCR auf einem Agarosegel nach der Gelelektrophorese. neg K = negativ Kontrolle, Ladder = 500 bp Molecular Ruler, # = Proben der Patient*innen. Laut Standard entsprechen sie der erwarteten Länge von 2,1 kb.

3.3 Aufreinigung der PCR-Produkte

Vor der Sequenzierung werden PCR-Produkte aufgereinigt um überschüssige Primer, Nukleotide, Salze und Polymerasen aus dem PCR-Ansatz zu entfernen. Dazu wurden zunächst AMPure XP paramagnetische Beads für die Aufreinigung der PCR-Produkte verwendet. Dafür wurden 25 µl Probe mit 45 µl Beads zusammengemischt, 10 min bei RT inkubiert, 5 min am Magnetständer inkubiert und anschließend der Überstand abgehoben und verworfen. Danach wurden zwei Waschschrirte mit 200 µl 70%igem Ethanol durchgeführt und der Überstand wieder verworfen. Abschließend wurde mit 25 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert, die Tubes auf dem Magnetständer platziert und der Überstand als aufgereinigtes Produkt abgehoben und in ein neues Tube überführt.

Aufgrund der mangelhaften Ergebnisse wurde schließlich auf eine Säulen-basierte Methode zurückgegriffen. Deshalb erfolgte die Aufreinigung der LR PCR-Produkte schließlich mit dem GeneJET PCR Purification Kit #K0702 von Thermo Fisher Scientific, das für DNA-Fragmente von 25 bp bis 20 kb geeignet ist. Dieses entfernt Primer, dNTPs, nicht inkorporierte Nucleotide, Enzyme sowie Salze aus Reaktionsgemischen. Die Aufreinigung wurde laut Protokoll A des Herstellers durchgeführt. Vor dem ersten Schritt wurden je 15 µl PCR-Produkt 1:2 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt, um die Volumina zu maximieren. Folglich wurden 30 µl Binding Buffer eingesetzt und die DNA abschließend mit 20 µl Elution Buffer von den Aufreinigungssäulen eluiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die aufgereinigten Proben bei -15°C bis -25°C gelagert.

3.4 DNA-Quantifizierung

3.4.1 NanoDrop

Als die ersten Versuche für die Long-Range PCR erfolglos waren, wurden sechs Proben mit NanoDrop von Thermo Fisher Scientific auf Konzentration und Reinheit überprüft. Diese Methode wurde erneut eingesetzt, als bei fünf Kontrollen keine Amplikons generiert werden konnten. Die Durchführung erfolgte laut Protokoll bei den Absorptionswellenlängen A260/280 und A260/230. Wenn das Verhältnis der Absorptionskoeffizienten bei den genannten Wellenlängen bei 1,8 liegt gilt die DNA als „rein“. Ist das Verhältnis deutlich niedriger, kann das ein Hinweis auf vorhandene Verunreinigungen sein. Bei beiden Anwendungen wiesen die Proben gute Reinheit und ausreichende Konzentrationen auf.

3.4.2 Qubit

Zu verschiedenen Zeitpunkten der Experimente wurden die DNA-Konzentrationen der Proben mit dem Invitrogen Qubit 4 Fluorometer von Thermo Fisher Scientific laut Protokoll bestimmt. Anfänglich wurden stichprobenartig gewählte DNA-Proben aus den Jahren 2018 und 2023 sowie dem dazwischenliegenden Zeitraum mit dem Qubit dsDNA Broad-Range (BR) Kit quantifiziert, um zu beweisen, dass die Qualität über die Jahre nicht abgenommen hat.

Der nächste Quantifizierungsschritt erfolgte nachdem die LR PCR bei fünf Kontrollproben anfangs trotz gleichbleibender Bedingungen nicht erfolgreich waren. Aufgrund der niedrigen Konzentrationen war es nicht möglich, die PCR-Produkte mittels Qubit dsDNA BR zu vermessen obwohl eine Überprüfung der DNA mittels NanoDrop eine ähnliche Reinheit und Konzentrationen ergab wie bei den bereits funktionierenden Proben. Nachdem eine erneute Auswahl der Kontrollproben durchgeführt wurde, konnten problemlos PCR-Produkte bei allen Proben erzeugt werden.

In Folge der Amplifizierung und wie im Abschnitt 3.3 beschriebenen Aufreinigung der Proben mit dem GeneJET PCR Purification Kit #K0702 von Thermo Fisher Scientific wurden alle Proben mit Qubit dsDNA BR vermessen, um anschließend die Konzentration für die Erstellung der Libraries zu kennen.

Nachdem für jede Probe eine Library laut Kapitel 3.5 generiert wurde, wurden diese mit dem Qubit dsDNA High-Sensitivity (HS) Kit vermessen. Diese Konzentrationen waren essenziell für das äquimolare Aufteilen der Proben auf drei Pools. Basierend auf den Ergebnissen wurde berechnet, welche Volumina der Libraries eingesetzt werden mussten, damit von jeder 10 ng in einem der Pools enthalten waren.

3.5 Library Preparation

Die Library Preparation für alle Proben inklusive Kontrollen wurde bis auf ein paar Abweichungen, die im nächsten Abschnitt näher erläutert werden, laut Nextera XT DNA Library Prep Reference Guide von Illumina (Document # 15031942 v06) durchgeführt. Die Schritte beinhalteten die Tagmentierung, Amplifikation der tagmentierten DNA und Aufreinigung der tagmentierten amplifizierten DNA.

Es wurden 1,5 ml Tubes anstelle von 96-Well-PCR-Platten verwendet. Die aufgereinigten Amplikons wurden im Vorfeld mit Nuklease-freiem Wasser auf eine Konzentration von 2 ng/µl verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden anschließend 5 µl für die DNA-Fragmentierung und Anheftung der Adaptor-Sequenzen gebraucht. Für die Amplifikation der tagmentierten DNA wurden bei dem in der Anleitung beschriebenen PCR-Programm 20 statt 12 Zyklen durchgeführt. Als Indices wurden pro Probe je 10 µl IDT® for Illumina - DNA/RNA DU Indexes verwendet. Die Aufreinigung der tagmentierte amplifizierten DNA erfolgte nicht wie im Protokoll erläutert mit Illumina Purification Beads, sondern mithilfe von AMPure XP Beads von Beckman Coulter laut Protokoll.

3.5.1 Qualitätskontrolle der Libraries

Die Größen und Konzentrationen der Libraries wurden unter Verwendung des 2100 Bioanalyzer Systems von Agilent Technologies vermessen. Diese Technologie stützt sich auf das Prinzip der Kapillarelektrophorese mit einer hohen Empfindlichkeit, um eine simultane Analyse mehrerer DNA-Proben hinsichtlich ihrer Größe [bp] und Konzentration [nmol/L] zu ermöglichen. In diesem Fall wurde sie zur Qualitätskontrolle von Libraries genutzt, die im weiteren Verlauf für NGS eingesetzt wurden. Dafür wurden High Sensitivity DNA Reagenzien und Chips laut Agilent High

Sensitivity DNA Kit Guide verwendet. Das High Sensitivity DNA Kit kann DNA-Fragmente in der Größe von ca. 50 bp bis 7000 bp detektieren und Konzentrationen zwischen 5-500 pg/ μ l bestimmen.

Damit die Librarykonzentrationen innerhalb des optimalen quantitativen Rahmens des Kit liegen, wurden die Libraries in unterschiedlichen Verhältnissen mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt (1:5, 1:10 und 1:20) und am Bioanalyser analysiert. Dabei ergab die 1:5 Verdünnung die optimale Konzentration für eine zuverlässige Konzentrations- und Größenbestimmung (Abbildung 2).

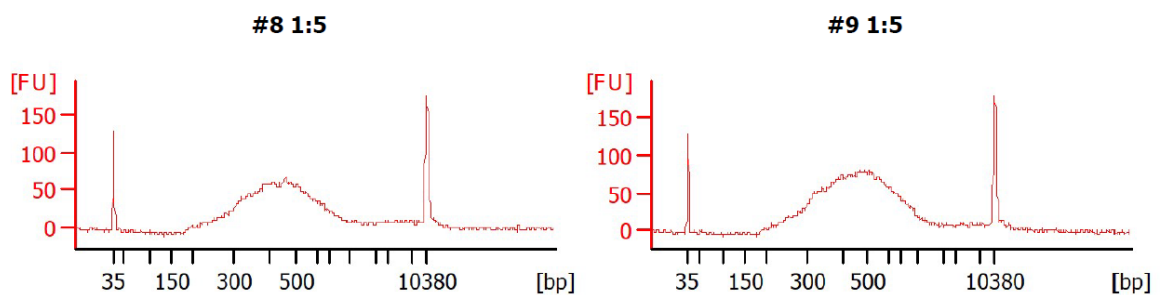


Abbildung 2: Libraries von Probe #8 und #9 1:5 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt zur Veranschaulichung. Auf der x-Achse sind Fluorescent Units (FU) und auf der y-Achse die Basenpaarlänge (bp) aufgetragen. Die dünnen Peaks links und rechts sind die Lower und Upper Marker und die Peaks in der Mitte Libraries.

Nach der äquimolaren Aufteilung der Libraries auf 3 Pools wurden diese mit dem Agilent DNA 7500 Kit laut Agilent DNA 7500 and DNA 12000 Kit Guide analysiert. Dieser kann Größen von 100-7500 bp und Konzentrationen von 05-50 ng/ μ l detektieren. Obwohl die erwarteten Konzentrationen der Pools im Messbereich liegen hätten sollen, waren keine Peaks erkennbar. Aus diesem Grund kam erneut der High Sensitivity DNA Kit zum Einsatz. Die Pools wurden sowohl in unverdünnter Form als auch in den Verdünnungen 1:5 und 1:10 mit Nuklease-freiem Wasser aufgetragen.

3.5.2 Quantifizierung der Libraries mittels qPCR

Wie bereits in Kapitel 3.4.2 erwähnt, wurden 3 Pools zu je 22 Libraries á 10 ng erstellt. Nach der Vermessung mit dem Qubit dsDNA HS Kit wurden diese mittels qPCR am StepOnePlus™ Real-Time PCR System der Firma Applied Biosystems™ quantifiziert, da qPCR die genaueste Methode zur Bestimmung von Konzentrationen darstellt. Hierbei kam der interkalierende Farbstoff SYBR Green von Biozym zum Einsatz, welcher bei der Entstehung von doppelsträngiger DNA bindet und dessen Fluoreszenzintensität dadurch zunimmt. So wird durch die Messung der Fluoreszenz eine Quantifizierung der DNA in der Ausgangsprobe ermöglicht.

Die verwendeten Primer wurden bei Microsynth bestellt. Die Sequenz des forward Primers lautet AATGATACGGCGACCACCGAGAT und die des reverse CAAGCAGAAGACGGCATACTGA. Sie wurden von der Firma lyophilisiert verschickt und im ersten Schritt mittels vordefinierter Menge an Nuklease-freiem Wasser vermischt, um eine Konzentration von 100 µM zu erhalten. Vor dem Gebrauch erfolgte eine erneute Verdünnung, sodass 10 µM eingesetzt werden konnten.

Mit PhiX Control v3 Library der Firma Illumina wurde eine Standardreihe mit Konzentrationen von 32 pM, 16 pM, 8 pM, 4pM, 2 pM und 1 pM erstellt. Die Konzentrationen der Pools wurden jeweils auf ungefähr 30 nM geschätzt, weshalb Verdünnungen von 1:1000, 1: 2000, 1:4000 und 1:8000 erzeugt wurden. Der Mastermix wurde in der Zusammensetzung gemäß Tabelle 5 hergestellt.

Tabelle 5: Komponenten inklusive Volumina für die qPCR für eine Reaktion.

Komponente	Volumen [µl]
Nuklease-freies H ₂ O	7
qPCR Primer forward und reverse 10 µM	1
SYBR Green	10

Anschließend wurden in alle benötigten Wells einer MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate 18 µl Mastermix und 2 µl der jeweiligen Verdünnung der Standards oder der Libraries pipettiert. Von jeder Verdünnung wurden Triplikate vermessen. Das verwendete PCR-Programm setzte sich zusammen aus:

1. 95°C 20 sec
2. 95°C 3 sec
3. 60°C 30 sec
4. 95°C 15 sec
5. 60°C 1 min
6. Zurück zu 2. für 39 weitere Zyklen
7. 95°C 15 sec
8. 4°C forever

Der threshold wurde automatisch bei 5,2 gesetzt. Bei den Amplifikationsdiagrammen wird das Fluoreszenzsignale jeder Probe gegen die Zykluszahl aufgetragen. In Abbildung 3 ist der Amplifikationsplot der Standardreihe mit PhiX zu sehen und in Abbildung 4 wird die Verdünnungsreihe des dritten Pools verdeutlicht. Die Pools 1 bis 3 wiesen Konzentrationen von 29,08 nM, 28,22 nM und 27,67 nM auf.

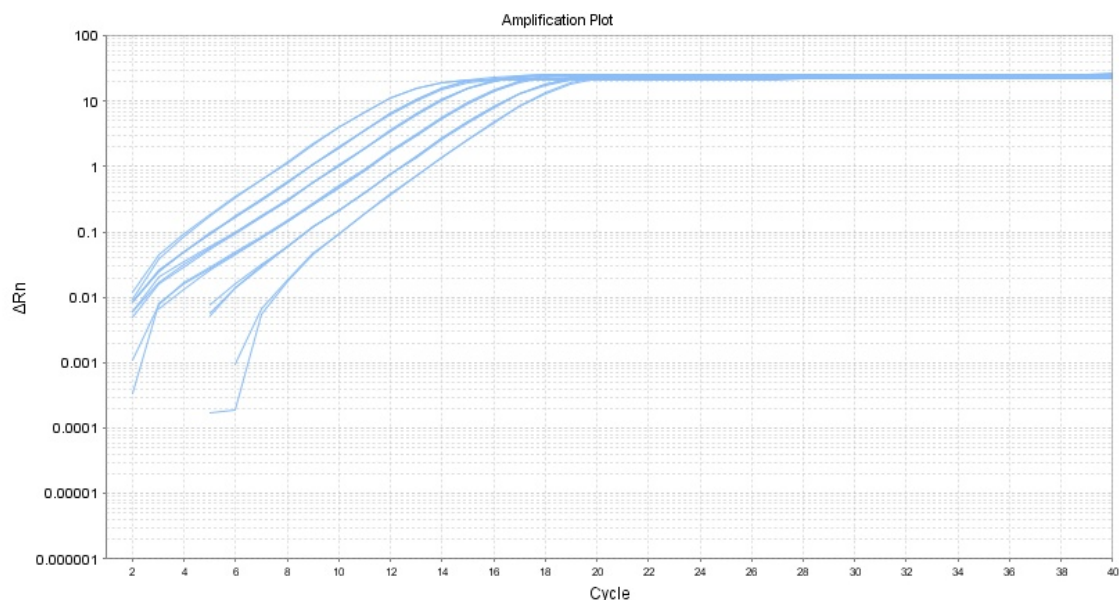


Abbildung 3: Amplifikationsplot der PhiX Control v3 Library Standardreihe. Von links nach rechts sind Konzentrationen von 32 pM, 16 pM, 8 pM, 4pM, 2 pM und 1 pM zu sehen. Die Triplikate liegen jeweils übereinander und die Abstände zwischen den Kurven sind regelmäßig. Der Threshold liegt bei 5,2.

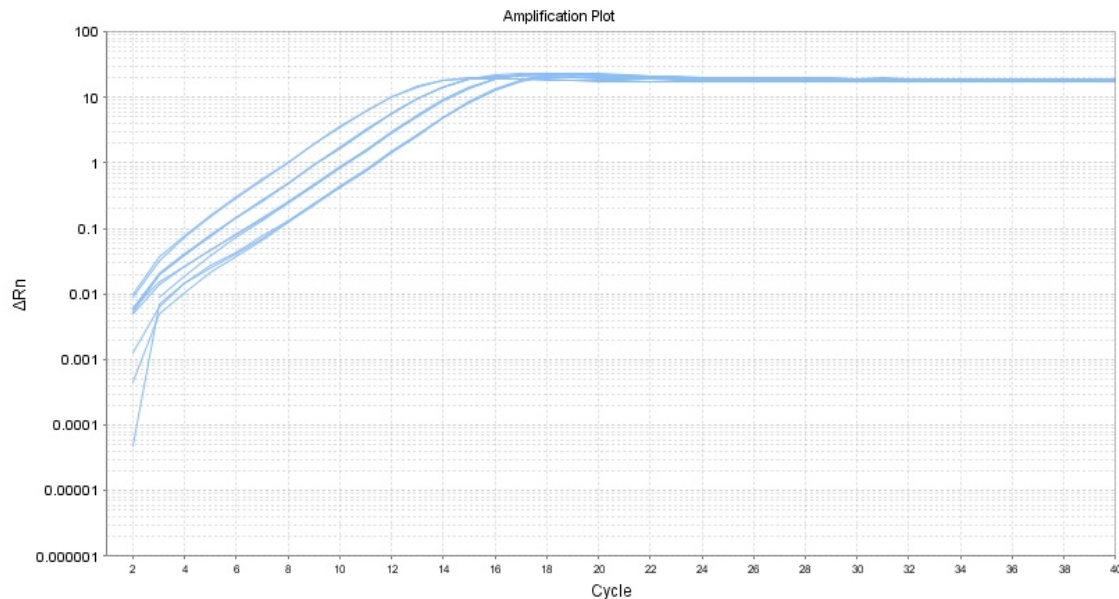


Abbildung 4: Amplifikationsplot der Verdünnungsstufen von 1:1000, 1: 2000, 1:4000 und 1:8000 von Pool Nummer 3. Die Triplikate liegen jeweils übereinander und die Abstände zwischen den Kurven sind regelmäßig. Der Threshold liegt bei 5,2.

3.6 Next Generation Sequencing

Vor dem Starten des NGS-Laufes wurden die Pools laut MiSeq System Denature and Dilute Libraries Guide (Document # 15039740 v10) Protokoll A von Illumina vorbereitet. Die drei Pools mit den 55 Proben der Patient*innen sowie den 11 Kontrollen wurde zusammengemischt und mit Nuklease-freiem Wasser auf 4 nM verdünnt. Nachdem PhiX Control v3 Library auch auf 4 nM durch die gleiche Herangehensweise eingestellt wurde, wurden die beiden Verdünnungen zusammengeführt. Um das optimale Verhältnis zu erreichen, erfolgte eine Mischung von 70% Proben-Library Pool mit 30% PhiX Control v3 Library. Davon wurde anschließend eine finale Verdünnung mit einer Konzentration von 12 pM erstellt.

Die Sequenzierung wurde am MiSeq™-System von Illumina durchgeführt. Dafür wurde das MiSeq® v2 Reagent Kit 300 Cycles PE und MiSeq® Reagent Nano Kit v2 von Illumina eingesetzt. Im Vorfeld wurden die IDT® for Illumina DNA/RNA DU Indexes im Gerät hinterlegt, damit sie den Proben richtig zugeordnet werden konnten. Die Illumina-Sequenzierung basiert auf dem Prinzip des Sequencing-by-Synthesis, bei dem die Synthese eines komplementären DNA-Strangs Nukleotid für Nukleotid verfolgt wird. Dies wird durch den Einsatz spezieller Nukleotide ermöglicht, die mit fluoreszierenden Labels versehen sind, wobei jedes Label eine

unterschiedliche Wellenlänge aufweist. Die Einbindung eines Nukleotids führt zum Abbruch der Synthese, da das angebrachte Label die Aktivität der Polymerase blockiert. Erst nachdem Enzyme die Labels entfernen, kann die nächste Runde der Synthese beginnen. Da ein einzelnes DNA-Molekül zu schwach wäre um detektiert werden zu können, wird zuvor eine gezielte PCR durchgeführt. Hierbei wird die DNA auf einer Flowcell fixiert und vervielfältigt. Dies führt zur Bildung von Clustern identischer Sequenzen, die ein messbares Signal erzeugen.

3.7 Sanger-Sequenzierung

Nach Durchlaufen der zweiten PCR und der dabei durchgeführten Unterteilung der 2,1 kb langen Amplikons in kleinere Stücke wurden die Proben für die Sanger-Sequenzierung herangezogen. Dieser Vorgang wurde bereits in Kapitel 3.2.2 beschrieben. Vor Beginn der Sequenzierung wurden als nötiger erster Schritt die überschüssigen Primer und nicht eingebauten Nukleotide aus den PCR-Produkten mittels ExoSAP-IT™ Express von Applied Biosystems™ entfernt. Dafür wurden 5 µl PCR-Produkt mit 2 µl ExoSAP-IT™ Express vermischt und dann in einen Thermocycler gegeben. Das Temperaturschritte bestand aus:

1. 37°C 4 min
2. 1 min 80°C

Für die Sequenzierung wurde ein Mix aus drei Komponenten erzeugt, deren Zusammensetzung Tabelle 6 zu entnehmen ist. Davon wurden im weiteren Verlauf je 9 µl in die benötigten Tubes pipettiert, 1 µl des jeweiligen PCR-Produkts und 1 µl des entsprechenden Primers hinzugefügt. Für jede bearbeitete Probe wurde separat jeweils eine Reaktion für forward und eine für reverse angesetzt. Je nachdem an welcher Stelle im Exon ORF15 die Veränderung lokalisiert war, wurde das passende Primerpaar aus Tabelle 3 ausgewählt, welches diesen Bereich abdeckte. Der Bereich chrX:38145435-38145733 kann aufgrund der repetitiven Sequenz nicht auf diese Weise sequenziert werden. Das verwendete PCR-Programm besteht aus:

1. 96°C 30 sec
2. 50°C 15 sec
3. 60°C 4 min
4. Zurück zu 1. für 24 weitere Zyklen
5. 4°C forever

Tabelle 6: Komponenten inklusive Volumina für die Sequenzierreaktionen für die Sanger-Sequenzierung. Die Mengen sind für eine Reaktion und werden nach Bedarf vervielfältigt.

Komponente	Volumen [μ l]
RNase-freies Wasser	6,8
BigDye™ Terminator	0,5
5x Sequenzierpuffer	1,4

Nach der PCR wurden die Sequenzierreaktionen mit Hilfe von Sephadex™-Säulen standardgemäß aufgereinigt. Zur Herstellung der Lösung wurden 4,31g Sephadex™ G-50 Superfine eingewogen und auf 50 ml mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Anschließend wurden Centri-Sep 8™ - Strips bis zur Markierung mit der Gebrauchslösung befüllt und 2 min bei 750 rcf zentrifugiert. Nachdem die Sequenzierlösung 1:1 mit RNase-freiem Wasser verdünnt und auf die Säulen pipettiert wurde, folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt von 2 min bei 750 rcf. Anschließend wurde mittels 3730 DNA Analyzer von Applied Biosystems™ sequenziert. Die Eckpunkte der Vorbereitung laut Handbuch sind Tabelle 7 zu entnehmen.

Tabelle 7: Eckpunkte für die Vorbereitung des ABI 3730 laut Handbuch.

	ABI 3730
Polymer	POP 7
Kapillare	36 cm
Injektionszeit	15 sec
Dyeset	Z

3.8 Auswertung

Die Auswertung der NGS-Daten erfolgte mit dem SEQUENCE Pilot von JSI medical systems, einer Software für genetische Analysen. Die Einstellungen, die am D&F für Humangenetik in Graz standardmäßig für die Routine verwendet werden, wurden für dieses Projekt teilweise adaptiert. Da die repetitive Natur des Exons ORF15 die Zuordnung der mit NGS generierten Reads zum Referenzgenom erschwert, wurde der „Quality Score Threshold“ und der „Ignore Reads Threshold“ ausgeschaltet. In den Expert Settings wurde „Skip Evaluation,“ ausgewählt und in den Settings die minimale Absolute Coverage bei 20 Reads belassen.

4 Ergebnisse

4.1 Ophthalmologische Abklärungen von 2018 bis 2023

Im Zeitraum von 2018 bis Februar 2023 wurden zahlreiche Patient*innen aufgrund von ophthalmologischen Fragestellungen am D&F für Humangenetik in Graz untersucht. Um ein besseres Verständnis für die Häufigkeitsverteilung der von Mutationen betroffenen Gene zu schaffen, wurde mit Hilfe einer Excel-Tabelle eine Übersicht erstellt. Das Dokument enthält die DNA-Nummern, Indikationen, durchgeführte Panels, Art der Sequenzierung, in der Familie bekannte Mutationen, Bewertung der Auffälligkeiten, sämtliche Varianten einschließlich ihrer Klassifizierung gemäß Datenbanken und Literatur sowie den Status, ob die Fälle als gelöst oder ungelöst betrachtet werden. Im folgenden Abschnitt werden die statistischen Erkenntnisse ausführlich in deskriptiver Form dargelegt.

Von den insgesamt 317 getesteten ophthalmologischen Fällen wurden bei 86 Fällen Untersuchungen zum Mutationsstatus im Zusammenhang mit einer bereits bekannten familiären Mutation durchgeführt. Bei diesen Patient*innen wurde lediglich die Region, in dem bei Familienmitgliedern eine Mutation auftrat, mittels Sanger-Sequenzierung überprüft. Da bei dieser Analyse eine umfassende Suche nach unbekanntem Veränderungen im Fokus stand, wurden die Statusabklärungen im weiteren Verlauf nicht berücksichtigt. Zu Beginn des genannten Zeitraums wurde die molekulargenetische Abklärung ophthalmologischer Fälle mittels Screeninguntersuchungen mit Hilfe des TruSight One (TSO) Panels von Illumina durchgeführt, das die kodierenden Regionen von ca. 5000 Genen anreichert, die

bekanntermaßen eine bedeutende Rolle in Erbkrankheiten spielen. Ab 2018 wurde das Nextera® Exome Enrichment Kit von Illumina für die Analysen eingesetzt, welche die bis dato bekannten gesamten kodierenden Bereiche des humanen Genoms (über 200000 Exons bzw. 20794 Gene) inkludiert. Seit November 2021 wird für die molekulargenetische Diagnostik das Human Core Exome Kit von Twist Bioscience verwendet, welches eine höhere Komplexität und Uniformität der Libraries bietet.

Insgesamt wurden Untersuchungen aufgrund von vierzig unterschiedlichen Indikationen durchgeführt. Am häufigsten wurden Analysen hinsichtlich des Verdachts auf eine Netzhautdystrophie veranlasst. Dieser Begriff bezeichnet zusammenfassend eine heterogene Gruppe an erblichen Netzhauterkrankungen, die durch eine gemeinsame fortschreitende Verschlechterung der Sehfunktion charakterisiert wird (23). Bei weniger als der Hälfte dieser Untersuchungen erfolgten die Sequenzierungen aufgrund des Verdachts einer vorliegenden RP, gefolgt von Analysen wegen dem Verdacht auf Morbus Stargardts. Dies ist die häufigste Form der Makuladegeneration im Jugendalter bei der Pigmentverwerfungen in der Netzhaut entstehen (4). Die zusammenfassende Abbildung 5 dient der numerischen und visuellen Darstellung der häufigsten Indikationen. Im betrachteten Zeitraum waren sechzehn Indikationen jeweils nur einmal als vermutete genetische Ursache der Symptome angeführt.

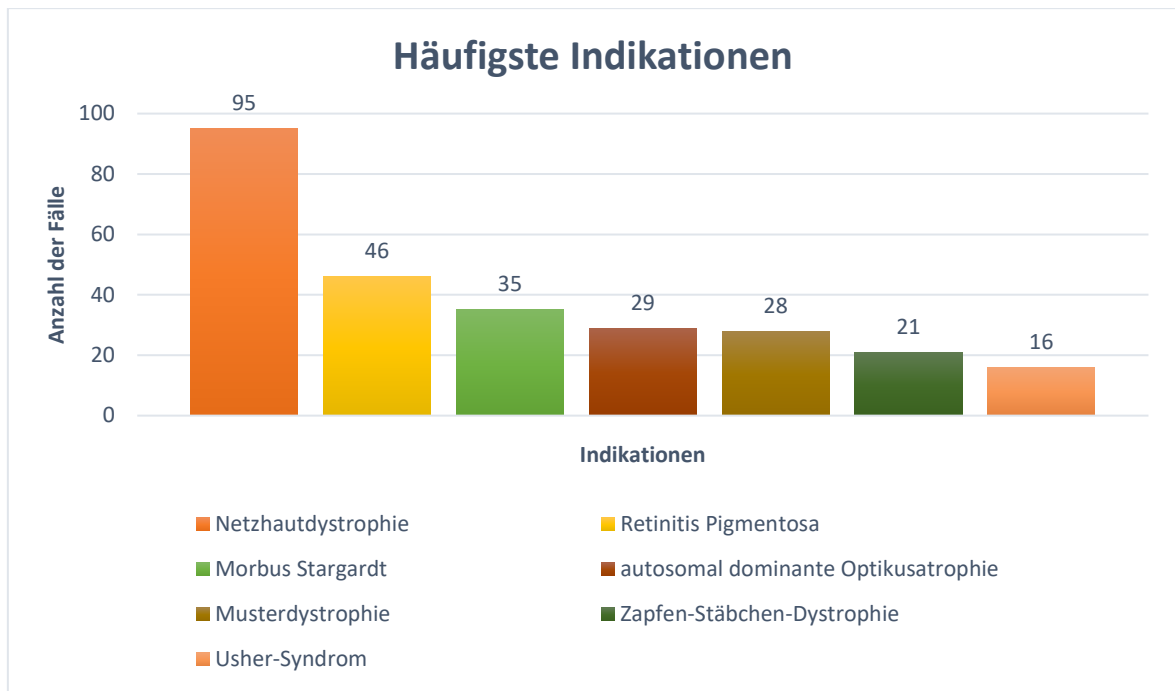


Abbildung 5: Darstellung der häufigsten Indikationen von Anfang 2018 bis Februar 2023.

Insgesamt wurden im untersuchten Zeitraum 231 Fälle analysiert und 221 Varianten in 58 Genen identifiziert. Abbildung 6 präsentiert die Gene, in denen die meisten Veränderungen identifiziert wurden. Im *ABCA4*-Gen wurden insgesamt 50 Varianten detektiert, die primär mit Krankheiten wie Morbus Stargardt oder ZSD assoziiert sind. Mutationen im *USH2A*-Gen werden mit Phänotypen wie RP und dem Usher-Syndrom in Verbindung gebracht. Veränderungen im *OPA1*-Gen können hingegen ursächlich für autosomal-dominante Optikusatrophien sein. Die zehn identifizierten Varianten im *PRPH2*-Gen könnten mit Makuladegenerationen oder RP in Zusammenhang stehen.

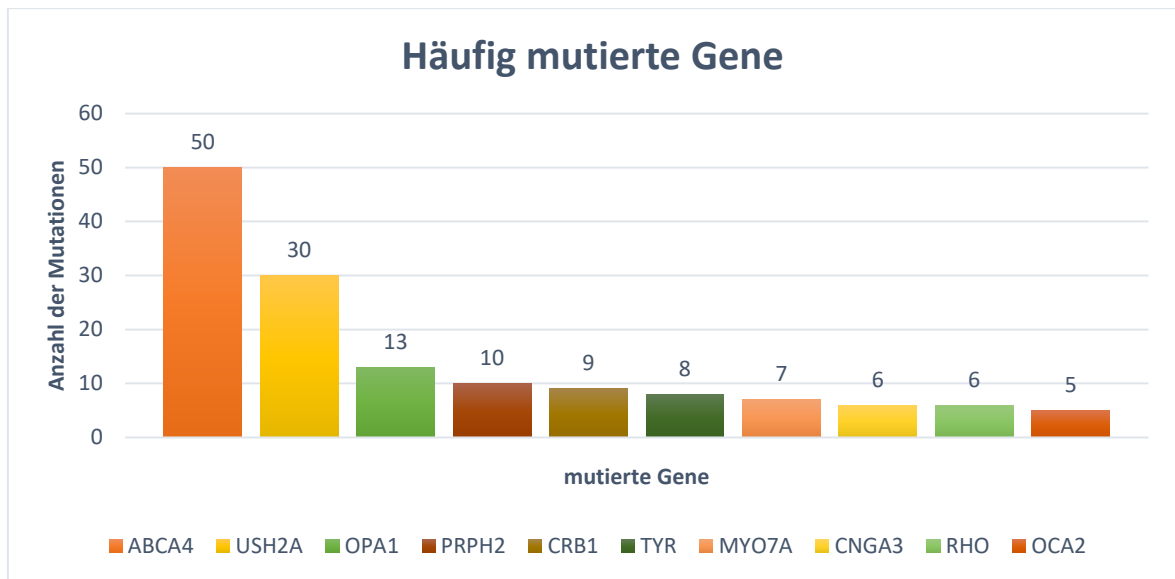


Abbildung 6: Das Säulendiagramm veranschaulicht die zehn Gene, in denen am häufigsten Mutationen gefunden wurden.

Von den 231 betrachteten Fällen, wurde bei 111 (48,1%) ein auffälliger Befund erstellt, wobei in 50 (21,6%) eine definitive molekulargenetische Ursache für die klinischen Auffälligkeiten gefunden werden konnte. Dies ist bei Betroffenen der Fall, bei denen beispielsweise pathogene Mutationen im homozygoten bzw. compound heterozygoten Zustand (*in trans* Stellung, auf unterschiedlichen Allelen) in rezessiven Genen nachgewiesen wurden. Patient*innen (n=31), in denen zwei heterozygote vorliegende pathogene Mutationen gefunden wurden, aber denen zur vollständigen Abklärung noch eine Segregationsanalyse fehlt, gelten als möglicherweise gelöst. Derzeit gelten 30 auffällige Fälle (13,0%) noch als ungelöst und in drei Fällen wurde ein Risikofaktor berichtet. Als Risikofaktor wird eine krankheitsrelevante Sequenzveränderung bezeichnet, welche signifikant häufiger bei Betroffenen gefunden wird, wobei das alleinige Vorliegen jedoch nicht zur Erkrankung führt. Bei den 12 Betroffenen bei denen eine Anlageträgerschaft nachgewiesen wurde, würde nur im homozygoten oder compound heterozygoten Zustand eine Ausprägung der Erkrankung erfolgen.

In 33 Fällen (14,3%) wurden VUS identifiziert, bei denen die derzeitigen Ergebnisse keine eindeutige Aussage über die Pathogenität der Variant zulassen. Bei 87 Fällen (37,7%) wurde ein unauffälliger Befund ausgestellt. Abbildung 7 zeigt die schematische Darstellung der Ergebnisse mittels Tortendiagramm.

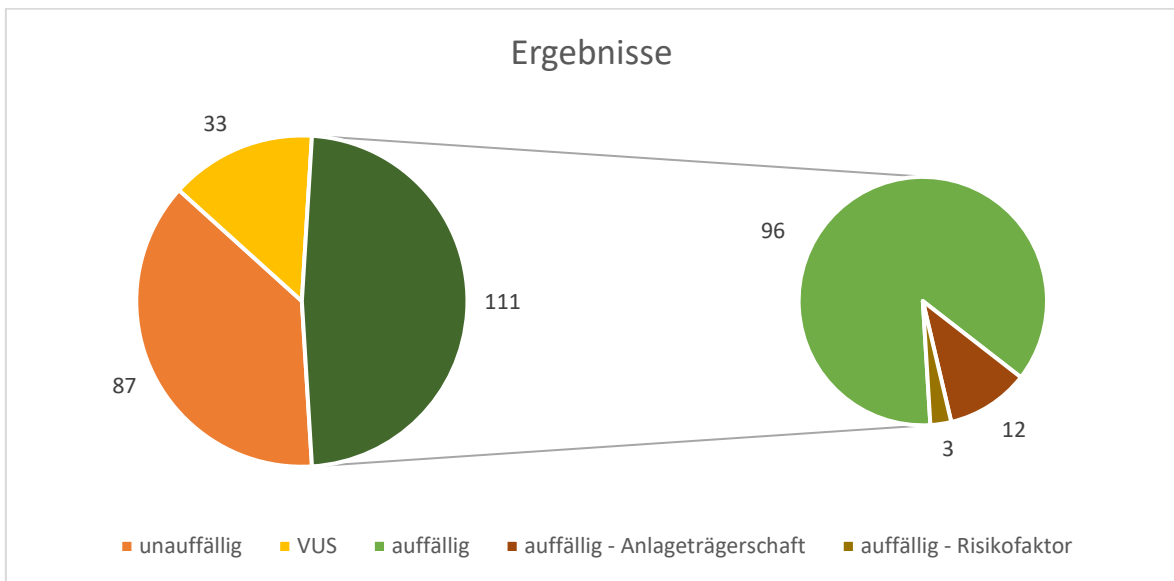


Abbildung 7: Unterteilung der Ergebnisse.

Während in nahezu der Hälfte nur eine Sequenzvariante berichtet wurde, gab es andere Betroffene, bei denen entweder keine oder mehrere Varianten in den finalen Befund aufgenommen wurden (Range, 0-6). Bei lediglich einem Patienten wurden sechs Varianten nachgewiesen. Die genaue Verteilung ist Abbildung 8 zu entnehmen.

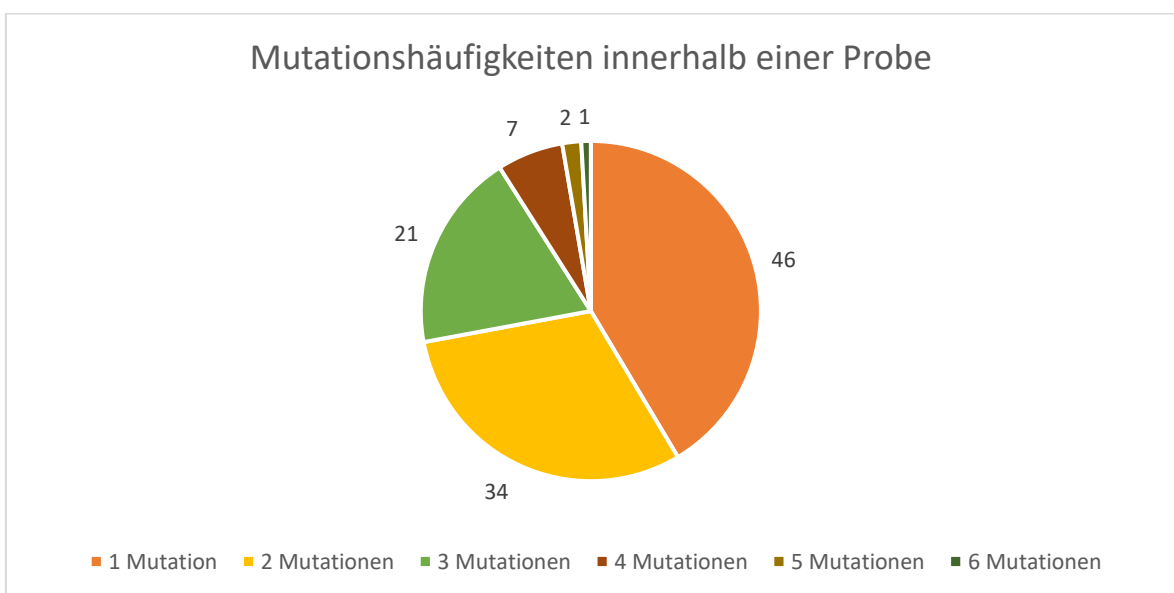


Abbildung 8: Darstellung der Mutationshäufigkeiten (1-6) innerhalb einer Probe.

4.2 Coverage

4.2.1 Coverage der LR-Proben

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, eine Methode zu entwickeln, um die Sequenzierung des gesamten Exon ORF15 des *RPGR*-Gens zu ermöglichen. Die Auswertung der NGS-Datensätze lieferte jedoch nicht die antizipierten Ergebnisse. Trotz einer geringen Erhöhung der zugeordneten Reads im stark repetitiven Abschnitt bleibt der Bereich von c.2420 bis c.3080 weiterhin nur minimal abgedeckt. Aus diesem Grund ist es nicht möglich, Veränderungen in diesem Bereich zuverlässig zu bewerten.

Zur Veranschaulichung des Unterschieds zwischen der durch diese Methode erzielten Abdeckung und dem problematischen Bereich wurden stichprobenartig zwei Loci ausgewählt und die Anzahl der Reads in diesen Regionen für alle 66 Proben analysiert. Als Locus mit guter Coverage wurde c.1950 ausgewählt. Im Durchschnitt wurden diesem Genlocus 3620 Reads zugeordnet, wobei die geringste Anzahl bei 1126 und die höchste bei 5744 lag. In der unzureichend abgedeckten Region wurde c.2650 zufällig ausgewählt. In diesem Bereich wurden zwischen 5 und 77 Reads aligniert, was einem Durchschnitt von 35 Reads entspricht. Die gesamten alignierten Amplikon-Reads der Proben belaufen sich auf 5488 bis 31269 mit einem Durchschnittswert von 19026.

4.2.2 Gegenüberstellung der Abdeckungen von WES und LR-Daten

Der Vergleich der NGS-Daten aus früheren Analysen mit denen dieses Projekts gestaltet sich schwierig. Zum Zeitpunkt des Einlangens der Proben wurde jeweils ein Whole Exome Sequencing (WES) durchgeführt, bei denen der Fokus darauf lag, Daten von allen Exons zu erhalten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden spezifisch Amplikons des Exons ORF15 erzeugt und sequenziert. Dadurch wurde prinzipiell bei den vorliegend erhobenen Daten eine größere Sequenziertiefe erreicht. Zudem wurden in den vergangenen fünf Jahren drei unterschiedliche Kits eingesetzt, die in Abschnitt 4.1 dargelegt sind. Zum Veranschaulichen wurde die Coverage an den Positionen der sechs tatsächlich vorhandenen Veränderungen, die in die Tabelle 9 aufgeführt sind, mit den Ergebnissen der vorherigen Analysen verglichen.

Die Gegenüberstellung ist in Tabelle 8 dargestellt, wobei die Anzahl der gesamten Reads und deren Aufteilung in Detektion des Wildtyps sowie der Variante aufgezeigt werden. Generell ist zu sagen, dass die Abdeckung an diesen Loci mit der LR-Methode deutlich höher ist. Probe 23 hat keine Ausgangswerte, da bei der zu diesem Zeitpunkt angewandten Vorgehensweise Exon ORF15 keine sequenzierte Zielregion darstellte. Bei Kontrollprobe 117 sind keine früheren Daten in diesem Bereich vorhanden, da sie eine Negativkontrolle ist bei der keine Analysen bezüglich ophthalmologischer Fragestellungen durchgeführt wurden. Der Vergleich der WES-Ergebnisse aus den Jahren 2018 bis 2023 zeigt, dass die verwendeten Methoden über die Jahre eine immer bessere Coverage des *RPGR*^{ORF15} erzielten. Vor allem die mit TWIST analysierten Proben weisen eine markante Verbesserung in dieser Region auf.

Tabelle 8: Überblick der Coverage an den Positionen der Mutationen. Vergleich der früheren Analysen (WES) und der Abdeckung, die durch Long-Range PCR und NGS (LR) erreicht werden konnte.

Probe	Reads gesamt	Read-Anzahl Wildtyp	Read-Anzahl Mutation
23 WES	-	-	-
23 LR	77	4	73
39 WES	9	6	3
39 LR	907	475	432
44 WES	127	79	48
44 LR	1124	564	560
51 WES	29	0	29
51 LR	494	44	450
111 WES	16	0	16
111 LR	47	18	25
117 WES	-	-	-
117 LR	2130	23	2117

4.2.3 Region mit unzureichender Coverage

Bereiche, die eine Coverage mit weniger als 20 Reads aufweisen, können nicht ausgewertet werden. Grund dafür ist die repetitive Natur der Sequenz des Exon ORF15, die die Zuordnung der Reads an das Referenzgenom erschwert. Die Regionen in den sechs ausgewählten WES-Daten, auf die dies zutrifft, wurden mit dem schlecht abgedeckten Bereich c.2420 bis c.3080 in den neuen Daten verglichen. Bis auf die Positivkontrolle weisen diese Abschnitte eine Länge von 673 bis 707 bp auf, wobei der größte c.2375 bis c.3082 umfasst. Nur Kontrolle #111 erzielte ein besseres Ergebnis mit einer 535 bp langen, nicht auswertbaren Region.

Abbildung 9 und Abbildung 10 dienen der visuellen Darstellung dieser schwierigen Bereiche. Sie zeigen einen Ausschnitt der Benutzeroberfläche des SEQUENCE Pilot von JSI medical systems, mit dem die genetischen Analysen ausgewertet wurden. Die rot markierten Zonen sind gekennzeichnet, da sie eine Coverage von unter 20 Reads aufweisen.



Abbildung 9: Bildausschnitt der Benutzeroberfläche des SEQUENCE Pilot. Dargestellt ist die Auswertung der WES-Daten der Probe 39. Der rot markierte Bereich c.2375-c.3082 ist mit weniger als 20 Reads abgedeckt.

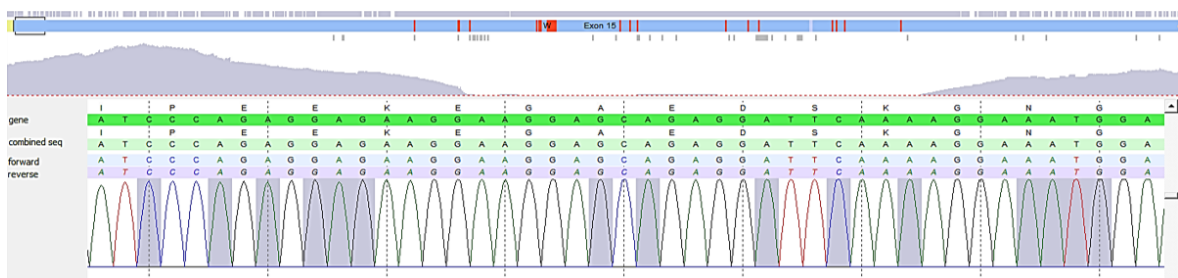


Abbildung 10: Bildausschnitt der Benutzeroberfläche des SEQUENCE Pilot. Dargestellt ist die Auswertung der LR-Daten der Probe 39. Der rot markierte Bereich weist eine geringe Coverage auf und kann nicht ausgewertet werden.

4.3 Analyse des Exons ORF15 des *RPGR*-Gens

Nach der Etablierung der LR PCR mit anschließender NGS des Exons ORF15 des *RPGR*-Gens wurden 55 DNA-Proben von Patient*innen analysiert. Diese Proben wiesen potentiell Sequenzvarianten in dieser Region auf. Zusätzlich wurden 11 Kontrollproben untersucht. Von allen DNA-Proben konnten erfolgreich Libraries sowieso aussagekräftige Sequenzierdaten generiert werden.

Die Sekundäranalyse erfolgte mittels der Software SEQUENCE Pilot. Nach dem sog. Variant Calling wurden die Sequenzvarianten (n=444) die nicht als häufige Polymorphismen (Populationsallelfrequenz >5%) klassifiziert wurden und die Veränderung in beiden Sequenzierungsrichtungen tragen („distinct variants“) in eine Excel-Tabelle exportiert. Varianten, die in weniger als zwanzig Reads vorkommen, wurden verworfen, wodurch die Anzahl der potentiellen Sequenzvarianten auf 25 reduziert wurde. Die Maßnahme zur Ausschließung von Veränderungen mit zu geringer Abdeckung diente der Entfernung offensichtlicher Artefakte. Nach der vorherigen Filterung wurden die verbleibenden Varianten einzeln mithilfe des SEQUENCE Pilot einer detaillierteren Analyse unterzogen, wobei weitere 19 als Artefakte identifiziert werden konnten. Dieser Prozess umfasste eine gründliche Analyse der Reads die Veränderungen aufwiesen und eine nachfolgende Bewertung ihrer Zuverlässigkeit.

4.3.1 Artefakte

Wie bereits in Abschnitt 4.3 erwähnt, wurden offensichtliche Artefakte von der weiteren Analyse ausgeschlossen, indem nach Varianten gesucht wurde, die in mindestens 20 Reads nachgewiesen wurden. Bei der nachfolgenden detaillierten Untersuchung konnten drei wiederkehrende Artefakte identifiziert werden. Die am häufigsten irrtümlich erkannte Variante dabei ist c.2667G>A. Sofern diese Veränderung vorhanden wäre, würde sie eine stille Mutation verursachen, die die Glutaminsäure an Position 889 beeinflusst. Diese Veränderung wurde in zehn Proben detektiert. Das Artefakt c.2422A>G wurde dreimal fälschlicherweise entdeckt. Dieses würde zu einer Missense-Mutation führen, bei der das an Position 808 lokalisierte Lysin durch eine Glutaminsäure ausgetauscht wird.

Bei drei Patient*innen wurde irrtümlich die Veränderung c.3062T>A entdeckt, welche an Position 1021 das Valin durch eine Glutaminsäure ersetzen würde. Durch die sorgfältige Analyse mithilfe des SEQUENCE Pilot wurden diese Mutationen falsifiziert und folglich von der weiteren Bewertung ausgeschlossen.

4.3.2 Identifizierte Mutationen

Trotz der wie oben beschriebenen Schwierigkeiten im Variant Calling für den hochrepetitiven Bereich des Exon ORF15 konnten unter Verwendung der Kombination aus Long-Range PCR und NGS insgesamt sechs Varianten detektiert werden, die nach Qualitätskontrollen und visueller Inspektion als „echte“ Varianten klassifiziert wurden (Tabelle 9). Insgesamt konnten bei den Patient*innen vier Mutationen nachgewiesen werden, die als pathogen bzw. wahrscheinlich pathogen eingestuft wurden. In der Positivkontrolle konnte das Vorliegen der bereits bekannten Nonsense-Mutation bestätigt werden. Zudem konnte in einer Kontrollprobe ein vermutlich seltener Polymorphismus festgestellt werden. Alle diese Varianten befinden sich in der kodierenden Sequenz des im *RPGR*-Gen liegenden Exons ORF15 und führen zu Proteinveränderungen. Mit Hilfe der in Abschnitt 3.7 detailliert erläuterten Sanger-Sequenzierung konnten alle Varianten bestätigt werden. Ihre Klassifizierung erfolgte durch eine ausführliche Literaturrecherche in PubMed® sowie der Konsultation internationaler Mutations- und Frequenzdatenbanken wie Genome Aggregation Database (gnomAD), ClinVar, HGMD und Franklin by Genoox. Die Sequenzvarianten werden laut HGVS-Nomenklatur beschrieben.

Kontrollprobe #111 wurde als Positivkontrolle verwendet, da sie eine aus Vorbefunden bekannte hemizygot vorliegende Nonsense-Mutation c.2635G>T, p.(Glu879*) aufweist. Die Mutation wurde bereits im Vorfeld durch Sanger-Sequenzierung bestätigt. Durch diese Veränderung entsteht ein vorzeitiges Stopcodon, das wiederum entweder zu einem verfrühten Abbruch der Proteinsynthese oder zum vorzeitigen Abbau der defekten mRNA führt. Da die Variante weder in internationalen Mutations- oder Frequenzdatenbanken, noch in der Literatur beschrieben ist, wird sie in Anlehnung an die ACMG-Standards als wahrscheinlich pathogen eingestuft.

Die Mutation liegt in einem Bereich des ORF15 der gut abgedeckt ist und konnte daher zuverlässig mit der LR PCR NGS Methode erkannt werden.

In Kontrolle #117 wurde ein Single Nucleotide Polymorphism (SNP) c.3231T>A gefunden, der als neutral bzw. wahrscheinlich neutral klassifiziert wird. Auch in Probe #44 wurde diese Missense-Mutation gefunden, bei der das üblicherweise an Position 1077 vorkommende Asparagin durch ein Lysin ersetzt wird. Die Allelfrequenz in der Population beträgt ca. 2%, wobei sie bei Ashkenazi Juden in 4,4% auftritt. Dieser SNP konnte in beiden Proben mittels Sanger-Sequenzierung unter Verwendung des Primerpaars 5 (Tabelle 3) bestätigt werden.

Bei Patient #23 wurde in ORF15 die Frameshift-Mutation c.2601_2602del, p.(Glu868Glyfs*210) gefunden. Diese Deletion von zwei Nukleotiden führt zu einem Aminosäurenaustausch von Glutaminsäure nach Glycin an Position 868 und darüber hinaus zu einem vorzeitigen Stopcodon an Position 210 des neuen Leserahmens. In der Literatur ist diese Veränderung bereits in Zusammenhang mit retinalen Dystrophien und Retinitis pigmentosa 3 beschrieben. Aufgrund der Tatsache, dass diese Mutation die Position chrX:g.38145650_38145651 betrifft, für die keine Primer designt werden konnten, ist diese die einzige Probe bei der die Mutation nicht mittels Sanger-Sequenzierung verifiziert werden konnte, da diese im sehr repetitiven Abschnitt liegt.

Eine weitere heterozygote pathogene bzw. wahrscheinlich pathogene Frameshift-Mutation c.2405_2406del, p.(Glu802Glyfs*32) wurde in Patient #39 gefunden. Die Folgen sind eine durch Glycin ersetzte Glutaminsäure an Position 802 und ein verfrühtes Stopcodon an Position 32 nach dem Frameshift. Die Deletion der zwei Nukleotide ist in der wissenschaftlichen Literatur bereits weitgehend dokumentiert und wird mit XLRP, retinalen Dystrophien, Makuladegeneration und RP3 assoziiert. Die Bestätigung dieser krankheitsverursachenden Veränderung erfolgte mittels Sanger-Sequenzierung mit dem in Tabelle 3 ersichtlichen Primerpaar 3.

In Probe #51 wurde eine als pathogen bzw. wahrscheinlich pathogen klassifizierte Frameshift-Mutation entdeckt. Diese zwei Basen große Deletion c.2236_2237del wurde in der Literatur bereits mehrmals im Zusammenhang mit RP, RP3, XLRP und retinalen Dystrophien allgemein beschrieben. Durch die Verschiebung des Leserasters wird die üblicherweise an Position 746 lokalisierte Glutaminsäure durch

ein Arginin ersetzt und ein vorzeitiges Stopcodon an Position 23 entsteht. Es ist davon auszugehen, dass die Veränderung ursächlich für die gestellte Diagnose ist. Auch diese Variante konnte mittels Sanger-Sequenzierung bestätigt werden.

Tabelle 9: Identifizierte Mutationen im RPGR-Gen in Exon ORF15. Die Mutationen sind im Transkript NM_001034853.2, welches in der Netzhaut exprimiert wird, im RPGR-Gen in Exon ORF15 lokalisiert und wurden laut HGVS-Nomenklatur beschrieben.

Nr.	Sex	Mutation cds	Mutation cds	Annotation	Interpretation
23	m	c.2601_2602del	p.(Glu868Glyfs*210)	frameshift	pathogen
39	f	c.2405_2406del	p.(Glu802Glyfs*32)	frameshift	pathogen / wahrscheinlich pathogen
44	f	c.3231T>A	p.(Asn1077Lys)	missense	neutral / wahrscheinlich neutral
51	m	c.2236_2237del	p.(Glu746Argfs*23)	frameshift	pathogen / wahrscheinlich pathogen
111	m	c.2635G>T	p.(Glu879*)	missense	wahrscheinlich pathogen
117	m	c.3231T>A	p.(Asn1077Lys)	missense	neutral / wahrscheinlich neutral

5 Diskussion

Das Ziel dieser Masterarbeit bestand darin, eine deskriptive Übersicht aller molekulargenetischen Untersuchungen zu erstellen, die zwischen Anfang 2018 und Februar 2023 am D&F für Humangenetik in Graz im Kontext klinischer Verdachtsdiagnosen erblich bedingter Augenerkrankungen vorgenommen wurden. Jene Fälle, in denen das *RPGR*-Gen bei Verdacht auf RP untersucht, jedoch keine ursächliche Mutation detektiert wurde, wurden im Zuge dieses Projekts reanalysiert. Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Entwicklung einer Methode zur Sequenzierung des gesamten Exon ORF15 des *RPGR*-Gens. Die Auswertung der Daten lieferte jedoch nicht die erwarteten Resultate. Trotz der größeren Sequenziertiefe und der geringen Erhöhung der zugeordneten Reads in der stark repetitiven Region blieb die Coverage im Bereich von c.2420 bis c.3080 weiterhin unzureichend.

Allgemein ist zu sagen, dass auf das Humangenomprojekt die Einführung der Hochdurchsatz-Sequenzierung folgte, welche Probleme bezüglich der Alignierung kurzer Reads an eine Referenz mit sich brachte, da schätzungsweise 50-69% des menschlichen Genoms repetitiv ist. Dadurch wird ein beträchtlicher Anteil der Sequenzierungs-Reads mehrfach gemappt, da keine eindeutige Platzierung im Genom durchgeführt werden kann.

Die beiden wichtigsten Parameter dafür, ob ein Read ein Multi-Mapping aufweist sind die Read-Länge und die Komplexität des Genoms. Lange Reads können heute schwierige, heterochromatische Regionen, einschließlich kompletter Zentromere, überspannen und gesamte Chromosomen charakterisieren. Darüber hinaus können identische Reads oder Repeat-Arrays anhand ihrer epigenetischen Markierungen, wie z. B. Methylierungsmuster, unterschieden werden, was den Zuordnungsprozess erleichtert. Wie repetitiv ein Genom ist kann man anhand der Read-Länge definieren die benötigt wird um ein Read erfolgreich zuzuordnen. Die Zuordnung wird zusätzlich erschwert, da Referenzgenome vereinfachte, lineare Darstellungen von Genomen einer bestimmten Art sind. Auch gute Darstellungen enthalten Lücken in schwierigen heterochromatischen Teilen. Darüber hinaus sind 5-10% des menschlichen Genoms nach wie vor unzureichend charakterisiert (24).

Obwohl die im Rahmen dieses Projekts verwendeten Methoden etabliert, optimiert und überprüft wurden, bleibt unklar, warum keine signifikante Verbesserung der Abdeckung von Exon ORF15 erzielt wurde. Eine mögliche Erklärung für das Problem ist, dass eine Tagmentierung der DNA stattfinden muss, um mittels Short-Read Sequencing Technologie sequenzierbare Fragmente zu erhalten. Die daraus resultierende Länge der einzelnen Stücke ist im repetitiven Bereich für die Software zu kurz für eine korrekte Zuordnung im Referenzgenom. Trotz der großzügigen Adaption der Qualitätsparameter im Rahmen der Auswertung konnten vermutlich viele sequenzierte Fragmente aufgrund dieser Limitation nicht richtig zugeordnet werden.

Aus diesem Grund besteht die Lösung dieses Problems vermutlich in der Nutzung einer Long-Read Sequencing Technologie. Dementsprechend könnte das 1,7 kb lange Exon durchgängig sequenziert werden, wodurch die Mapping-Schwierigkeiten eliminiert werden könnten. Im Juni 2023 wurde das Paper "Long-Read Nanopore Sequencing of *RPGR* ORF15 is Enhanced Following DNase I Treatment of MinION Flow Cells" von Yahya et al. veröffentlicht. In dieser Studie wurden erfolgreich krankheitsverursachende Varianten in Exon ORF15 mit Hilfe einer Kombination aus Long-Range PCR und Long-Read Nanopore Sequencing identifiziert. Die Autoren beschreiben, dass die PCR-basierte Zielanreicherung zum Abrutschen der Polymerase bei repetitiven Sequenzen führt und eine verzerrte Amplifikation von elterlichen Allelen passieren kann (25).

Der Fokus künftiger Forschungsarbeit in Hinblick auf die Sequenzierung des im *RPGR*-Gen lokalisierten Exon ORF15 liegt demnach auf der Erforschung von Long-Read Sequencing Technologien. Derartige Umsetzungen wären jedoch weit über den zeitlichen und finanziellen Rahmen der vorliegenden Thesis hinausgegangen.

6 Literaturverzeichnis

1. Aumüller G, Herausgeber. Anatomie: 208 Tabellen ; [mit CD-ROM zum Präp-Kurs]. Stuttgart: Thieme; 2007. 1344 S. (Duale Reihe).
2. Waldeyer A, Anderhuber F, Pera F, Streicher J, Herausgeber. Waldeyer - Anatomie des Menschen: Lehrbuch und Atlas in einem Band ; [44 Tabellen]. 19., vollst. überarb. und aktualisierte Auflage. Berlin: de Gruyter; 2012. 1176 S. (De Gruyter Studium).
3. Grehn F. Augenheilkunde [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019 [zitiert 5. Juli 2023]. Verfügbar unter: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-59154-3>
4. Casanovas J, Herausgeber. Augenheilkunde in Klinik und Praxis. 1: Anatomie, Genetik, Untersuchungsmethoden, Farbensehen, Lider, Tränenorgane, Bindehaut, Lederhaut: 26 Tab. / mit Beitr. von J. Casanovas. Stuttgart: Thieme; 1977. 652 S.
5. Berger W, Kloeckener-Gruissem B, Neidhardt J. The molecular basis of human retinal and vitreoretinal diseases. *Prog Retin Eye Res.* September 2010;29(5):335–75.
6. Maggi J, Koller S, Bähr L, Feil S, Kivrak Pfiffner F, Hanson JVM, u. a. Long-Range PCR-Based NGS Applications to Diagnose Mendelian Retinal Diseases. *Int J Mol Sci.* 3. Februar 2021;22(4):1508.
7. Georgiou M, Fujinami K, Michaelides M. Inherited retinal diseases: Therapeutics, clinical trials and end points—A review. *Clin Experiment Ophthalmol.* April 2021;49(3):270–88.
8. Francis PJ. Genetics of Inherited Retinal Disease. *J R Soc Med.* April 2006;99(4):189–91.
9. Verbakel SK, Van Huet RAC, Boon CJF, Den Hollander AI, Collin RWJ, Klaver CCW, u. a. Non-syndromic retinitis pigmentosa. *Prog Retin Eye Res.* September 2018;66:157–86.

10. Li J, Tang J, Feng Y, Xu M, Chen R, Zou X, u. a. Improved Diagnosis of Inherited Retinal Dystrophies by High-Fidelity PCR of ORF15 followed by Next-Generation Sequencing. *J Mol Diagn*. November 2016;18(6):817–24.
11. Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. Retinitis pigmentosa. *The Lancet*. November 2006;368(9549):1795–809.
12. Di Iorio V, Karali M, Melillo P, Testa F, Brunetti-Pierri R, Musacchia F, u. a. Spectrum of Disease Severity in Patients With X-Linked Retinitis Pigmentosa Due to *RPGR* Mutations. *Investig Ophthalmology Vis Sci*. 29. Dezember 2020;61(14):36.
13. Pschyrembel Online | Retinopathia pigmentosa [Internet]. [zitiert 30. Juni 2023]. Verfügbar unter: <https://www.pschyrembel.de/Retinopathia%20pigmentosa/K0JSP>
14. Carpi F, Tomei F. Non-invasive electroretinography. *Biomed Pharmacother*. September 2006;60(8):375–9.
15. Berson EL, Gouras P, Hoff M. Temporal Aspects of the Electroretinogram. *Arch Ophthalmol*. 1. Februar 1969;81(2):207–14.
16. Appelbaum T, Aguirre GD, Beltran WA. Identification of circular RNAs hosted by the *RPGR* ORF15 genomic locus. *RNA Biol*. 31. Dezember 2023;20(1):31–47.
17. Miano MG, Testa F, Strazzullo M, Trujillo M, De Bernardo C, Grammatico B, u. a. Mutation analysis of the *RPGR* gene reveals novel mutations in south European patients with X-linked retinitis pigmentosa. *Eur J Hum Genet*. September 1999;7(6):687–94.
18. Meindl A, Dry K, Herrmann K, Manson E, Ciccodicola A, Edgar A, u. a. A gene (*RPGR*) with homology to the *RCC1* guanine nucleotide exchange factor is mutated in X-linked retinitis pigmentosa (*RP3*). *Nat Genet*. Mai 1996;13(1):35–42.
19. Chiang JPW, Lamey TM, Wang NK, Duan J, Zhou W, McLaren TL, u. a. Development of High-Throughput Clinical Testing of *RPGR* ORF15 Using a

- Large Inherited Retinal Dystrophy Cohort. *Investig Ophthalmology Vis Sci.* 4. September 2018;59(11):4434.
20. Bader I, Brandau O, Achatz H, Apfelstedt-Sylla E, Hergersberg M, Lorenz B, u. a. X-linked Retinitis Pigmentosa: *RPGR* Mutations in Most Families with Definite X Linkage and Clustering of Mutations in a Short Sequence Stretch of Exon ORF15. *Investig Ophthalmology Vis Sci.* 1. April 2003;44(4):1458.
21. Vervoort R, Lennon A, Bird AC, Tulloch B, Axton R, Miano MG, u. a. Mutational hot spot within a new *RPGR* exon in X-linked retinitis pigmentosa. *Nat Genet.* August 2000;25(4):462–6.
22. RetNet: Summaries [Internet]. [zitiert 22. August 2023]. Verfügbar unter: <https://web.sph.uth.edu/RetNet/sum-dis.htm?csrt=18072950912693312207#A-genes>
23. Burk A, Burk R. Checkliste Augenheilkunde: 314 Abbildungen. 7., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag; 2023. 641 S. (Checklisten der aktuellen Medizin).
24. Cechova M. Probably Correct: Rescuing Repeats with Short and Long Reads. *Genes.* 31. Dezember 2020;12(1):48.
25. Yahya S, Watson CM, Carr I, McKibbin M, Crinnion LA, Taylor M, u. a. Long-Read Nanopore Sequencing of *RPGR* ORF15 is Enhanced Following DNase I Treatment of MinION Flow Cells. *Mol Diagn Ther.* Juli 2023;27(4):525–35.