

Aus der Universitäts-Augenklinik Tübingen
Abteilung Augenheilkunde II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. E. Zrenner

**Genotyp-Phänotyp Korrelation
bei
Dichromasie und anomaler Trichromasie**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät der
EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT
ZU TÜBINGEN

vorgelegt von
TANJA BREITSPRECHER
aus
Berlin-Schöneberg

2006

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. E. Zrenner

2. Berichterstatter: PD Dr. C. Schwarz

INHALTSVERZEICHNIS

	Abkürzungen und Einheiten	1
1	EINLEITUNG	3
1.1	Physiologie des Farbsehens	3
1.1.1	Trichromatische Farbwahrnehmung	3
1.1.2	Neuronale Verarbeitung	5
1.1.3	Retina	6
1.1.4	Verteilung der Photorezeptoren und Zapfenmosaik	8
1.1.5	Aufbau der Photorezeptoren	9
1.1.5.1	Stäbchen	9
1.1.5.2	Zapfen	10
1.1.6	Struktur der Opsin-Moleküle	10
1.1.7	Signaltransduktion	12
1.2	Genetik der trichromatischen Farbwahrnehmung	13
1.2.1	Evolution der L- und M-Opsingene	13
1.2.2	Lokalisation der Opsingene	15
1.2.3	Aufbau des Opsingen-Clusters	16
1.2.3.1	Genanzahl im Cluster	17
1.2.3.2	Reihenfolge der Gene im Cluster	18
1.2.4	Struktur der L- und M-Gene und der Pigmentmoleküle	19
1.2.4.1	Unterschiede auf Proteinebene	19
1.2.4.2	Polymorphismen	21
1.2.4.3	Hybridgene	21
1.2.4.4	Nomenklatur	22
1.2.5	Aminosäuresubstitutionen, Absorptionsmaxima und optische Dichte	23

1.2.6	Genexpression	25
1.3	Farbsinnstörungen	26
1.3.1	Allgemeines	26
1.3.2	Erworbene Farbsinnstörungen	29
1.3.3	Rot-Grün-Farbsinnstörungen	30
1.3.3.1	Ermittlung der Farbsinnstörung mit dem Anomaloskop	30
1.3.4	Protanopie und Deutanopie	32
1.3.4.1	Molekulargenetik	33
1.3.5	Protanomalie und Deuteranomalie	36
1.3.5.1	Molekulargenetik	37
1.3.6	Einfluss der optischen Dichte auf die Phänotypisierung	38
1.4	Ziel dieser Arbeit	39
2	MATERIAL	42
2.1	Geräte	42
2.2	Chemikalien	43
2.3	Enzyme	45
2.4	Oligonukleotide	46
2.5	DNA-Längenstandards	47
2.6	Verbrauchsmaterialien	47

2.7	Puffer und Lösungen	47
2.8	Lösungen zur DNA-Isolierung	49
3	METHODEN	51
3.1	Probanden	51
3.2	DNA-Isolierung aus Vollblut	51
3.3	PCR	52
3.3.1	LR-PCR zur Analyse der Gene und deren Reihenfolge im Cluster	53
3.3.1.1	LR-PCR zur Analyse des ersten Gens	54
3.3.1.2	LR-PCR zur charakterisierung der distalen Gene	55
3.3.1.3	LR-PCR zur Bestimmung des letzten Gens	56
3.3.2	PCRs aus LR-PCR-Produkten für Sequenzierungen und für Verdauung	57
3.3.2.1	Exon 2	58
3.3.2.2	Exon 3	59
3.3.2.3	Exon 4	59
3.3.2.4	Exon 5	60
3.3.3	PCR der Promoterregion	60
3.4	DNA-Restriktion	61
3.4.1	S180A-Polymorphismus	62
3.4.2	Letztes Exon 5 im Opsingen-Cluster	62
3.4.3	Mutation C203R	63

3.5	Gelelektrophorese	63
3.5.1	Agarose-Gelelektrophorese	64
3.5.2	Polyacrylamidgele (PA-Gele)	65
3.6	Single-Strand Conformation Polymorphism Electrophoresis (SSCP)	66
3.6.1	Radioaktive 5'-Endmarkierung von Primern	68
3.6.2	Nachweis von Radioaktivität mittels Phosphoimager	69
3.6.3	Beurteilung des Gellaufes	70
3.6.4	Auswertung mit dem Phosphoimager	71
3.7	Automatisierte Sequenzierung	72
3.8	Phänotypisierung mit dem Anomaloskop	74
4	ERGEBNISSE	75
4.1	Analyse der Gene und deren Reihenfolge im Cluster mittels LR-PCR	76
4.1.1	Detektion des ersten Gens	76
4.1.2	Distale Gene	77
4.1.3	Reihenfolge der Gene	78
4.2	S180A-Polymorphismus	79
4.3	Mutation C203R	80
4.4	SSCP-Auswertung	81

4.5	Sequenzierung	82
4.6	Ergebnisse mit dem Oculus HMC Anomaloskop	83
4.7	Ableitung des Phänotyps anhand der Genotypisierung	85
4.8	Genotyp-Phänotyp-Korrelation	86
4.9	Zusammenfassende Darstellung der Genotypen	87
4.9.1	Protanop/Protanomal	87
4.9.2	Deutanop/Deutanomal	89
5	DISKUSSION	91
5.1	Methodische Schwierigkeiten	92
5.1.1	Messungenauigkeiten am Anomaloskop	92
5.1.2	Genotypisierung – methodische Grenzen	93
5.2	Untersuchung der Genotypen	94
5.2.1	Protan-Defekte	95
5.2.1.1	Multi-Gen-Cluster	96
5.2.1.2	Single-Gen-Cluster	101
5.2.2	Deutan-Defekte	101
5.2.2.1	Multi-Gen-Cluster	103
5.2.2.2	Single-Gen-Cluster	107
5.3	Phänotypisierung	108
5.4	Vergleich Genotyp - Phänotyp	109

5.4.1	Protan-Defekte	110
5.4.2	Deutan-Defekte	111
5.4.3	Erklärungsmodelle zur phänotypischen Variabilität	112
5.5	Vergleich mit anderen Arbeiten und Schlussfolgerungen	115
6	ZUSAMMENFASSUNG	121
7	LITERATURVERZEICHNIS	124

Anhang

Danksagung

Lebenslauf

Abkürzungen und Einheiten

A (ala)	Alanin
APS	Ammoniumpersulfat
Bis	Bisacrylamid
BSA	bovine-serum-albumine (=Rinderserumalbumin)
bp	Basenpaare
C (cys)	Cystein
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytosin-5'-triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	double-strand (=Doppelstrang)
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintiphosphat
I (ile)	Isoleucin
IP	Imaging Plate
kb	Kilobase(n)
LCR	Locus Control Region
LR-PCR	Long-Range-PCR
LS	Loading-Solution
M (met)	Methionin
M	Molar
NaCl	Natriumchlorid

PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase chain reaktion (=Polymerasekettenreaktion)
R (arg)	Arginin
RT	Raumtemperatur
S (ser)	Serin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE-Puffer	Salz-Extraktionspuffer
SSCP	Single-Strand Conformation Polymorphism Electrophoresis
T (thr)	Threonin
Taq	Thermus aquaticus-Polymerase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Units
V (val)	Valin
Y (tyr)	Tyrosin

1 EINLEITUNG

Rot-Grün-Farbsinnstörungen zählen zu den häufigsten genetisch bedingten Funktionsstörungen beim Menschen. Ursache sind Veränderungen im Opsin-Cluster auf Chromosom Xq28. Aufgrund des X-chromosomal rezessiven Erbgangs sind vor allem Männer von dieser Störung betroffen. Je nach Schwere der Farbsinnstörung stellt diese v.a. für bestimmte Berufsgruppen, z.B. Piloten oder Elektrotechniker, ein wesentliches Problem dar.

Immer noch ist nicht genau geklärt, wie bei diesen Farbsinnstörungen der Phänotyp mit dem Genotyp zusammenhängt und welche anderen Faktoren hierbei zusätzlich eine Rolle spielen.

1.1 Physiologie des Farbensehens

1.1.1 Trichromatische Farbwahrnehmung

Farben entstehen durch Wahrnehmung von Lichtstrahlen bestimmter Wellenlängen. Schon im 19. Jahrhundert vermuteten Young, v.Helmholtz (v.Helmholtz 1896) und Maxwell (Maxwell 1855) in ihrer trichromatischen Theorie des Farbensehens drei verschiedene Zapfensysteme als unabhängige Sensoren des Farbensehens (photopisches Sehen). Heute weiss man, dass der Mensch alle Farben des sichtbaren Spektrums (d.h. mit Wellenlängen zwischen ca. 380 und 780 nm) über drei verschiedene Zapfensysteme in der Retina, die jeweils verschiedene Sehfärbstoffe (Pigmente, Sehpurpur) enthalten, erkennen kann (Übersicht hierzu bei Gouras & Zrenner 1981, Zrenner 1983). Die Pigmente unterscheiden sich in ihrer Empfindlichkeit für

Licht verschiedener Wellenlängen, sie haben ihre Absorptionsmaxima bei ca. 420, 530 und 558 nm (Dartnall et al. 1983, Oprian et al. 1991, Neitz et al. 1991, Merbs & Nathans 1992a, Asenjo et al. 1994, Sharpe et al. 1998a). In vivo sind die Maxima zu längeren Bereichen hin verschoben (ca. 440, 545 und 565 nm), da die Linse und das Pigment der Macula (Xanthophyll) Einfluss auf das einfallende Licht nehmen. Jeder Zapfen enthält nur eines der drei Pigmente, man nennt sie demnach S-, M- und L- (**s**hort, **m**iddle, **l**ong) sensitive oder blau-, grün- und rot-sensitive Zapfen.

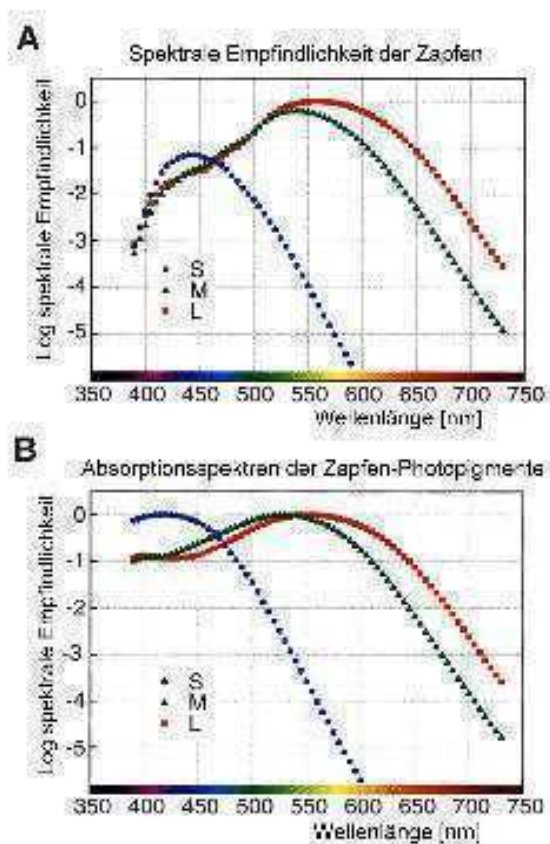


Abb. 1: Spektrale Empfindlichkeit und Absorptionsspektren der humanen Zapfen-Photopigmente (nach Sharpe et al. 1999b).

Die Zapfen sind im photopischen Bereich, d.h. dem Sehen bei Tageslicht, ausser für das Farbsehen insbesondere für die Sehschärfe in der zentralen Retina (Fovea) verantwortlich.

Die Stäbchen sind dagegen sensitiver und dienen dem skotopischen Sehen, d.h. dem Sehen bei Dunkelheit, mit einem Absorptionsmaximum bei 498 nm. Sie können sogar einzelne Lichtquanten detektieren. Im mesopischen Bereich (Dämmerlicht) tragen die Stäbchen zusammen mit den S-sensitiven Zapfen zu einem stark eingeschränkten Farbsehen bei (Hess et al. 1989a, Reitner et al. 1991).

Die Anzahl der absorbierten Lichtquanten in den Photopigmenten wird miteinander verglichen. Unterschiedliche Erregung der Photopigmente hat die Unterscheidung der verschiedenen Wellenlängen in Form von Farbtönen zur Folge. Der Verlust eines Photopigmentes führt zu dichromatischer Farbwahrnehmung, d.h. Farbwahrnehmung nur mit zwei verschiedenen Arten von Photopigmenten. Der Verlust von zwei Photopigmenten führt zu monochromatischer Farbwahrnehmung, also zur Farbwahrnehmung nur mit einer Photopigmentart. Fehlen alle drei Photopigmente, kann man keine Farben mehr wahrnehmen (skotopisches Sehen). Das Sehen ist dann auf die Stäbchen beschränkt.

1.1.2 Neuronale Verarbeitung

Beim Menschen und den höher entwickelten Primaten haben sich drei postrezeptorische neuronale Systeme entwickelt. Diese nachgeschalteten Systeme sind verantwortlich für die Weiterleitung und Weiterverarbeitung der entstandenen Signale in den Photorezeptoren. Sie unterscheiden zwischen hell-dunkel, gelb-blau und rot-grün.

Das erste System ist für die Kontrastwahrnehmung und die Unterscheidung zwischen hell und dunkel verantwortlich. Es summiert die relativen Absorptionsraten in den M- und L-Zapfen.

Das gelb-blaue Farbsystem verarbeitet hauptsächlich Informationen über den Farbkontrast, indem es die Menge der absorbierten Quanten in den S-Zapfen denen der M- und L-Zapfen gegenüberstellt.

Das rot-grüne Farbsystem vergleicht die relativen Absorptionsraten der M- mit denen der L-Zapfen.

Die Komplexität der übermittelten Farbinformationen hängt von der Anzahl der verfügbaren Zapfen und Photopigmente ab.

1.1.3 Retina

Das Auge entwickelt sich in der Embryogenese aus einer Ausstülpung des Vorderhirns (Prosenzephalon). Bei diesem Vorgang bilden sich die Augenbläschen, die sich später eindellen und zu einem doppelwandigen Kelch (Augenbecher) umformen. Der Augenbecher besteht aus zwei Blättern. Das äussere Blatt (die äussere Wand) wird zum Pigmentepithel und aus dem inneren Blatt differenzieren sich die übrigen Schichten der Retina. Die Retina ist die innerste Schicht im Auge und befindet sich über Pigmentepithel, Aderhaut und Sklera. Sie ist die Schicht, in der sich die Photorezeptoren (Zapfen und Stäbchen) befinden, die weiter unten beschrieben werden.

Das Pigmentepithel nimmt Einfluss auf die Ernährung der Photorezeptoren, indem es Metaboliten heran- und wieder wegtransportiert; es phagozytiert ausserdem abgestossene Aussenglieder der Photorezeptoren. Das Melanin der Pigmentepithelzellen fängt Streulicht auf und verhindert damit eine Lichtreflexion.

Der Diskus N. optici (Papille) und die Macula lutea (gelber Fleck) sind zwei markante Bereiche der Retina. Die Papille ist die Stelle der Netzhaut, an der die Nervenfasern aus dem N. opticus austreten, dort befinden sich keine

Photorezeptoren. Der gelbe Fleck befindet sich am hinteren Pol des Auges. In ihrer Mitte befindet sich die Fovea centralis, wo das Licht direkt auf die Photorezeptoren auftreffen kann, da hier die bipolaren Zellen und Ganglienzellen zur Seite gelagert sind. In der Fovea befinden sich nur Zapfen, die hier einzeln weiter verschaltet werden. Es findet somit keine Konvergenz zu den nachgeschalteten Ganglienzellen statt. Deshalb stellt die Fovea die Stelle des schärfsten Sehens dar.

Durch den Aufbau der Netzhaut bedingt muss das ausserhalb der Fovea auf die Netzhaut auftreffende Licht durch drei Schichten von Zellkernen und -fasern treten, bis es an die Photorezeptoren gelangt (inverse Lage der Photorezeptoren). Dort wird es von den Photopigmenten der Aussensegmente der Rezeptoren absorbiert und nach mehrstufigen photochemischen Reaktionen als elektrisches Signal weitergeleitet.

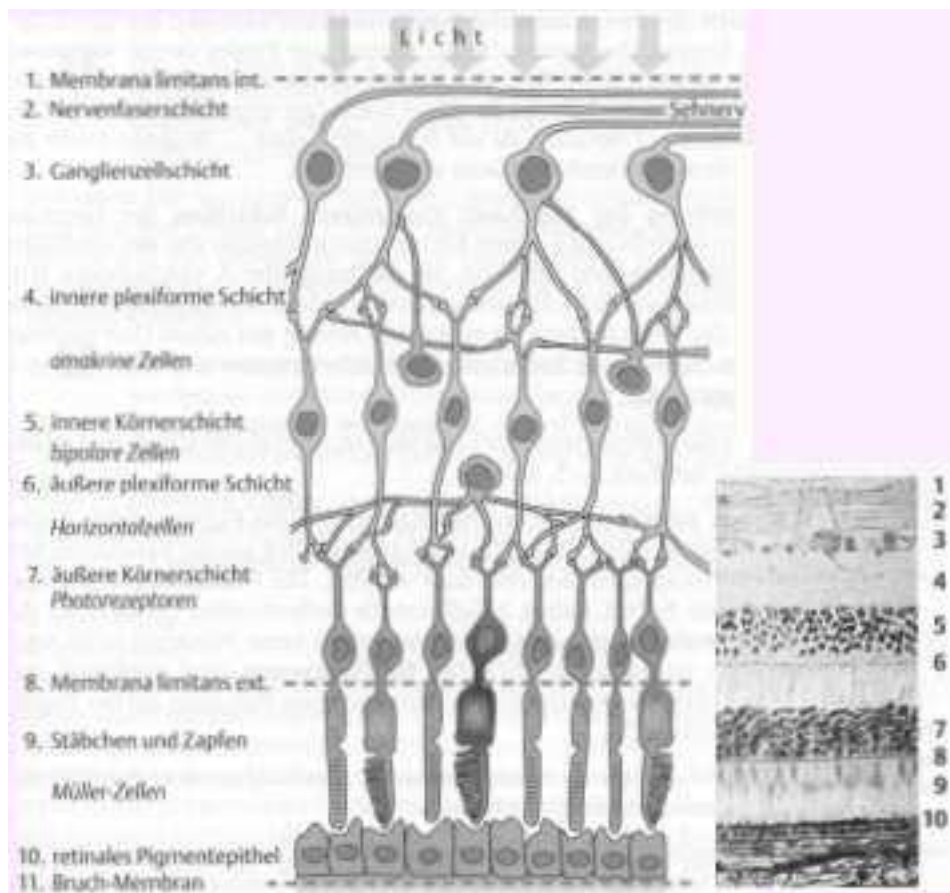


Abb. 2: Histologie und Funktion der Netzhautschichten (nach Lang, Augenheilkunde 1998).

1.1.4 Verteilung der Photorezeptoren und Zapfenmosaik

Die Stäbchen und Zapfen sind nicht gleichmässig im Auge verteilt, man findet in der Netzhautperipherie im wesentlichen Stäbchen, während im Zentrum, der Umgebung des hinteren Pols des Auges, die Zapfen lokalisiert sind. Diese sind hier einzeln verschaltet und ermöglichen so ein hohes Auflösungsvermögen. Im zentralen 1°-Areal der Retina, dem Bereich der Fovea, gibt es keine Stäbchen. In diesem Bereich gibt es ein ca. 0,35°-Areal, in dem auch keine S-Zapfen vorkommen (Curcio et al. 1991). L- und M-Zapfen kommen in der zentralen Retina im Verhältnis 1,5-2 zu 1 vor (Cicerone und Nerger 1989, Pokorny et al. 1991, Dartnall et al. 1983). Sie sind hier zufällig verteilt. Perifoveal gibt es ca. 7% S-Zapfen, evtl. kommen örtliche Anhäufungen von bis zu 12% vor (Dartnall et al. 1983, Cicerone und Nerger 1989, Curcio et al. 1991). Die Dichte der Stäbchen nimmt mit der Entfernung von der Fovea centralis zu, ihre höchste Dichte wird bei 18° erreicht. Ob das L-M-Zapfenverhältnis sich in der Netzhautperipherie und im Zentrum gleicht, hat man bisher nicht eindeutig feststellen können.

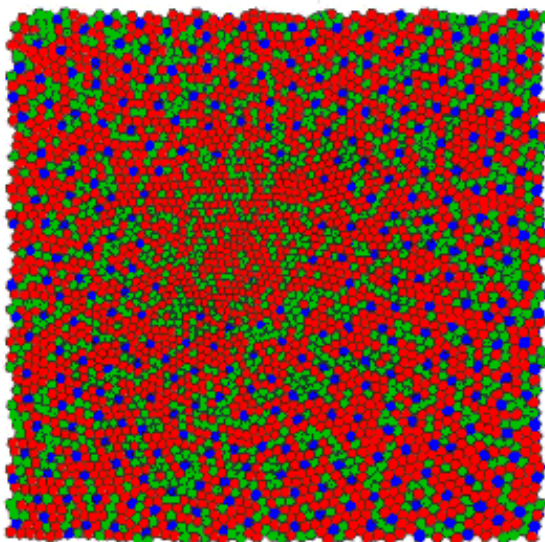


Abb. 3: Zapfenmosaik in der Fovea der humanen Retina. Computersimuliertes Zapfenmosaik in der Fovea eines Mannes. Im Zentrum fehlen jegliche Blauzapfen, in der restlichen Retina machen sie bis zu 7% aus und sind irregulär verteilt. Es sind etwa 1,5 mal mehr L- als M-Zapfen vorhanden (aus Sharpe et al. 1999b).

1.1.5 Aufbau der Photorezeptoren

Stäbchen und Zapfen sind vom Prinzip her ähnlich aufgebaut. Sie haben beide eine schlanke Gestalt und werden aufgeteilt in Aussenglied, Innenglied, kerntragenden Abschnitt und Endkolben. Aussenglied und Innenglied sind miteinander über eine exzentrisch gelegene zytoplasmatische Brücke verbunden. Das Aussenglied ist für den Empfang von Lichtsignalen zuständig, während das Innenglied für die Energiebildung und die Biosynthese verschiedener Substanzen verantwortlich ist. Der Endkolben bildet Synapsen mit den nachfolgenden bipolaren Zellen und leitet elektrische Signale an sie weiter (vgl. Abbildung 2).

Die Zapfen unterscheiden sich von den Stäbchen vor allem in der Form ihrer Aussenglieder und ihrem Photopigment.

Insgesamt enthält die Retina ca. 4,6 Millionen Zapfen und 92 Millionen Stäbchen (Curcio et al. 1990).

1.1.5.1 Stäbchen

Sie sind dünn und lang, ihr Aussenglied besteht vor allem aus vielen dicht übereinandergestapelten sog. Disks (flache Membranscheibchen), die wie Münzen in einer Geldrolle übereinander liegen. In den Membranen der Disks ist Rhodopsin eingelagert, ein Photopigment bzw. Sehfärbstoff. Es besteht aus dem Proteinanteil Opsin, welches über eine Schiff'sche Base kovalent mit der chromophoren Gruppe 11-cis-Retinal (Vitamin-A-Aldehyd) verbunden ist. Als Sehfärbstoff der Stäbchen absorbiert es das einfallende Licht.

1.1.5.2 Zapfen

Sie sind nach apikal hin verschmälert und ähneln so einem Zapfen. Auch enthalten sie nur scheinbar abgeschlossene übereinandergestapelte Disks. In Wirklichkeit handelt es sich um schmale lamellenartig gefaltete Invaginationen der Zellmembran, so dass auf diese Weise Kontakt zum Extrazellulärraum entsteht. Die Plasmamembranlamellen enthalten Photopigmente mit dem gleichen Chromophor (11-cis-Retinal) wie die Stäbchen, aber mit unterschiedlichem Proteinanteil (Opsin). Die Pigmente unterscheiden sich hinsichtlich der Maxima des von ihnen absorbierten Lichtes voneinander. Jeder Zapfen enthält vermutlich nur eines der drei Photopigmente.

1.1.6 Struktur der Opsin-Moleküle

Die Pigmentmoleküle konzentrieren sich im Aussensegment in der Plasmamembran der Photorezeptoren. Ihre unterschiedliche Struktur steht in enger Beziehung zu ihren unterschiedlichen Absorptionseigenschaften. Jedes Molekül besteht aus einem Opsin, welches aus sieben Transmembrandomänen besteht und mit dem Chromophor 11-cis-Retinal eine kovalente Bindung eingeht (vgl. Abbildung 4).

Das Opsin ist typischerweise aus 348 (S-Pigment) bzw. 364 (M- und L-Pigment) Aminosäuren aufgebaut, die eine regelmässige Abfolge von hydrophoben und hydrophilen Abschnitten bilden. Es bildet mit den hydrophoben Abschnitten sieben Helices, die die Zellmembran durchspannen (Hargrave et al. 1984). Diese sind durch hydrophile Abschnitte miteinander verbunden. Die Helices bilden so eine Palisade, die das 11-cis-Retinal umgeben (Caron & Lefkowitz 1991); dieses ist sowohl bei den Stäbchen als auch bei den Zapfen an Lysin in einer hoch konservierten Region innerhalb der

siebten Transmembrandomäne gebunden. Die Helices stehen an der Cytoplasmaoberfläche, der Seite im Zellinneren, näher zueinander (Baldwin 1993).

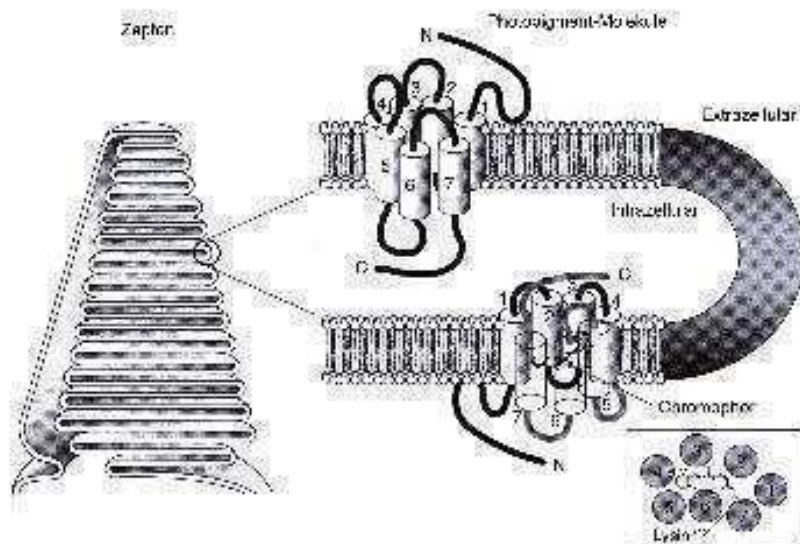


Abb. 4: Lage und Struktur der Photopigment-Moleküle in der Plasmamembran des Zapfenaussensegments (nach Sharpe et al. 1999b).

Die Opsine gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren oder Heptahelices. Zu dieser Familie gehören mehr als 200 Rezeptoren. Die Familie schliesst auch viele der Rezeptoren ein, die für die Kommunikation der Hirnzellen, der Hormone und Neurone verantwortlich sind. Die verschiedenen Formen der serotoninergen, dopaminergen, adrenergen und muscarinergen Acetylcholin-Rezeptor-Moleküle und auch die grosse Unterfamilie der olfaktorischen Rezeptoren sind Heptahelices, also fern mit den Opsinen verwandt (Watson & Arkininstall 1994). Alle Heptahelices sind in Zellmembranen eingebettet und aktivieren G-Proteine. Im Falle der Opsine nennt man das G-Protein Transducin (Lerea et al. 1989). Aber während das Opsin semipermanent an 11-cis-Retinal gebunden ist und sich davon löst, wenn ein

Photon das 11-cis-Retinal zu 11-trans-Retinal isomerisiert, besitzen andere Heptahelices eine leere Bindungstasche und aktivieren ihr G-Protein, wenn der passende Neurotransmitter, Hormon oder Geruchsstoff bindet.

1.1.7 **Signaltransduktion** (am Beispiel der Stäbchenphotorezeptoren)

Aufgabe der Photorezeptoren ist es, Lichtreize in elektrische Spannungssignale umzuwandeln (photoelektrische Transduktion) und diese über nachgeschaltete Nervenzellen ins Gehirn weiterzuleiten, wo der eigentliche Seheindruck entsteht.

Durch die Energie eines absorbierten Photons wird 11-cis-Retinal zu 11-trans-Retinal isomerisiert (Wald 1968). Dieser photochemische Prozess, der die Geometrie des Retinals verändert, führt zu mechanischen Spannungen im Opsin, welches dadurch eine Reihe struktureller Änderungen erfährt. Somit wird letztlich ein Photon in atomare Bewegung umgewandelt.

Das Opsin der Stäbchen wird Rhodopsin genannt. Metarhodopsin II, eine enzymatisch aktive Form des Rhodopsins, aktiviert das G-Protein Transducin und katalysiert somit den ersten Schritt der folgenden Enzymkaskade (Fung & Stryer 1980). Dadurch wird an der α -Einheit des Transducins gebundenes GDP gegen GTP ausgetauscht, und Transducin zerfällt in eine α - und eine β - γ -Einheit. Die α -Einheit aktiviert eine cGMP-Phosphodiesterase durch Bindung von inhibitorischem Protein. Diese aktivierte Form der Phosphodiesterase spaltet cGMP durch Hydrolyse der zyklischen Phosphodiesterbindung (Fung et al. 1981) und senkt dadurch innerhalb von Millisekunden den cGMP-Spiegel. Der cGMP-Spiegel wiederum ist für das Öffnen bzw. Schliessen eines spezifischen Ionenkanals in der Photorezeptormembran entscheidend. Im Ruhezustand bzw. im Dunkeln sind die Ionenkanäle in der Plasmamembran des Aussensegments geöffnet, so dass Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen in die Zelle

einströmen können (Dunkelstrom). Dadurch bildet sich eine elektrische Potentialdifferenz über der Membran aus. Durch Senkung des cGMP-Spiegels bei Lichteinfall wird eine Schliessung der cGMP-gesteuerten Ionenkanäle bewirkt, weniger Kationen strömen in die Zelle ein, wodurch die Zelle hyperpolarisiert und ein verändertes Signal an das Gehirn weitergeleitet wird.

Durch die o.g. Enzymkaskade löst ein einzelnes Lichtquant die Hydrolyse von über einer Million cGMP-Moleküle aus (Pugh & Lamb 1993).

1.2 Genetik der trichromatischen Farbwahrnehmung

1.2.1 Evolution der L- und M-Opsingene

Die L- und M-Opsingene sind, bezogen auf die DNA-Sequenzen ihrer 6 Exons, zu 96% identisch. Bezieht man noch die Introns und 3' die flankierenden Sequenzen mit ein, sind sie es zu 98%. Ausserdem liegen sie in unmittelbarer Nachbarschaft in gleichsinniger Orientierung zueinander (*head-to-tail* Konfiguration) auf dem X-Chromosom (Nathans et al. 1986a, Vollrath et al. 1988). Es wird daher (als eine der möglichen Theorien zu ihrer Evolution) angenommen, dass sie von einem gemeinsamen Vorläufergen auf dem X-Chromosom abstammen. Ihre Entstehung ist eine evolutiv noch sehr junge Entwicklung. Lediglich bei den höheren Primaten (Mensch und Altweltaffen) haben sich eigenständige Gene für Rot- und Grünopsin entwickelt, während niedrigere Primaten an deren Stelle ein einzelnes Opsingen für ein Pigment im mittleren/langwelligen Spektralbereich kodieren (Jacobs 1996).

Das Vorläufergen kodierte wohl für ein Pigment, welches sein Absorptionsmaximum bei 555 nm hatte, dem Wellenlängenbereich des

Sonnenlichts, der von grünen Pflanzen reflektiert wird (Lythgoe 1972). Es bildete die Basis für das *luminance subsystem* des Sehens.

Vor etwa 500 Millionen Jahren trat ein zweites Opsin auf (Nathans 1987, Chiu et al. 1994, Hisatomi et al. 1994). Es war auf Chromosom 7 lokalisiert. Durch Akkumulation von Sequenzunterschieden erlangte das kodierte Protein ein im Vergleich zum Ursprungsgen deutlich in den kürzerwelligen Bereich verschobenes Absorptionsmaximum (S-Zapfen-Pigment). Zudem wurde das Gen in einem anderen Rezeptortyp exprimiert, welches die Entwicklung von Neuronen zweiter Ordnung nach sich zog. Dadurch wurde die Grundlage für das Blau-Gelb-Gegenfarbensystem gelegt. Es entwickelte sich die Möglichkeit, verschiedene Arten von grünen Pflanzen zu differenzieren, die sich untereinander in ihrem Reflektionsverhalten von kurzwelligem Licht unterschieden (Hendley & Hecht 1949, Mollon 1996).

Schliesslich verdoppelte sich vor 30-40 Millionen Jahren das Vorläufergen auf dem X-Chromosom, wobei die LCR (Locus Control Region) (vgl. 1.2.3) nicht dupliziert wurde. Dadurch entstand ein drittes Opsin (Nathans 1987, Yokoyama & Yokoyama 1989, Yokoyama et al. 1993, Ibbotson et al. 1992, Tovee 1994). Die Weiterentwicklung des Vorläufergens zu zwei verschiedenen Genen, nämlich dem L- und dem M-Gen, kann auf verschiedene Weise erfolgt sein. Vermutlich führte die Anhäufung von Basensequenzveränderungen in den duplizierten Genen über eine immer grösser werdende Divergenz zur Endform der heutigen L- und M-Gene.

Damit das Rot-Grün-Gegenfarbensystem entstehen konnte, mussten sich entweder zwei getrennte neuronale Systeme entwickeln oder vorhandene Neurone zweiter Ordnung herangezogen werden.

1.2.2 Lokalisation der Opsingene

Die Opsine der S-, M-, L-Zapfen-Photopigmente und das Opsin der Stäbchen-Photopigmente sind durch vier verschiedene Gene kodiert. Diese werden OPN1SW (opsin 1, short-wave-sensitive), OPN1MW (opsin 1, middle-wave-sensitive), OPN1LW (opsin 1, long-wave-sensitive) und RHO (Rhodopsin) genannt. Psychophysiker nennen sie meist S-(**s**hort-), M-(**m**iddle-) und L-(**l**ong-wave) Zapfen-Pigmentgene und Stäbchen-Pigmentgene, manchmal werden sie auch B (**b**lue)-, G (**g**reen)- und R (**r**ed)-Gene genannt.

Die Gene, die S-Zapfen-Pigmente und Stäbchen-Pigmente kodieren, liegen jeweils als Einzelkopie vor. Das Gen für die S-Zapfen-Pigmente liegt auf dem langen Arm (q-Arm) von Chromosom 7 zwischen 7q31.3 und 7q32 (Nathans et al. 1986a, Fitzgibbon et al. 1994), das Gen für das Stäbchen-Photopigment findet sich auf dem q-Arm von Chromosom 3 zwischen 3q21 und 3q24 (Nathans et al. 1986a).

Im Gegensatz dazu liegen die Gene für die M- und L-Zapfen-Photopigmente auf dem q-Arm des X-Chromosoms im Chromosomenabschnitt Xq28 (Nathans et al. 1986a) in *repeat*-Form in einer sogenannten *head-to-tail*-Tandem-Anordnung vor (Vollrath et al. 1988, Feil et al. 1990). Jede Wiederholungseinheit besteht aus einer ca. 15 kb langen Opsingen-Sequenz und ca. 25 kb intergenischen Sequenzen. In der Regel liegt das L-Pigmentgen nur in einer einzigen Kopie am 5'-Ende des Clusters vor, während die M-Pigmentgene meist in mehreren Kopien - ein bis fünf Kopien bei kaukasischen Männern (Macke & Nathans 1997) - vorliegen und dem L-Pigmentgen folgen. Ausserdem liegt distal des 3'-Endes des Opsingen-Clusters ein Gen, welches TEX28 genannt wird. Die letzten fünf Exons dieses Gens sind in den intergenischen Sequenzen enthalten (vgl. Abbildung 5).

TEX28 wird in entgegengesetzter Richtung der Opsingene transkribiert (Hanna et al. 1997) und nicht in Photorezeptoren transkribiert. Seine Anwesenheit spielt

eine Rolle bei der molekulargenetischen Bestimmung des letzten Gens im Opsingen-Cluster.



Abb. 5: Aufbau eines typischen Opsingen-Clusters auf dem X-Chromosom. Die Pfeilspitzen geben die Transkriptionsrichtung der Gene an. (LCR=Locus Control Region; RCP=Red Cone Pigment Gen; GCP=Green Cone Pigment Gen; TEX28=vollständiges TEX28 Gen; t28=unvollständiges Fragment von TEX28; U=eine Wiederholungseinheit des tandemtemperierten Clusters) (nach Wolf 2002).

1.2.3 Aufbau des Opsingen-Clusters

Die Basensequenzen der Opsingene werden unterteilt in Introns und Exons. Die Exons sind meist kodierende Abschnitte, während die Introns nichtkodierende Abschnitte darstellen. Letztere enthalten aber vermutlich Sequenzen, die die Genexpression regulieren. Promoter regulieren die Transkription der DNA in RNA, sie liegen 5' des Transkriptionsstarts. Ausserdem interagieren sie mit der LCR (Locus Control Region), die im Opsingen-Cluster 3,1 bis 3,7 kb stromaufwärts vom Transkriptionsstart liegt. Dadurch wird die Transkriptionsrate und die Menge der Opsingen-Expression reguliert.

Die M- und L-Pigmentgene bestehen jeweils aus 6 Exons, die von 5 Introns unterbrochen werden. Sie weisen aufgrund ihres gemeinsamen Ursprungs (vgl. 1.2.1) eine hohe Homologie zueinander auf, wobei die Homologie der Introns zueinander höher ist als die der Exons. Die Exons weisen eine Homologie von 96% auf. Exons 1 und 6 sind identisch in ihrer Basensequenz, während Exons

2-5 sich hinsichtlich der von ihnen kodierten Aminosäuren nur an 15 Stellen unterscheiden. Davon beeinflussen sieben Stellen die spektrale Empfindlichkeit der Opsinproteine (vgl. 1.2.4.1).

Introns 2-5 sind in L- und M-Genen gleich lang. Im Gegensatz dazu enthält das Intron 1 des L-Gens bei mehr als 99% der Kaukasier und ca. 98% der Japaner eine Insertion von 1612 bp, sie besteht hauptsächlich aus Alu-Elementen und führt zu einem Längenunterschied zwischen dem L-Gen und dem M-Gen (Nathans et al. 1986a, Meagher et al. 1996). Die Insertion fehlt interessanterweise bei 45% der Afrikaner, 35% der Afro-Amerikaner und ca. 2% der Japaner (Jorgensen et al. 1990, Meagher et al. 1996). Vermutlich hat sich hier das Intron 1 des L-Gens aufgrund einer Genkonversion dem Intron 1 des M-Gens angeglichen.

Das gesamte M-Gen ist aus 13300 bp, das gesamte L-Gen aus 15200 bp zusammengesetzt. Der kodierende Bereich beider Gene schliesst 1092 bp ein. Das Protein besteht jeweils aus 364 Aminosäuren.

Die Promoter der L- und M-Gene unterscheiden sich in bestimmten Sequenzen. Vor Exon 1 des L-Gens findet man vom M-Gen abweichende 5'-Sequenzen. Ausserdem liegt vor dem L-Opsingen die LCR. Diese Unterschiede sind für die molekulargenetische Unterscheidung von L- und M-Genen relevant.

1.2.3.1 Genanzahl im Cluster

Die Anzahl der Opsingene im Cluster ist individuell verschieden. Typischerweise findet man Cluster mit einem Rot-Opsingen gefolgt von ein oder mehreren Grün-Opsingen (Vollrath et al. 1988). Die Anzahl der Grün-Opsingene innerhalb der normalen Population wird kontrovers diskutiert, dies

liegt an den unterschiedlichen Nachweismethoden, die abweichende Ergebnisse liefern. Die Variabilität in der Anzahl der Rot-/Grün-Opsingene wird durch ungleiche (inequale) homologe Rekombination zwischen den Opsingenen verursacht (Nathans et al. 1986b).

Die wichtigsten indirekten Methoden zur Bestimmung der Genanzahl im Opsingen-Cluster sind Southern-Blot-Nachweis von RFLPs und deren Quantifizierung nach Auftrennung mittels Gelelektrophorese (Nathans et al. 1986a, Drummond-Borg et al. 1989, Wolf et al. 1999), Quantifizierung von endmarkierten Restriktionsfragmenten aus PCR-Produkten (Neitz & Neitz 1995, Neitz et al. 1995, Wolf et al. 1999), SSCP-Analyse von PCR-Fragmenten aus M- und L-Gen Promoter-Sequenzen (Yamaguchi et al. 1997).

Direkte Methoden sind Pulsfeld-Gelelektrophorese von Not1-R Fragmenten (Macke & Nathans 1997, Wolf et al. 1999) und Fiber-FISH (Wolf et al. 1999). Die Ergebnisse der direkten Methoden stimmen exakt miteinander überein, sind aber in ihrer Durchführung sehr aufwendig. Aus ihnen geht hervor, dass durchschnittlich drei Gene im Cluster vorhanden sind.

Teilweise wurden mehrere L-Gene nachgewiesen (Neitz & Neitz 1995). Dies liegt wahrscheinlich an der Nachweismethodik, bei der strukturell M1L2-Hybridgene (zur Nomenklatur vgl. 1.2.4.4) mit einberechnet wurden.

1.2.3.2 Reihenfolge der Gene im Cluster

Aufgrund ihrer Ähnlichkeit ist es schwierig, eine direkte Nachweismethode für die Reihenfolge der Opsingene im Cluster zu finden. Bisher gilt es als gesichert, dass am proximalsten Ende eines Clusters ein L-Gen (oder auch ein LM-Hybridgen) positioniert ist, distal davon liegen ein oder mehrere M- und/oder ML-Hybridgene (Vollrath et al. 1988).

Es gibt zwei Erklärungen für die Lage des L-Gens am proximalsten Ende des Clusters: zum einen differieren die 5'-Anschlusssequenzen vor Exon 1 des L-Gens von denen der M-Gene (Nathans et al. 1986a). Dies bedeutet, dass die Lage des L-Gens mitten im Cluster dessen Tandem-Anordnung unterbrechen würde, ein Crossing over wäre erschwert. Zum anderen zeigen Untersuchungen bei bestimmten Formen von Farbfehlsichtigkeit, dass das 3'-Ende des L-Gens dupliziert oder deletiert ist, während das 5'-Ende immer unverändert vorliegt (Nathans et al. 1986b). Das L-Gen lag hier folglich immer an erster Stelle vor, ein Crossing over Ereignis fand also nie proximal von Exon 1 des L-Gens statt.

Die Reihenfolge der Gene im Cluster interessiert insbesondere, wenn es um die Genexpression geht, denn bisher geht man davon aus, dass nur die ersten beiden Gene in relevanten Mengen exprimiert werden und für das Farbsehen verantwortlich sind (Nathans et al 1989, Winderickx et al 1992a) (vgl. 1.2.6).

Bei einer Gesamtanzahl von drei Genen in einem Cluster ist es möglich, deren Reihenfolge zu bestimmen (vgl. 3.3.1). Leider ist es bisher nicht möglich, die Reihenfolge der Gene in grösseren Clustern zu bestimmen.

1.2.4 Struktur der L- und M-Gene und der Pigmentmoleküle

1.2.4.1 Unterschiede auf Proteinebene

Die L- und M-Pigmentmoleküle unterscheiden sich nur in 15 ihrer insgesamt 364 Aminosäuren voneinander (vgl. Tabelle 2). Diese werden von Exons 2-5 kodiert und liegen an Aminosäure-Positionen 65, 111 und 116 (von Exon 2 kodiert), 153 und 180 (von Exon 3 kodiert), 230, 233 und 236 (von Exon 4

kodiert) und 274, 275, 277, 279, 285, 298 und 309 (von Exon 5 kodiert). Exons 1 und 6 sind in den M- und L-Opsingenen identisch (Nathans et al. 1986a).

Neun der Substitutionen beinhalten den Austausch einer unpolaren mit einer Hydroxylgruppe-tragenden (polaren) Aminosäure, wobei die Aminosäure an Position 116 in der ersten extrazellulären Schleife des Moleküls liegt und wahrscheinlich nur indirekt mit dem Chromophor interagiert.

Theoretisch bewirkt ein Austausch einer unpolaren mit einer polaren Aminosäure eine Änderung des Absorptionsverhaltens des 11-cis-Retinal (*spectral tuning*), wenn die Aminosäure in den transmembranösen Helices liegt. Die Aminosäure verändert hierbei die dreidimensionale Struktur oder die Ladung der Umgebung (Nathans et al. 1992, Kropf & Hubbard 1958, Mathies & Stryer 1976, Hays et al. 1980).

Sieben Substitutionen, bei denen eine ungeladene mit einer Hydroxylgruppenhaltigen Aminosäure ausgetauscht wird, liegen innerhalb der transmembranösen Helices und sind für den Unterschied von 32 nm in den Absorptionsmaxima von L- und M-Pigment verantwortlich (Merbs & Nathans 1992, Asenjo et al. 1994, Sharpe et al. 1998). Diese sind die Aminosäuren an den Stellen 65, 180, 230, 233, 277, 285 und 309. Sie verschieben jeweils für sich alleine genommen das Absorptionsmaximum der Opsinpigmente um bestimmte Werte (*spectral shift*, vgl. Tabelle 2) (Merbs & Nathans 1992, Merbs & Nathans 1993). Die Aminosäuresubstitutionen in Exon 5 alleine bewirken schon eine Differenz der Absorptionsmaxima ($\Delta\lambda_{\max}$) der beiden Opsinpigmente von 22 nm, so dass die DNA-Sequenz im Exon 5 des Opsingens im wesentlichen über die funktionellen Eigenschaften des resultierenden Proteins entscheidet.

1.2.4.2 Polymorphismen

Von den neun Aminosäure-Positionen, die das Absorptionsspektrum ändern können, sind vier polymorph, und zwar die Positionen 65, 180, 230 und 233. Position 180 ist in L- und M-Genen polymorph, Position 65 nur im M-Gen und Positionen 230 und 233 nur im L-Gen (Winderickx et al. 1993).

Bedeutend ist der S180A-Polymorphismus, der das Absorptionsmaximum des Opsins um etwa 4 nm verschieben kann. In L-Genen liegt bei Kaukasiern das Verhältnis von Serin zu Alanin bei 56,3% zu 43,7%, in M-Genen bei 6% zu 94% (Winderickx et al. 1992, Winderickx et al. 1993, Neitz & Neitz 1998, Sharpe et al. 1998), wobei eine grosse Variabilität dieses Verhältnisses bei verschiedenen Bevölkerungsgruppen vorliegt.

1.2.4.3 Hybridgene

Hybridgene bzw. Chimere entstehen durch intragenische Rekombination während der Meiose (vgl. Abbildung 6, 1.2.6). Die grosse Wahrscheinlichkeit eines ungleichen Rekombinationsereignisses ist durch den hohen Grad an Homologie der L- und M-Gene und ihrer engen räumlichen Lage im Cluster bedingt (Nathans et al. 1986a, Drummond-Borg et al. 1989). Da die Introns ca. 10 Mal länger sind als die Exons und die Sequenzen der Introns in den M- und L-Opzingenen sich mehr ähneln als die Sequenzen der Exons, ereignet sich ein Crossing over viel eher innerhalb der Introns als innerhalb der Exons (Nathans et al. 1986a, Shyue et al. 1995). Die Hybridgene bestehen also aus einigen aufeinanderfolgenden Exons aus einem Ende des L-Gens, die mit den übrigen Exons aus dem anderen Ende des M-Gens verknüpft sind (oder umgekehrt). Man bezeichnet solche Hybridgene, die mit L-Gen-Sequenzen anfangen und

mit M-Gen-Sequenzen aufhören als 5´L-3´M Hybridgene (LM-Hybridgene) und solche, die mit M-Gen-Sequenzen anfangen und mit L-Gen-Sequenzen aufhören als 5´M-3´L Hybridgene (ML-Hybridgene).

1.2.4.4 Nomenklatur

Die Nomenklatur zur Beschreibung von Hybridgenen richtet sich nach der Herkunft der Exons. Exons 1 und 6 kann man weder dem L- noch dem M-Gen zuordnen, da sie bei beiden identisch sind. Im Exon 3 gibt es sechs Polymorphismen, sie kommen in beiden Genen vor. Daher kann man Exon 3 nicht eindeutig dem L- oder M-Gen zuordnen. Einen Einfluss auf das Absorptionsverhalten hat wahrscheinlich nur der S180A-Polymorphismus (Winderickx et al. 1993). Da der Austausch von Alanin gegen Serin eine Verschiebung des Absorptionsmaximums zum längerwelligen Bereich hin verursacht, bezieht man sich in der Nomenklatur auf diese Stelle. Liegt z.B. ein Hybridgen vor, dessen Exons 1 und 2 aus einem L-Gen, Exons 4 und 5 aus einem M-Gen stammen und Exon 3 an Position 180 Alanin kodiert, bezeichnet man es als L2M3(ala180), ein L-Gen, das Alanin an Position 180 kodiert, wird L(ala180) benannt, und ein M-Gen mit Kodierung von Serin an Position 180 M(ser180).

1.2.5 Aminosäuresubstitutionen, Absorptionsmaxima und optische Dichte

Es gibt mehrere *in vivo* und *in vitro* Techniken, mit denen die Absorptionsmaxima der verschiedenen Photopigmente bestimmt wurden. Demnach liegt bei den L-Zapfen-Photopigmenten das Absorptionsmaximum bei ca. 558 nm, bei den M-Zapfen-Photopigmenten bei ca. 530 nm und bei den S-Zapfen-Photopigmenten bei ca. 420 nm (Dartnall et al. 1983, Oprian et al. 1991, Neitz et al. 1991, Merbs & Nathans 1992, Asenjo et al. 1994, Sharpe et al. 1998). Die Photopigmente, die von Hybridgenen kodiert werden, haben verschiedene Absorptionsmaxima, die alle etwa im Wellenlängenbereich zwischen dem der L- und M-Zapfen-Photopigmente liegen. Tabelle 1 im Anhang zeigt die verschiedenen Hybridgene und die von verschiedenen Arbeitsgruppen ermittelten Absorptionsmaxima.

Hauptsächlich die Aminosäure-Positionen 277 und 285, die von Exon 5 kodiert werden, sind für die spektralen Eigenschaften des Opsins verantwortlich. Daher reicht die Kenntnis dieser Positionen aus, um eine grobe Einteilung in L- oder M-spezifische Opsingene vorzunehmen.

Die spektralen Verschiebungen, die von einzelnen Aminosäuren bewirkt werden, liefert die nachfolgende Tabelle 2 (nach Merbs & Nathans 1993). Dabei ist festzustellen, dass diejenigen Aminosäuren, die typischerweise von L-Genen kodiert werden, das Absorptionsmaximum des Zapfenpigments in den längerwelligen Bereich verschieben. Diejenigen Aminosäuren, die von M-Genen kodiert werden, verschieben es in den kürzerwelligen Bereich.

Aminosäuresubstitutionen bewirken jedoch nicht nur Veränderungen des Absorptionsmaximums. Sie könnten z. B. auch Einfluss auf die optische Dichte des Photopigments nehmen. Es gibt *in vitro* Studien, die darauf hinweisen, dass manche Hybridpigmente instabil sind oder eine geringere optische Dichte besitzen (Merbs & Nathans 1992, Asenjo et al. 1994). Einige *in vivo* Studien

(Miller 1972, Smith & Pokorny 1973, Knau & Sharpe 1998, Berendschot et al. 1996) zeigen, dass sich die L- und M-Zapfen-Pigmente in Deuteranopen und Protanopen in ihrer optischen Dichte unterscheiden.

Neuerdings wird darüber spekuliert, ob Aminosäure-Position 65, welche von Exon 2 kodiert wird, Einfluss auf die Stabilität des Pigmentes und damit auch auf seine optische Dichte hat (Neitz et al. 1999). Unterschiede in der optischen Dichte können ein unterschiedliches Absorptionsverhalten bewirken (vgl. 1.3.6).

Es ist eher unwahrscheinlich, dass andere Faktoren, wie die zusätzlichen Sequenzen in Intron 1 der L-Gene, die optische Dichte oder die Expressionsrate verändern.

	Aminosäure-Position	L-Gen	M-Gen	Spectral shift
Exon 2	65	Threonin	Isoleucin	1 nm
	111	Isoleucin	Valin	-
	116	Serin	Tyrosin	-
Exon 3	153	Leucin	Methionin	-
	180	Serin	Alanin	4 nm
Exon 4	230	Isoleucin	Threonin	1 nm
	233	Alanin	Serin	1 nm
	236	Methionin	Valin	-
Exon 5	274	Isoleucin	Valin	-
	275	Phenylalanin	Leucin	-
	277	Tyrosin	Phenylalanin	7 nm
	279	Valin	Phenylalanin	-
	285	Threonin	Alanin	14 nm
	298	Alanin	Prolin	-
	309	Tyrosin	Phenylalanin	1 nm

Tab. 2: Spektraler Shift im Absorptionsmaximum zwischen dem L- und M-Gen aufgrund von Aminosäuresubstitutionen. Dargestellt sind die 15 Aminosäure-Positionen, in denen sich die L- und M-Gene unterscheiden (nach Merbs & Nathans 1993)

1.2.6 Genexpression

Da auch bei Personen mit normaler Farbwahrnehmung Hybridgene mit einer Häufigkeit von ca. 4-8% (kaukasische Männer) zu finden sind (Drummond-Borg et al. 1989, Deeb et al. 1992), geht man davon aus, dass nicht alle Gene im Cluster in genügender Anzahl exprimiert werden. Wieviele und welche Gene des Clusters exprimiert werden, ist wichtig für das Verständnis der Beziehungen zwischen Genotyp und Phänotyp. Jedoch ist die Expression der Opsingene nach wie vor Gegenstand kontroverser wissenschaftlicher Diskussionen.

Eine Modellvorstellung beruhend auf Nathans et al. (1989) und Winderickx et al. (1992a) (vgl. Abbildung 6) trägt zum Verständnis dieser Frage bei. Hiernach stellt die Locus Control Region (LCR) ein wesentliches Kontrollelement bei der Expression der einzelnen Gene dar. Wie Fälle von Blauzapfen-Monochromasie belegen, können bei einer Deletion dieses evolutiv konservierten Sequenzabschnitts weder das Rot- noch das Grün-Opsingen exprimiert werden (Nathans et al. 1989). Die LCR liegt zwischen 3,1 und 3,7 kb stromauf vor dem Transkriptionsstart des ersten Opsingens (Nathans et al. 1989, Wang et al. 1992, Nathans et al. 1993). Sie interagiert mittels Protein-Protein Interaktionen mit Promotern der nachfolgenden L- und M-Gene über die Bildung einer Schleife (Knight et al. 1991, Mastrangelo et al. 1991). Nur wenn die LCR einen stabilen Komplex mit einem Promoter eingeht, wird dieses Gen in einem Zapfen exprimiert. Alle bekannten Daten deuten auf einen Transkriptionsgradienten hin, der abhängig vom Abstand des Promoters zur LCR ist. Die Gene, die näher an der LCR liegen, werden öfter exprimiert als die weiter distal gelegenen (Winderickx et al. 1992). Untersuchungen deuten darauf hin, dass im allgemeinen nur die beiden proximalsten Gene eines Clusters in signifikant hoher Menge exprimiert werden, wobei das erste Gen häufiger als das zweite exprimiert wird. Zusammenfassend würde dies

bedeuten, dass im wesentlichen die ersten beiden Gene des Clusters für das Farbsehen verantwortlich sind.

Werden bei fehlender LCR keine L- und M-Gene exprimiert, dann ist diejenige Person ein S-Zapfen-Monochromat (Blauzapfen-Monochromat).

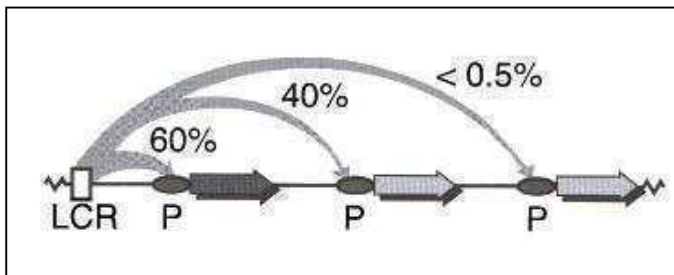


Abb. 6: Modellvorstellung der Interaktion zwischen LCR und Promotoren der nachfolgenden Gene unter Ausbildung eines Transkriptionsgradienten. (nach Sharpe et al. 1999b)

1.3 Farbsinnstörungen

1.3.1 Allgemeines

Selbst bei Individuen ohne Farbsinnstörungen variiert die Farbwahrnehmung. Dies liegt zum einen daran, dass unterschiedliche optische Dichten der Zapfen-Farbpigmente, der Linse und des Xanthophylls der Macula vorkommen und zum anderen daran, dass es Polymorphismen in den normalen L- und M-Genen gibt. Der wichtigste Polymorphismus ist der an Aminosäure-Position 180, der von Exon 3 kodiert wird und einen Austausch von Serin und Alanin beinhaltet. Je nachdem, ob die Substitution in einem L- oder M-Gen stattfindet, wird das Absorptionsmaximum um 3-7 nm verschoben (vgl. 1.2.5).

Die meisten Farbsinnstörungen sind vererbt und durch Veränderungen im Opsingen-Cluster verursacht (vgl. Abbildung 7). Intergenische nichthomologe Rekombination verursacht Genverluste, intragenische

Rekombinationsereignisse zwischen M- und L-Genen oder Punktmutationen führen zu Genveränderungen, und *nonsense* und *missence* Mutationen oder Deletionen bewirken einen Funktionsverlust des Gens.

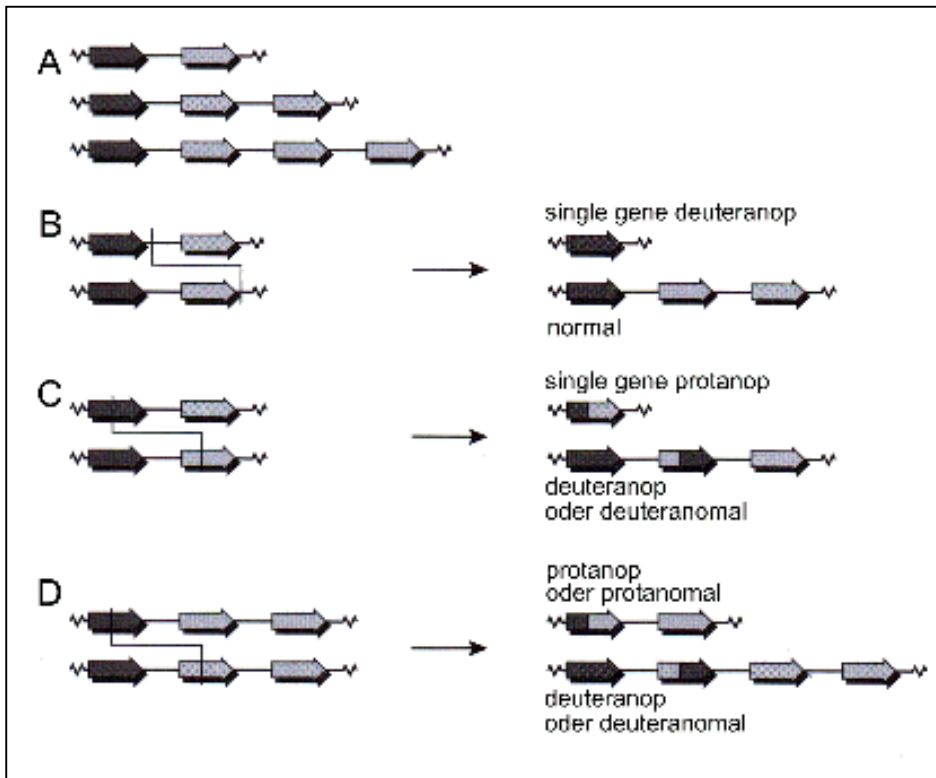


Abb. 7: Beispiele für verschiedene ungleiche Crossing over im Opsingen-Cluster.
A normale Opsingen-Cluster. **B** intergenisches Crossing over mit Verlust bzw. Gewinn von distalen Genen. **C** intragenisches Crossing over unter Bildung von Hybridgenen und Verlust bzw. Gewinn von distalen Genen. **D** Bildung von Hybridgenen durch intragenisches Crossing over unter Erhaltung eines distalen Gens. Die erwarteten Phänotypen sind jeweils angegeben (nach Sharpe et al. 1999b).

Vererbte Störungen betreffen nicht immer die Opsingene, sondern manchmal auch Gene, die für die Struktur oder Funktion der Zapfen zuständig sind.

Phänotypisch wird zwischen anomaler Trichromasie, Dichromasie und Monochromasie unterschieden. Bei der **anormalen Trichromasie** ist das Absorptionsmaximum eines der drei Farbpigmente so verändert, dass

trichromatische Farbwahrnehmung nur noch eingeschränkt möglich ist. Bei der **Dichromasie** fehlt eines der drei Farbpigmente, so dass Farbwahrnehmung nur in zwei Dimensionen möglich ist, und bei der **Monochromasie** fehlen zwei Zapfen-Pigmente, so dass Farbwahrnehmung nur noch in einer Dimension möglich ist. **Achromatopsie** oder **Stäbchen-Monochromasie** nennt man Störungen, bei denen keine Zapfenpigmente mehr vorhanden sind.

Bei heterozygoten Frauen könnte sogar tetrachromatisches Sehen möglich sein, da die X-Chromosom-Inaktivierung zufällig geschieht (Lyon 1961, 1972).

Farbsinnstörungen, bei denen nur eines der drei Zapfen-Pigmente betroffen ist, werden mit dem Präfix **Protan-** (L-Pigment), **Deutan-** (M-Pigment), und **Tritan-** (S-Pigment) benannt. Fehlt das Pigment gänzlich, wird das Suffix **-anopie** verwendet (Protanopie, Deutanopie, Tritanopie), ist nur die Funktion des Pigments verändert, wird das Suffix **-anomal** verwendet (Protanomalie, Deutanomalie, Tritanomalie).

Wenn zwei Pigmente fehlen, wird dies Zapfen-Monochromasie genannt. Es wird hier unterschieden zwischen Blau- oder S-Zapfen Monochromaten, die weder L- noch M-Pigmente haben, Grün- oder M-Zapfen-Monochromaten, denen das S- und L-Pigment fehlt, und Rot- bzw. L-Zapfen-Monochromaten, die weder S- noch M-Pigmente besitzen.

In dieser Arbeit wird nicht eingegangen auf die Zapfen-Monochromasie, die Stäbchen-Monochromasie und die Tritanopie. Diese Störungen kommen nur vereinzelt vor, wobei genauere Zahlen zur Inzidenz nicht vorhanden sind, und können mit dem Anomaloskop allein nicht erfasst werden.

Die einzige gesicherte Zapfen-Monochromasie ist die Blau-Zapfen-Monochromasie (ca. 1:100000 bei Männern). Sie wird X-chromosomal rezessiv vererbt. Hier sollen ausser den Stäbchen nur die S-Zapfen funktionsfähig sein (Zrenner & Gouras 1981, Hess et al. 1989a, 1989b). Nur bei Dämmerung

haben die Betroffenen eine eingeschränkte dichromatische Farbdiskriminierung. (Hess et al 1989a, Reitner et al 1991), unter photopischen Bedingungen wird Farbenblindheit angenommen.

Stäbchen-Monochromasie wird autosomal rezessiv vererbt. Hier sind keine funktionsfähigen Zapfen vorhanden. Betroffene sind daher nicht in der Lage, Farben zu diskriminieren (Übersicht hierzu bei Waardenburg 1963, Sharpe & Nordby 1990).

Bei der Tritanopie sind die S-Zapfen betroffen. Diese Störung wird autosomal dominant mit inkompletter Penetranz vererbt. Bei den meisten Betroffenen scheint dennoch eine, wenn auch reduzierte, S-Zapfen-Funktion vorhanden zu sein (Pokorny et al. 1981). Manchmal werden Tritanopien in Kombination mit Deutan-Defekten beobachtet (van de Merendonk & Went 1980, van Norren & Went 1981). Tritanomalien scheinen nicht zu existieren (Sharpe et al. 1999b).

1.3.2 Erworbene Farbsinnstörungen

Unter den selteneren erworbenen Farbsinnstörungen seien hier einige Beispiele erwähnt. Die zerebrale Achromatopsie, eine Form von totaler Farbenblindheit, ist bedingt durch Schädigung der Hirnrinde nach z.B. zerebralen Insulten oder zerebralen Traumen. Störungen der optischen Medien, insbesondere der Linse bei Cataract, können ebenso zu Farbenfehlsichtigkeiten führen wie Störungen der Retina (z.B. Makuladystrophien), des Sehnerven (z.B. Glaukom, Atrophie, Neuritis oder Kompression des Optikus) oder vaskuläre und hämatologische Erkrankungen. Auch können Intoxikationen (z.B. Blei, Alkohol, Tabak) oder Medikamenten-Nebenwirkungen (z.B. Digitalis, Malariamittel) zu Farbsinnstörungen führen.

1.3.3 Rot-Grün-Farbsinnstörungen

Diese Farbsinnstörungen kommen am häufigsten vor. Sie betreffen 7,4% der Männer europäischen Ursprungs (Zusammenfassung mehrere Studien in Sharpe et al. 1999b), wobei die Häufigkeiten sich zwischen den verschiedenen Bevölkerungsgruppen unterscheiden (Garth 1933, Cruz-Coke 1964, Inuma & Handa 1976, Fletcher & Voke 1985). Am häufigsten sind Europäer und Bramahnen in Indien betroffen. Am seltensten werden diese Farbsinnstörungen bei den Aborigines, in Brasilien, den südpazifischen Inseln und bei Ureinwohnern Nord-Amerikas gefunden. Eine mögliche Erklärung für diese Unterschiede besteht darin, dass bei nicht-Europäern weniger Opsingene im Cluster vorhanden sind, so dass intra- und intergenische Rekombination bei ihnen weniger wahrscheinlich erscheint. Da der Vererbungsmodus X-chromosomal rezessiv ist, sind Frauen viel seltener (0,5% europäischen Ursprungs) betroffen.

1.3.3.1 Ermittlung der Farbsinnstörung mit dem Anomaloskop

Phänotypisch werden Rot-Grün-Farbsinnstörungen am häufigsten über Farbabgleiche, Rayleigh matches (Rayleigh 1881), an einem Anomaloskop charakterisiert. Dieses besteht aus einem Okular, durch welches der Proband auf eine kreisförmige Prüfscheibe blickt, die aus zwei Halbkreisen zusammengesetzt ist. Der untere Halbkreis enthält monochromatisches gelbes Licht der Wellenlänge von ca. 589 nm, der obere Halbkreis besteht aus einer Mischung von monochromatischem roten Licht mit einer Wellenlänge von ca. 679 nm und monochromatischem grünen Licht mit der Wellenlänge von ca. 544 nm. Im unteren gelben Halbkreis kann die Helligkeit variiert werden. Den oberen Halbkreis muss der Proband durch Mischen von Rot und Grün

entsprechend dem gelben Halbkreis einstellen, d.h. er muss einen Abgleich beider Felder erzielen (*matching*), sowohl was die Farbe als auch was die Helligkeit betrifft. Der farbliche Testraum ist so ausgewählt, dass S-Zapfen und Stäbchen keinen Einfluss auf die Messung haben und somit beim Probanden nur die L- und M-Zapfen getestet werden.

Auf einer von Rayleigh definierten Skala kann das rot-grün-Mischungsverhältnis zwischen 0 und 73 gewählt werden. Reines Rot liegt bei 73, reines Grün bei 0. Die Intensität des gelben Lichtes erstreckt sich von 0 (dunkel) bis 35 (hell). Das rot-grün-Verhältnis und die Gelbintensität werden in einem Diagramm eingetragen (vgl. Abbildung 8), wobei der X-Wert dem Wert der rot-grün-Mischung und der Y-Wert der Gelbintensität entspricht.

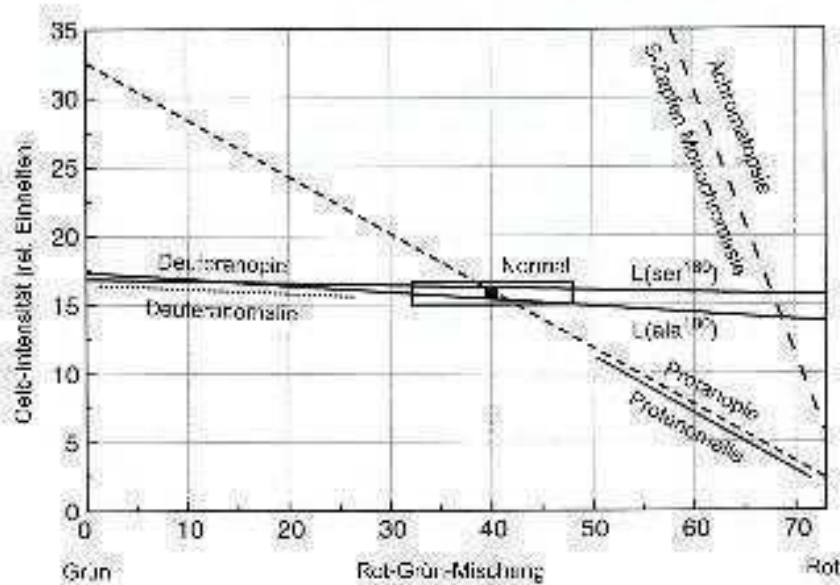


Abb. 8: Standardisiertes Diagramm zur Erfassung von Rayleigh matches. Die typischerweise eingestellten matching ranges und midpoints sind für Normalsichtige und Trägern von Farbsinnstörungen eingezeichnet. Das schwarze Kästchen zeigt den Mittelwert, das Rechteck die Streuung der matching ranges von Normalsichtigen an (nach Sharpe et al. 1999b).

Die meisten normalsichtigen Trichromaten wählen ein definiertes Rot-Grün-Verhältnis kombiniert mit einer bestimmten Gelbintensität. Ihr *midpoint* (s.u.) liegt an der Kreuzungsstelle der Helligkeitsfunktion der beiden Zapfentypen.

Variationen ergeben sich vor allem aus dem Serin-Alanin-Polymorphismus an Stelle 180 oder aus Unterschieden in der optischen Dichte der Pigmente.

Kann eine Versuchsperson in einem Bereich farblich nicht diskriminieren, weist er einen *matching range* einer bestimmten Breite auf. Der *midpoint* (Mittelpunkt des *matching ranges*), befindet sich dann meist ausserhalb des Normbereiches.

Anhand von *matching ranges* und *midpoints* kann eine phänotypische Einteilung der verschiedenen Farbsinnstörungen vorgenommen werden.

1.3.4 Protanopie und Deutanopie

In der europäischen männlichen Population kommen Protanope zu 1,01% und Deutanope zu 1,28% vor (Zusammenfassung mehrerer Studien in Sharpe et al. 1999b). Dagegen ist nur 1 von 4000 Frauen Dichromatin. Phänotypisch haben Dichromaten ein Farbspektrum, welches subjektiv nur aus blau und gelb besteht.

Auf dem Anomaloskop können Protanope und Deutanope jede Mischung von Rot und Grün mit dem gelben Licht abgleichen, da sie Informationen nur von einem der relevanten Rezeptortypen erhalten, dem L- oder dem M-Zapfen. Somit erstreckt sich ihr *matching range* über den gesamten Testbereich. Sie müssen lediglich die Helligkeit vom Gelb variieren. Aufgrund der typischen Steigungen der Regressionsgeraden (Helligkeitsfunktionen) der eingestellten Gelbintensitäten ist es möglich, zwischen protanopen und deutanopen Testpersonen zu unterscheiden, wobei die Helligkeitsfunktion der Deutanopen dem der Normalsichtigen ähnelt. Dies lässt sich dadurch erklären, dass bei Normalsichtigen die L-Zapfen in der Retina bei weitem überwiegen und somit für die Helligkeitsfunktion verantwortlich sind. Da

Deuteranope nur L-Zapfen besitzen, ist ihre Helligkeitsfunktion sehr ähnlich den Normalsichtigen.

Protanope verwenden dagegen niedrigere Gelbintensitäten, je mehr Rotanteil im Mischlicht vorhanden ist, da sie aufgrund ihres fehlenden L-Zapfens weniger Lichtquanten im längerwelligen Bereich absorbieren können und somit das Testbild dann dunkler wahrnehmen.

1.3.4.1 Molekulargenetik

Es gibt drei verschiedene Möglichkeiten der Entstehung von Dichromasie. Entweder sie entsteht durch Punktmutationen, durch Deletionen oder durch ungleiche (inequale) Rekombination.

Bis jetzt kennt man eine Haupt-Punktmutation (Winderickx et al. 1992b), die für bestimmte Arten von Farbsinnstörungen verantwortlich gemacht wird. Sie ist eine *missense*-Mutation; bei ihr wird an Aminosäure-Position 203, einer Stelle in der zweiten extrazellulären Schleife des Moleküls, die von Exon 4 kodiert wird, Cystein gegen Arginin ausgetauscht. Durch die Mutation wird eine Disulfidbindung des Cysteins mit einem anderen Cystein in der ersten extrazellulären Schleife an Position 126 zerstört. Da die zwei Aminosäuren in der Evolution hoch konserviert und wohl für die dreidimensionale Struktur des Moleküls verantwortlich sind, vermutet man, dass die Mutation zu einer Veränderung der dreidimensionalen Struktur des Moleküls führt, welches dadurch funktionslos wird. Die Mutation wurde in M-Genen eines Individuums mit extremer Deuteranomalie und eines Individuums mit leichter Deuteranomalie gefunden (Winderickx et al. 1992b), ausserdem in M-Genen von Individuen mit Deuteranopie (Bollinger et al. 2001) und kommt auch in den Zapfen-Pigmentgenen vieler Blauzapfen-Monochromaten vor (Nathans et al. 1989, 1993). Innerhalb der normalsichtigen Bevölkerung wird die Mutation mit

einer Frequenz von 0.5% (Nathans et al. 1993), 2% (Winderickx et al. 1992) und 2,5% (Jagla et al. 2002) gefunden. Sehr wahrscheinlich ist ihre Expression davon abhängig, an welcher Stelle das mutierte Gen im Cluster liegt.

Eine weitere Punktmutation, die die Promoterregion von M-Opsingenen betrifft, wurde gehäuft bei deutan-defekten japanischen Männern gefunden. Diese A71C-Mutation wurde auch bei normalsichtigen Asiaten festgestellt. Hier betraf sie jedoch nicht, wie bei den Deutan-Defekten, das an zweiter Stelle gelegene Opsin, sondern weiter distal gelegene M-Opsingene (Ueyama et al. 2003).

Dichromasie kann auch durch Deletionen in den kodierenden Abschnitten oder der Promoterregion entstehen. Ein Fall ist bekannt, bei dem eine 1,6 kb-Deletion, wahrscheinlich zwischen Exon 1 und 4 des L-Gens, zu einer Protanopie/-anomalie mit einer progressiven Makuladegeneration führte (Reichel et al. 1989).

Die meisten Fälle von Farbsinnstörungen werden durch ungleiche Rekombination während der Meiose verursacht. Durch ihre enge räumliche Positionierung im Cluster und ihre grosse Homologie sind die L- und M-Gene besonders dafür prädestiniert. Es kommt entweder zu intergenischer oder intragenischer Rekombination (vgl. Abbildung 7).

Durch ungleiche *intergenische* Rekombination kann es zu einem Cluster mit einem singulären L-Gen kommen. Die Vererbung solch eines X-Chromosoms von der Mutter führt bei Männern zu *Single-Gen-Deuteranopie* (Nathans et al. 1986a, Nathans et al. 1986b, Vollrath et al. 1988, Drummond-Borg et al. 1989). Weniger als die Hälfte der Deuteranopen haben diesen Genotyp (Sharpe et al. 1998).

Ungleiche *intragenische* Rekombination verursacht Hybridgene. Es können mehrere Genotypen daraus resultieren. Das Cluster kann zu einem *Single-Gen-Cluster* reduziert werden, mit einem LM-Hybridgen anstelle eines singulären Rot-Opsingens. Dies führt gewöhnlich zu einer Protanopie, der

Genotyp kommt bei weniger als der Hälfte der Protanopen vor (Sharpe et al. 1998). Je nach Art des Hybridgens ist in mehr als der Hälfte dieser Fälle das resultierende Pigment in den kürzerwelligen Bereich verschoben, bei den übrigen Fällen resultiert ein Pigment, welches das Absorptionsmaximum eines normalen M-Pigments besitzt (Sharpe et al. 1998).

Intragenische Rekombination kann ausserdem zu einem Cluster mit einem LM-Hybridgen an erster Stelle und mehreren M-Genen führen (Deeb et al. 1992, Sharpe et al. 1998). Dies resultiert in einer Protanopie oder Protanomalie, je nachdem, wie sehr das Absorptionsmaximum des LM-Pigmentes sich von dem des M-Pigmentes unterscheidet. Dieser Genotyp ist bei mehr als der Hälfte der Protanopen zu finden (Sharpe et al. 1998). Gewöhnlich entsteht eine Protanopie nur dann, wenn das Crossing over sich vor Exon 3 ereignet hat, ansonsten ist damit eher eine Protanomalie assoziiert.

Schliesslich kann durch intragenische Rekombination ein M-Gen durch ein ML-Hybridgen ersetzt werden (Deeb et al. 1992, Sharpe et al. 1998). Dies führt zu einer Deuteranomalie oder Deuteranopie, je nachdem, wie gross die Differenz zwischen dem Absorptionsmaximum des ML-Photopigments und demjenigen des L-Photopigments ist. Mehr als die Hälfte der Deuteranopen weisen diesen Genotyp auf (Sharpe et al. 1998). Deuteranopie entsteht meistens nur dann, wenn das Crossing over sich vor Exon 2 ereignet hat, andernfalls sind solche ML-Hybridgene eher mit einer Deuteranomalie assoziiert.

Es sind interessanterweise Fälle bekannt, deren Opsingen-Cluster keine Auffälligkeiten in ihren Exonsequenzen aufwiesen, obwohl sie deuteranop waren (Jagla et al. 2002).

1.3.5 Protanomalie und Deuteranomalie

Diese Formen der Farbsinnstörungen kommen häufiger vor, 4,61% der Kaukasier sind deuteranomal, 1,07% protanomal (Zusammenfassung mehrerer Studien in Sharpe et al 1999b). Die Phänotypen variieren erheblich, weshalb man sie in extreme und einfache Anomale unterteilt. Hierbei können extreme Anomale beinahe genauso schlecht Farben diskriminieren wie Dichromaten, und manche einfache Anomale besitzen ein fast normales Farbsehvermögen.

Am Anomaloskop können anomale Trichromaten in Teilen des Testbereiches farblich nicht zwischen den beiden Halbfeldern diskriminieren. Sie haben einen *matching range* einer bestimmten Breite. Extrem anomale Trichromaten haben gewöhnlich einen breiten *matching range*, fast so wie der von Dichromaten, während einfach anomale Trichromaten meist einen schmalen *matching range* aufweisen. Per Definitionem haben extrem Anomale *matching ranges*, die sowohl den *matching range* von Normalsichtigen als auch den von Prot- oder Deuteranomalen einschliesst (Pokorny et al. 1979).

Die Einteilung in Prot- und Deuteranomalie erfolgt anhand der Helligkeitsfunktionen der *matching ranges*. Hierbei findet sich eine Steigung der Regressionsgeraden analog den Prot- bzw. Deuteranopen. Weiterhin ist der *matching ranges* bei einfach Protanomalen in den längerwelligen Bereich verschoben, während dieser bei einfach Deuteranomalen in den kürzerwelligen Bereich verschoben ist, so dass auch anhand dieser Tatsache eine Einteilung erfolgen kann.

1.3.5.1 Molekulargenetik

Deuteranomalie und Protanomalie entstehen typischerweise durch ungleiche intragenische Rekombination, wobei entweder ein L-Gen durch ein LM-Hybridgen oder ein M-Gen durch ein ML-Hybridgen ersetzt wird. Hierbei kommt es auf die Position des ersetzten Gens im Opsingen-Cluster an, die bestimmt, ob dieses Gen exprimiert wird oder nicht. Es gibt viele Hinweise darauf, dass ein ML-Hybridgen nur dann exprimiert wird, wenn es an zweiter Stelle liegt. Dies würde auch das Vorkommen von ML-Hybridgenen bei Normalsichtigen erklären.

Wird in einem Cluster ein L-Gen durch ein LM-Gen ersetzt, so entsteht daraus eine Protanomalie oder eine Protanopie. Wenn ein M-Gen an zweiter Stelle durch ein ML-Gen ersetzt wird, entsteht analog entweder eine Deuteranomalie oder Deuteranopie.

Wie stark ein anomaler Trichromat betroffen ist, hängt u.a. mit den Eigenschaften seines Hybridpigmentes zusammen. LM-Hybridgene kodieren für M-ähnliche Pigmente, ML-Hybridgene für L-ähnliche Pigmente. Innerhalb dieser Pigmente gibt es viele Variationen mit verschiedenen Absorptionsmaxima. Je grösser die Differenz zwischen dem Absorptionsmaximum des exprimierten Hybrid- und demjenigen des exprimierten normalen Pigmentes eines anomalen Trichromaten, desto weniger schwer ist sehr wahrscheinlich die Farbsinnstörung. Es spielen aber auch andere Faktoren eine Rolle, etwa die optische Dichte des Hybridpigmentes.

1.3.6 Einfluss der optischen Dichte auf die Phänotypisierung

Die optische Dichte der Pigmente kann in der Retina von Zapfen zu Zapfen variieren. Durch diese Tatsache können die Zapfen trotz identischer Absorptionsmaxima ihrer Pigmente unterschiedliche Informationen an die postrezeptoralen Nervenzellen weiterleiten, da sie vom selben Reiz unterschiedlich stark erregt werden. Durch sehr geringe optische Dichte in L- und M-Zapfen können aufgrund viel geringerer Absorption von Lichtquanten Signale der Neurone stark abgeschwächt werden. Höhere optische Dichte vergrößert die Absorption von Lichtquanten. Dadurch führen Änderungen in der optischen Dichte der Photopigmente zu einer Veränderung der typischen Form der relativen Empfindlichkeitskurven der Rezeptoren. Hohe optische Dichte der Opsinmoleküle eines Zapfens führt zu einer Verbreiterung, geringe zu einer Verschmälerung dieser Kurve. Bei längeren Wellenlängen kann diese Tatsache zu einer besseren Farbdiskriminierung beitragen, was durch folgende Beispiele verdeutlicht wird: eine niedrigere optische Dichte des M-Pigments z.B. verschmälert die Kurve so, dass die spektrale Entfernung zwischen dem M- und L-Pigment im längeren Wellenlängenbereich vergrößert wird. Höhere optische Dichte des M-Pigments dagegen verbreitert die Kurve, so dass die Entfernung zum L-Pigment bei längeren Wellenlängen kleiner wird. Umgekehrt führt (bei längeren Wellenlängen) eine Verringerung der optischen Dichte des L-Pigments zu einer geringeren spektralen Entfernung zum M-Pigment, und eine höhere optische Dichte führt zu einer Vergrößerung in der spektralen Entfernung (He & Shevell 1995).

1.4 Ziel dieser Arbeit

Rot-Grün-Farbsinnstörungen belaufen sich auf immerhin 7,4% der männlichen europäischen Bevölkerung. Der genaue Einfluss genetischer Komponenten auf die verschiedenen Ausprägungsgrade dieser Störung ist noch unklar. Daher kann die Klärung der genauen Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp dieses Merkmals zur Bestimmung der Genexpression im betroffenen Gen-Cluster und zur präzisen genetischen Diagnose dieser Farbsinnstörungen beitragen.

In vielen Fällen sind Hybridgene für Rot-Grün-Farbsinnstörungen verantwortlich: sie kodieren für Opsine der Zapfen-Pigmente, deren Absorptionsmaxima zwischen denen der normalen L- und M-Pigmente liegen. Es wird vermutet, dass die Schwere der Farbsinnstörung vom Abstand der Absorptionsmaxima der exprimierten Pigmente abhängt. Mit geringerem Abstand zwischen den Absorptionsmaxima verringert sich auch der Unterschied zwischen den entsprechenden Zapfensignalen und somit dem Eingangssignal zum Rot-Grün Gegenfarbenprozess; die Schwere der Farbsinnstörung nimmt zu.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, wie sich der - dem Genotyp entsprechende - Abstand der Zapfenabsorptionsspektren der jeweiligen Probanden auf deren Lichtwellenlängen-Unterscheidungsvermögen auswirkt. Weiterhin sollte ermittelt werden, welche Hybridgene in Kombination mit normalen Genen Dichromasie (Rot/Grün-Blindheit) und welche Trichromasie (Rot/Grün-Schwäche) verursachen. Anhand der Genotypisierung sollte untersucht werden, ob bei den einzelnen Probanden ausser Hybridgenen noch andere Ursachen von Farbsinnstörungen in Frage kommen, z.B. die bekannte Punktmutation C203R.

Die **phänotypische** Zuordnung der Probanden erfolgte mittels subjektivem Abgleich durch Bestimmung von *Rayleigh matches* und *midpoints* am Oculus

HMC Anomaloskop. Diese Phänotypisierung erfolgte durch eine auswärtige Arbeitsgruppe, um eine Verblindung zu erreichen.

Die **genetische Analyse** in unserem Labor sollte nach folgenden Kriterien erfolgen:

- Die Struktur der Opsingene sollte in Bezug auf die entscheidenden Aminosäuren, die für spektrale Verschiebungen verantwortlich gemacht werden, mittels Sequenzanalysen, Restriktionsverdau und mittels LR-PCR bestimmt werden.
- Die Position eines Hybridgens innerhalb eines Opsingen-Clusters gilt nach heutigem Stand der Wissenschaft als entscheidend für die Expression dieses Gens. Daher sollte die genaue Position des Hybridgens im Cluster bestimmt werden. Hierzu sollte zunächst die Gesamtgenanzahl im Cluster bestimmt werden - die interindividuell variiert - und dann bei Clustern von bis zu drei Genen deren Reihenfolge bestimmt werden. Bei grösseren Clustern war dies methodisch nicht möglich. Die Anzahl der Opsingene im Cluster sollte mittels SSCP bestimmt werden. Die Reihenfolge in Clustern mit bis zu drei Genen sollte mittels Bestimmung des letzten Gens durch LR-PCR ermittelt werden.
- In einigen Fällen sind nicht Hybridgene für eine Farbenfehlsichtigkeit verantwortlich, sondern andere genetische Faktoren. Eine bekannte Ursache ist die Punktmutation C203R. Mittels Restriktionsverdau sollten alle Proben auf diese Punktmutation hin untersucht werden.
- Sollte anhand dieser Genanalysen keine Erklärung für eine vorliegende Farbsinnstörung gefunden werden, sollten Sequenzanalysen auch anderer Bereiche des Opsingen-Clusters erfolgen.

Für die **Korrelation** von Genotyp und Phänotyp sollte der Abstand der Absorptionsspektren der mutmasslich exprimierten Pigmente anhand von in vivo und in vitro ermittelten Daten abgeschätzt und dadurch die Schwere der Farbsinnstörung vorausgesagt werden. Dieser Abstand sollte dann mit den am

Anomaloskop ermittelten subjektiven Abgleiche (*matching ranges*), die erst nach abgeschlossener Genotypisierung zur Verfügung gestellt wurden, korreliert werden.

Zusammenfassend sollte durch diese Vorgehensweise der Einfluss spezifischer genetischer Komponenten auf Rot/Grün-Farbsinnstörungen charakterisiert werden und so ein besseres Verständnis der Korrelation von Genotyp und Phänotyp bei diesem häufigen Merkmal erzielt werden.

2 MATERIAL

2.1 Geräte

Applied Biosystems Inc., Foster City, Ca, USA

ABI PRISM® 3100 Genetic Analyser

Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA

Agarose-Gelelektrophoresekammern

Bachhofer, Reutlingen, D

UV-Transilluminator, 254 nm

Fuji Photo Film, Kanagawa, Jp

Phosphoimager, BAS-1500

BAS Reader 2.9

Imaging Plates BAS MP 2040S

Heraeus Holding GmbH, Hanau, D

Biofuge pico

Herolab, Wiesloch, D

Geldokumentation mit Enhanced Analysis System (E.A.S.Y.)

Perkin Elmer, Weiterstadt, D

Gene Amp PCR System 9600

Gene Amp PCR System 2400

Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt, D

IP-Eraser

Accuracy Enhancement TINA 2.09d (zur Datenverarbeitung)

Renner GmbH, Dannstadt, D

Microcomputer Electrophoresis Power Supply

PA-Gelelektrophorese

Scientific Industries, NY, USA

Vortex-Genie® 2

2.2 Chemikalien

Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK

γ -³²P-ATP

Applied Biosystems Inc., Foster City, Ca, USA

ABIPRISM™ BigDye™ Terminator V3.0 Cycle-Sequencing Ready Reaction Kit

Biorad Laboratories, Richmond, Ca, USA

Ammonium Persulfat

Bromphenolblau

Xylencyanol

Biozym, Oldendorf, D

Agarose

Low-Melt-Agarose

Boehringer Mannheim, D

BSA (bovine-serum-albumine)

PCR-Buffer 2

PCR-Buffer 3

Fluka Feinchemikalien, Buchs, CH

SDS (Natriundodecylsulfat)

TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin)

GIBCO BRL, Life Technology Inc., Gaithersburg, USA

Glycerol

CONCERT Rapid PCR Purification System

LKB Produkte, Bromma, Schweden

Dimethyl-dichlorsilane

Merck, Gibbstown, USA

Ethanol

Isopropanol

Natriumchlorid

Pharmacia, Piscataway, USA

Ficoll 400

Serva Feinbiochemica, Heidelberg, D

EDTA (Ethylendiamintetranatriumacetat)

Ethidiumbromid

Acrylamid

N-N-Methylen-Bisacrylamid

Sigma Chemie, St. Louis, USA

Mineralöl

TaKaRa Shouzo Co., LTD., Seta, Japan

LA TaqTM 5U/ μ l (LR-PCR-Kit)

USB Amersham, Cleveland, USA

dATP

dCTP

dGTP

dTTP

2.3 Enzyme

Appligene, Jukirch, F

Proteinase K

Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Benzdorf, D

Taq DNA-Polymerase 5 U/ μ l

Fermentas MBI, Vilnius, LT

T4-Polynukleotidkinase 10 U/ μ l

10x PNK-Puffer

New England Biolabs, Beverly, USA

RsaI

BstUI

Fnu4HI

NeB1-10x-Restriktionsenzym-Puffer

NeB2-10x-Restriktionsenzym-Puffer

NeB4-10x-Restriktionsenzym-Puffer

2.4 Oligonukleotide

MWG Biotech, Ebersberg, D

Promoter

CB-80 5'-CCA GCA AAT CCC TCT GAG CCG-3'

CB-81 5'-GGC TAT GGA AAG CCC TGT CCC-3'

Exon 2

CB-24A 5'-CAC ATC GCT CCC AGA TGG GT-3'

CB-24B 5'-ACA CAG GGA GAC GGT GTA GC-3'

Exon 3

CB-2A 5'-ATC ACA GGT CTC TGG TCT CTG-3'

CB-2Z 5'-CTG CTC CAA CCA AAG ATG GGC-3'

Exon 4

CB-30 5'-TAC TGG CCC CAC GGC CTG AAG-3'

CB-2B 5'-CGC TCG GAT GGC CAG CCA CAC-3'

Exon 5

CB-3C 5'-GTG GCA AAG CAG CAG AAA GAG-3'

CB-78 5'-TTG GCA GCA GCA AAG CAT GCG-3'

15 kb-LR-PCR

LCR1F 5'-CAC CCT TCT GCA AGA GTG TGG G-3'

CB-79R 5'-CCA GCA GAC GCA GTA CGC AAA GAT C-3'

CB-79G 5'-CCA GCA GAA GCA GAA TGC CAG GAC-3'

27,4 kb-LR-PCR

CB171GF 5'-GAG TAC AGG TAT TTG CCA CTA AGC-3'

CB-79G/ CB-79R s.o.

2.5 DNA-Längenstandards

Fermentas MBI, Vilnius, LT

Gene Ruler™ 1 kb DNA ladder

λ-Hind-Eco

2.6 Verbrauchsmaterialien

American National Can, Greenwich, USA

Parafilm

Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, USA

Sephadex G-25 MikroSpin Columns

Whatman, Maidstone, UK

3MM Papier

2.7 Puffer und Lösungen

AT3 (10x PCR-Puffer)

Tris pH 8,9 100 mM

KCl 500 mM

MgCl₂ 15 mM

dNTP-Mix für PCR

dATP	5 mM
dCTP	5 mM
dGTP	5 mM
dTTP	5 mM
Tris-HCl, pH 7,5	5 mM

BOM 18 (10x PCR-Puffer)

Tris, pH 8,9	100 mM
KCl	500 mM
MgCl ₂	30 mM

10x Ladepuffer für Agarosegele

Ficoll 400	20%
EDTA, pH 8,0	100 mM
Bromphenolblau	0,2%
Xylencyanol	0,2%

Loading-solution für SSCP

Formamid	95%
Bromphenolblau	0,05%
Xylencyanol	0,05%
EDTA, pH 7,5	20 mM

10x TBE-Puffer

Tris-Base	890 mM
Borsäure	890 mM
EDTA, pH 8,0	20 mM

SSCP-Stocklösung

Acrylamid 49 g
Bisacrylamid 1 g
aqua dest. auf 125 ml auffüllen

SSCP-Mastermix 6%

Glycerol 50 ml
10xTBE 50 ml
Acrylamidstocklösung 75 ml
aqua dest. 325 ml

SDS 0,1%/ EDTA 10 mM

2.8 Lösungen zur DNA-Isolierung

Lysepuffer A

NH₄Cl 155 mM
KHCO₃ 10 mM
EDTA, pH 8,0 0,1 mM

SE-Puffer (Salz-Extraktionspuffer)

NaCl 5 mM
EDTA, pH 8,0 25 mM

20% SDS

20 g SDS auf 100 ml aqua dest.

1% Proteinase K

1g Proteinase K auf 100 ml aqua dest.

NaCl-Lösung

5M NaCl

TE-Puffer

Tris-HCl, pH 7,5 10 mM

EDTA 1 mM

3 METHODEN

3.1 Probanden

Für diese Arbeit wurden 50 ungarische Männer im Alter zwischen 18 und 57, deren Farbsinnstörung bei Routineuntersuchungen festgestellt wurde, rekrutiert. Ihr Phänotyp wurde von einer Arbeitsgruppe in Ungarn mittels eines Oculus HMC Anomaloskops ermittelt. Es wurde venöses Blut abgenommen und zur DNA-Analyse nach Tübingen geschickt. Die DNA-Analysen wurden ohne Kenntnis des Phänotyps durchgeführt.

3.2 DNA-Isolierung aus Vollblut

Diese Methode zur Isolierung von genomischer DNA beruht auf einer Salzextraktion nach Miller et al. (1988). Die DNA wurde von Leukozyten aus EDTA-Blut gewonnen. Zunächst wurden 10 ml EDTA-Blut mit 40 ml Lysepuffer versetzt, welches zur selektiven Lyse der Erythrozyten dient. Der Ansatz wurde 20 min auf Eis gestellt und geschüttelt. Danach wurde 10 min bei 3000 U/min und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet aufgelockert und nochmals 50 ml Lysepuffer zum Pellet gegeben. Dieser Ansatz wurde erneut 15 min auf Eis gestellt, geschüttelt und zentrifugiert. Die im Pellet verbliebenen Leukozyten wurden nun lysiert. Dazu pipettierte man zum Pellet 5 ml SE-Puffer, 250 µl 20% SDS zur Zelllyse und 130 µl 1% Proteinase K zur Degradation von Proteinen und Membranbestandteilen. Nach einer eintägigen Inkubationszeit bei 37°C wurde zum Lysat 1 ml SE-Puffer und 1,75 ml 5 M NaCl hinzugegeben, kräftig geschüttelt und 10 min bei 4500 U/min und 4°C zentrifugiert. Der

entstandene Überstand wurde unter den gleichen Bedingungen nochmals zentrifugiert. Dadurch wurde die DNA vom SDS/Na-Pellet inklusive Peptiden getrennt. Der Überstand aus diesem zweiten Zentrifugationsschritt wurde mit demselben Volumen Isopropanol versetzt und die entstandenen Phasen vorsichtig vermischt, bis die DNA weisslich an der Oberfläche schwamm. Diese DNA wurde nun zum Waschen in 1 ml 80% Ethanol gegeben und 5 min bei 14000 U/min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Absaugen des Ethanols wurde die Pelletgrösse bestimmt, die DNA bei 37°C ca. 1 min getrocknet und je nach Pelletgrösse in entsprechender Menge TE-Puffer (200-1500 µl) gelöst und anschliessend im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Aus der gelösten DNA wurden schliesslich 1:10 Verdünnungen mit ¼ TE hergestellt und diese DNA dann für die Versuche verwendet.

3.3 PCR

Diese Methode dient dazu, einen spezifischen Abschnitt einer DNA (Template) zu amplifizieren. Voraussetzung ist, dass die Sequenzen an beiden Enden des gewünschten Abschnittes bekannt sind. Es werden für die PCR zwei synthetische Oligonukleotide eingesetzt, die homolog zu den flankierenden Sequenzen sind, Forward- bzw. Reverse-Primer genannt (Mullis et al. 1986). Der Abschnitt zwischen diesen wird enzymatisch mittels einer Taq-Polymerase, einer thermostabilen DNA-Polymerase, vervielfältigt (Saiki et al. 1988). Dieses Enzym wird, im Gegensatz zu anderen DNA-Polymerasen, bei den für die PCR-Reaktion benötigten hohen Temperaturen nicht inaktiviert. Eine typische PCR besteht aus einem Denaturierungsschritt, einem Annealingschritt und einem Elongationsschritt. Denaturiert wird bei 94°C, dabei wird die DNA in ihre Einzelstränge zerlegt. Nach einer Temperaturerniedrigung auf 55°C, bei der die Primer an die Einzelstränge hybridisieren können (Annealing), wird die Temperatur auf 72°C, dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase, erhöht.

Diese bindet an die 3'-Enden der Primer und verlängert sie durch Einbau von Desoxyribonukleotide, die komplementär zum Template-Strang sind (Elongation). Durch diesen ersten Schritt wird die ursprüngliche DNA verdoppelt. Wiederholt man diesen Zyklus, hat man anschliessend die vierfache Menge usw. Mit 25-35 Zyklen erreicht man typischerweise eine Vervielfältigung des DNA Fragments um den Faktor 10^6 .

Mittels der PCR wurden die Exons der LR-PCR-Produkte genauer charakterisiert. Ebenso wurde die PCR für die SSCP benötigt.

3.3.1 LR-PCR zur Analyse der Gene und deren Reihenfolge im Cluster

Für die LR-PCR wurden Enzym, dNTPs und Puffer von TaKaRa Shouzo Co., LTD., Seta, Japan, verwendet.

Das Ziel bei den LR-PCRs war es, grössere Genabschnitte als Produkt zu amplifizieren und dadurch definierte Templates für die nachfolgenden PCRs verwenden zu können. Die Primer nahmen bei diesem Versuch eine Diskriminierungsfunktion ein. So konnte zwischen dem ersten Gen (mit Primern, die in der LCR hybridisierten), distalen M-Genen (mit Primern, die spezifisch in Grün-Promotern hybridisierten) und dem letzten Gen im Cluster (mit einem Primer, der im TEX28 Gen hybridisierte) unterschieden werden. Ausserdem konnte mit dem jeweilig anderen Primerpaar die Aminosäure-Position 277, die von Exon 5 kodiert wird, bestimmt werden und so das Gen als L-, M-, LM-, oder ML-Gen eingeordnet werden. Zusätzlich konnten die so definierten Gene dann einzeln untersucht werden (zum Aufbau des Opsingen-Cluster vgl. Abbildung 5).

Die Reihenfolge der Gene in Clustern mit bis zu drei Genen konnte ebenso nach diesem Prinzip bestimmt werden.

Alle LR-PCR-Produkte wurden auf einem 1%igen Agarosegel aufgetragen. Als Längenstandard diente der Marker λ -Hind-Eco. Je nach Bandenstärke wurden die LR-PCR-Produkte 1:100, 1:500 oder 1:1000 mit H₂O verdünnt und als Template für die PCRs verwendet, deren Produkte wiederum zum Sequenzieren oder für Verdaus weiterverwendet wurden. Die Primer wurden für die PCR 1:10 mit H₂O (UV) verdünnt.

3.3.1.1 LR-PCR zur Analyse des ersten Gens

Es wurde ein Forward-Primer (LCR1F) verwendet, der in der Locus Control Region (LCR) hybridisierte. Diese liegt nur vor dem ersten Gen, so dass auf die Weise sichergestellt wurde, dass die distalen Gene nicht mitamplifiziert wurden. Für Exon 5 wurden zwei verschiedene Reverse-Primer gewählt, einer spezifisch zum Exon 5 des Rot-Opsingens (CB-79R), der andere zum Exon 5 des Grün-Opsingens (CB-79G). Beide binden im Bereich des Codons für die Aminosäure an Position 277, in dem sich L- und M-Gene unterscheiden. Die anderen relevanten Stellen (285 und 309) werden hierbei zwar ausser Acht gelassen, aber es wird davon ausgegangen, dass die Wahrscheinlichkeit einer Rekombination in diesem Bereich aufgrund der räumlichen Nähe sehr unwahrscheinlich ist, so dass die Codons entweder alle einheitlich L- oder M-Gen-spezifisch sind (Nathans et al. 1986, Shyue et al. 1995).

Es wurden für die Primerpaare jeweils getrennte Ansätze verwendet. Je nachdem, bei welcher der beiden PCR-Reaktionen anschliessend ein Produkt amplifiziert wurde, konnte man zwischen einem LM-Hybrid- oder L-Gen an erster Stelle unterscheiden. Im jeweils anderen Ansatz durfte kein Produkt entstehen.

PCR-Ansatz:

Puffer: TAKARA-Bfr.	2,5 µl
dNTPs	4 µl
Primer: LCR1F	0,5 µl
Primer: CB-79R oder CB-79G	0,5 µl
LA-Taq	0,25 µl
H ₂ O	15,25 µl
DNA	1 µl

Cycler-Programm:

94 °C	98 °C	70 °C	98 °C	70 °C	72 °C	4 °C
1'	10''	15'	10''	15'+15''	10'	>>
		14x		16x		

Long-Range-PCR (LCR bis Exon 5)

3.3.1.2 LR-PCR zur Charakterisierung der distalen Gene

Um die distalen Gene zu bestimmen, wurde aus genomischer DNA eine LR-PCR durchgeführt, bei der man sich zunutze macht, dass es Sequenzunterschiede zwischen dem Promoter des ersten Gens und den nachfolgenden Genen gibt. Daher wurde ein Forward-Primer verwendet, der spezifisch für die distale Promotersequenz war. Die Reverse-Primer für Exon 5 blieben dieselben.

PCR-Ansatz:

TAKARA-Bfr.	2,5 µl
dNTPs	4 µl
Primer: CB171GF	0,5 µl
Primer: CB-79R oder CB-79G	0,5 µl
LA-Taq	0,25 µl
H ₂ O (UV)	16,25 µl
DNA	1 µl

Cycler-Programm:

94 °C	98 °C	68 °C	98 °C	68 °C	72 °C	4 °C
1'	10''	12'	10''	12'+12''	10'	>>
	14x		16x			

Long-Range-PCR (Grün-Promoter bis Exon 5)

3.3.1.3 LR-PCR zur Bestimmung des letzten Gens

Um das letzte Gen zu amplifizieren, wurde ein Forward-Primer (CB-3C) verwendet, der an einer Sequenz in Exon 5 hybridisierte. Der Reverse-Primer (CB-157) war komplementär zu einer Region im Exon 1 des TEX28-Gens distal zum letzten Gen im Cluster gelegen. So wurden nur Produkte amplifiziert, die das Exon 5 des distalsten Gens enthielten.

Die Produkte der LR-PCR wurden verdünnt, Exon 5 nach nachstehendem Protokoll daraus amplifiziert und mit RsaI verdaut. Durch die Restriktion der Sequenz für das Codon 277 wurde Exon 5 genügend charakterisiert, da allgemein angenommen wird, dass die Aminosäuren an den Positionen 277, 285 und 309 des Proteins konform entweder L- oder M-Gen-spezifisch sind (vgl. 3.3.1.1). Dadurch war die Unterscheidung zwischen einem L- bzw. M-Gen-spezifischen Exon 5 möglich, und damit die Unterscheidung zwischen einem M- bzw. ML-Hybridgen an letzter Stelle.

PCR-Ansatz:

Puffer: TAKARA-Bfr.	2,5 µl
dNTPs	4 µl
Primer: CB-3C	0,5 µl
Primer: CB-157	0,5 µl
LA-Taq	0,25 µl
H ₂ O	15,25 µl
DNA	2 µl

Cycler-Programm:

94 °C	98 °C	62 °C	98 °C	68 °C	72 °C	4 °C
1'	10''	20'	10''	20'+15''	10'	>>
14x			16x			

Long-Range-PCR (Exon 5 bis TEX28-Gen)

3.3.2 PCRs aus LR-PCR-Produkten für Sequenzierungen und für Verdaus

Alle ersten Gene wurden sequenziert, ebenso alle distalen Hybridgene. Die distalen Grüngene derjenigen Probanden, die ein Hybridgen an erster Stelle aufwiesen, wurden ebenfalls sequenziert. Somit wurden alle möglichen Opsingen-Paar-Kombinationen berücksichtigt, die eine Farbsinnstörung verursachen könnten. Lediglich die distalen M-Gene derjenigen Probanden, deren Opsingen-Cluster aus einem L- und einem ML-Hybridgen zusammengesetzt waren, wurden nicht berücksichtigt (vgl. auch 1.2.6, 1.3.4.1, 1.3.5.1 und Abbildung 7). Es wurden jeweils Exon 2 und 4 sequenziert; als Sequenz wurden die entsprechenden Produkte der LR-PCRs verwendet.

Für die Analyse des S180A-Polymorphismus, der von Exon 3 kodiert wird, wurde ein entsprechendes Fragment aus Exon 3 amplifiziert und per Restriktionsverdau mit Fnu4HI die Identität des Codons 180 bestimmt. Als Template wurden, um nachher zwischen Exon 3 aus einem M-Gen, einem L-

Gen oder einem Hybridgen zu unterscheiden, im Sinne einer nested PCR die entsprechenden Sequenzen aus der LR-PCR reamplifiziert.

Durch Restriktionsverdau der Sequenz für die Aminosäure an Position 277 mit RsaI konnten die Produkte der LR-PCR des letzten Gens als M- oder ML-Gen eingeordnet werden. Dazu wurde ein Fragment aus Exon 5 aus den entsprechenden LR-PCR-Produkten reamplifiziert und anschliessend verdaut.

Alle Primer wurden für die nachfolgenden PCRs 1:10 mit H₂O (UV) verdünnt.

Im folgenden eine Auflistung der Versuchsprotokolle der PCRs:

3.3.2.1 Exon 2 (273 bp)

PCR-Ansatz :

PCR-Buffer 3	2 µl
dNTPs	1 µl
Primer: 24A	0,5 µl
Primer: 24B	0,5 µl
AmpliTag	0,1 µl
H ₂ O (UV)	13,9 µl
DNA	2 µl

Cycler-Programm:

94 °C	94 °C	62 °C	72 °C	72 °C	4 °C
4'	17''	17''	45''	7'	>>
32x					

3.3.2.2 Exon 3 (167 bp)

PCR-Ansatz :

BOM 18	2 µl
dNTPs	2 µl
Primer: 2A	2 µl
Primer: 2Z	2 µl
AmpliTag	0,2 µl
H ₂ O (UV)	10 µl
DNA	2 µl

Cycler-Programm:

94 °C	94 °C	64 °C	72 °C	72 °C	4 °C
2'	10''	20''	30''	4'	>>
35x					

3.3.2.3 Exon 4 (164 bp)

PCR-Ansatz :

PCR-Buffer 3	1 µl
dNTPs	0,75 µl
Primer: 30	0,75 µl
Primer: 2B	0,75 µl
AmpliTag	0,1 µl
H ₂ O (UV)	5,7 µl
DNA	1 µl

Cycler-Programm:

94 °C	94 °C	64 °C	72 °C	4 °C
1'	15''	1'	1'	>>
35x				

3.3.2.4 Exon 5 (176 bp)

PCR-Ansatz :

PCR-Buffer 3	2 µl
dNTPs	1 µl
Primer: 3C	0,5 µl
Primer: 78	0,25 µl
AmpliTaq	0,1 µl
H ₂ O (UV)	14,2 µl
DNA	2 µl

Cycler-Programm:

94 °C	94 °C	64 °C	72 °C	72 °C	4 °C
1'	15''	30''	30''	1'	>>
30x					

3.3.3 PCR der Promoterregion

Für die SSCP wurden homologe 231 bp-Fragmente aus der Promoter-Region der Rot- und Grün-Opsingene im gleichen Ansatz amplifiziert. Die Primer wurden so gewählt, dass sie in konservierten Sequenzabschnitten hybridisierten. Somit entsprach am Ende der Reaktion das Verhältnis von Rotpromoter-Fragmenten zu Grünpromoter-Fragmenten dem Verhältnis von Rotpromotern zu Grünpromotern in der genomischen DNA.

Der Primer 80 wurde für die PCR radioaktiv markiert, so dass diese Stränge nachher in der SSCP detektiert werden konnten.

Es wurde eine kompetitive PCR mit genomischer DNA als Template unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

PCR-Ansatz:

PCR-Buffer 2	1 µl
DMSO	0,2 µl
dNTPs	1,5 µl
Primer: 80*	2,5 µl
Primer: 81	1 µl
AmpliTaq	0,1 µl
50% Glycerol	2 µl
H ₂ O (UV)	0,7 µl
DNA	1 µl

Cycler-Programm:

96°C	94°C	55°C	72°C	72°C	4°C
5'	15''	20''	15''	4'	>>
35x					

PCR Promoterregion

Es wurden für jede DNA-Probe drei getrennte PCR-Ansätze für die SSCP verwendet, um eventuellen Unregelmässigkeiten während der Amplifikation entgegenzuwirken und die Ergebnisse statistisch abzusichern.

3.4 DNA-Restriktion

Restriktionsendonukleasen schneiden DNA, indem sie ihre Phosphodiesterbindungen an einer definierten Stelle hydrolysieren. Dies wurde bei der Unterscheidung von polymorphen Stellen in L- und M-Opsingenen ausgenutzt.

Alle Verdauungen wurden auf einem 3%igen Agarosegel mit Hilfe des Längenstandards Gene Ruler 1 kb DNA ladder ausgewertet, wobei immer eine Positiv- und eine Negativ-Kontrolle mitgeführt wurden.

3.4.1 S180A-Polymorphismus

Das Enzym Fnu4HI schneidet in Exon 3 nur Sequenzen, die für Alanin an Aminosäure-Position 180 kodieren. Die Erkennungssequenz lautet 5'...GC[^]NGC...3'.

Für den Verdau von Exon 3-Fragmenten wurden in einem 20 µl-Ansatz 5 µl der PCR-Reaktionslösung mit 0,5 µl Fnu4HI, 1,5 µl NeB4 und H₂O bei 37°C über Nacht inkubiert und das Ergebnis mittels eines Agarosegels ausgewertet.

3.4.2 Letztes Exon 5 im Opsingen-Cluster

Exon 5 des letzten Gens wurde mit Hilfe von RsaI charakterisiert. Dieses Enzym hat die Erkennungssequenz 5'...GT[^]AC...3' und schneidet Sequenzen, die für die Aminosäure Tyrosin an Position 277 kodieren, was spezifisch für Produkte aus Rot-Opisin-Genen ist.

Der 20 µl Ansatz wurde mit 8 µl PCR-Produkt, 2 µl NeB2, 2 µl BSA 10x, 0,5 µl RsaI und H₂O über Nacht bei 37°C verdaut und mittels Agarose-Gelelektrophorese ausgewertet.

3.4.3 Mutation C203R

Der Austausch der Aminosäure Cystein gegen Arginin an Aminosäure-Position 203 ist in seltenen Fällen verantwortlich für eine Deuteranomalie oder Deuteranopie. Da evtl. einige Probanden diese Mutation aufweisen könnten, wurden alle Proben auf diese Mutation hin gescreent.

Die Mutation liegt im Exon 4; daher wurde aus genomischer DNA ein entsprechendes Fragment aus Exon 4 mittels PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden dann mit BstUI verdaut. Dieses Enzym mit der Zielsequenz 5'...CG[^]CG...3' schneidet nur im Falle einer Mutation.

In einem 20 µl Ansatz wurden 4,5 µl des PCR-Produktes, 2 µl BSA (10x), 2 µl NeB2, 0,5 µl BstUI und H₂O bei 60°C über Nacht inkubiert und anschliessend zur Auswertung auf einem Agarosegel aufgetragen.

3.5 Gelelektrophorese

Diese Methode beruht auf der Eigenschaft, dass geladene Moleküle in einem elektrischen Feld wandern: positiv geladene zum negativen Pol und umgekehrt. DNA trägt negative Ladungen und wandert daher in Richtung des positiven Pols (Anode). Die Wandergeschwindigkeit hängt von der Ladung, der Konformation und der Grösse der Moleküle ab. Verschiedene Elektrophoresebedingungen spielen ebenso eine Rolle; so die Stärke des elektrischen Feldes, die Ionenstärke im Laufpuffer und die Art des Geles.

Es wurden für diese Arbeit Agarosegele zur Kontrolle des Erfolges der PCRs und zur Analyse der Restriktionsverdau verwendet. Für die SSCP wurden Acrylamidgele hergestellt.

3.5.1 Agarose-Gelelektrophorese

Mit einem Agarosegel ist es möglich, DNA-Fragmente in einer Grössenordnung von 70 bis 20000 bp Länge voneinander zu unterscheiden. Grössere DNA-Fragmente durchlaufen das Gel langsamer als kleinere, denn die Poren im Agarosegel bieten, wie ein Sieb, kleineren Fragmenten weniger Widerstand als grösseren. Durch Veränderung der Agarosekonzentration im Gel kann man verschiedene Trennbereiche abdecken. Je kleinere Fragmente man auftrennen möchte, desto höher muss die Agarosekonzentration im Gel gewählt werden.

Bei allen durchgeführten PCRs wurde mittels einer Agarose-Gelelektrophorese die Grösse der DNA-Fragmente überprüft und deren Konzentration abgeschätzt. Dazu eignete sich ein Gel mit einer Agarosekonzentration von 2,5%.

100 ml 1x TBE-Puffer und 2,5 g Agarose wurden vermischt und aufgeköcht, nach Abkühlung auf ca. 60°C wurde Ethidiumbromid mit einer Endkonzentration von 1 µg/100 ml zugegeben und das Gel in einer Gelkammer ausgegossen. Ethidiumbromid ist ein Farbstoff, der in doppelsträngige DNA interkaliert und mittels UV-Licht dann sichtbar gemacht werden kann.

Das Gel wurde nach seinem Erstarren in eine Gelelektrophoreseapparatur, die zuvor mit 1x TBE gefüllt wurde, gelegt und die DNA in die Taschen pipettiert. Da die DNA-Lösung praktisch die gleiche Dichte besitzt wie der Puffer, wurde zur DNA-Probe 1/10 Volumen 10x Ladepuffer zugegeben und somit ihre Dichte erhöht. Damit wurde das Absinken der DNA in die Taschen ermöglicht. Die Farbstoffe im Puffer erlaubten eine Abschätzung der Laufweite der DNA-Fragmente im Gel. Um die Fragmentgrösse der PCR-Produkte bestimmen zu können, wurde eine der Geldaschen mit einem Grössenmarker beladen (1 kb-Ladder). Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 80-100 V für ca. 15 min durchgeführt, die Banden mittels eines UV-Transluminators bei 254 nm visualisiert und mit Hilfe einer Geldokumentationsanlage fotografiert.

Für die LR-PCR-Produkte wurde ein 1%iges Agarosegel verwendet, als Längenstandard diente λ Hind/ Eco.

Die DNA-Fragmente aus den Restriktionsverdau wurden auf einem 3%igen Agarosegel aufgetrennt, als Marker verwendete man den 1 kb-Ladder.

3.5.2 Polyacrylamidgele (PA-Gele)

Mit diesen Gelen ist es möglich, sehr kleine DNA-Fragmente aufzulösen (10-2000 bp), da die Porengröße sehr gering ist. Polyacrylamid entsteht dadurch, dass Acrylamidmonomere in Gegenwart von TEMED und APS polymerisieren. Freie Radikale aus dem APS initiieren die Polymerisation, TEMED katalysiert die Bildung dieser Radikale und beschleunigt somit die Reaktion. Bisacrylamid wird mit Polyacrylamid quervernetzt, so dass sich ein Netzwerk ausbildet, dessen Porengröße von dem Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid bestimmt wird.

Für die SSCP wurde ein Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid von 49:1 gewählt, ausserdem wurde Glycerol mit einer Endkonzentration von 10% zugegeben. Glycerol wirkt leicht denaturierend und kann die Bandenschärfe erhöhen.

3.6 Single-Strand Conformation Polymorphism Electrophoresis (SSCP)

Die SSCP-Gelelektrophorese ist eine Methode, die es ermöglicht, die Mutation einer einzigen Base in einem DNA-Fragment zu erkennen. Sie beruht auf der Tatsache, dass einzelsträngige DNA Basenpaarungen mit sich selbst eingeht und dabei bestimmte Konformationen einnimmt. Diese Konformation ist u.a. abhängig von der Sequenz und der Grösse der DNA (Orita et al. 1989b). Trennt man nun eine solche einzelsträngige DNA elektrophoretisch unter nichtdenaturierenden Bedingungen auf, hängt ihre Laufweite u.a. von ihrer Konformation im Gel ab. Die Laufweite hängt ausserdem von den Elektrophoresebedingungen ab (Orita et al. 1989a). Durch geeignete Bedingungen kann man die Laufeigenschaften so verändern, dass man eine optimale Auftrennung der DNA erhält.

Folgende Parameter können variiert werden (Hayashi 1991):

- Temperatur des Gels, Elektrophoresespannung und -stromstärke und damit die Laufgeschwindigkeit der Fragmente
- Gelkonzentration
- Vernetzungsgrad im Gel durch Änderung des Verhältnisses von Acrylamid zu Bisacrylamid
- Ionenstärke durch Konzentration des Elektrophoresepuffers
- Glycerol im Gel, welches leicht denaturierend wirkt und z.T. die Bandenschärfe erhöht
- Geldicke, wobei dünnere Gele schärfere Banden ermöglichen

Folgende Bedingungen erwiesen sich als optimal für die Auftrennung der Fragmente:

Die Konzentration des Gels betrug 6%, das Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid wurde auf 49:1 festgesetzt, und dem Gel wurde Glycerol

zugegeben. Die Geldicke betrug 0,4 mm, die Elektrophorese wurde bei einer Temperatur von 35°C durchgeführt und als Puffer 1x TBE verwendet.

Aufgetrennt wurden mit der SSCP DNA-Fragmente aus der oben beschriebenen Promoter-PCR, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Basensequenzen in Rot- und Grünpromoter-spezifische Banden differenziert werden konnten.

Herstellung des Gels

Beide Glasplatten wurden sorgfältig mit Sidolin gereinigt, Spacer und Kamm ebenfalls. Die kleinere der beiden Platten wurde mit Silane silanisiert, um nach der Elektrophorese ein Einreißen des Gels beim Auseinanderbauen der Glasplatten zu verhindern. Die Glasplatten wurden zusammengebaut, die Spacer dazwischen festgeklammert. Für die Gellösung wurden 75 ml 6%iger Gel-Mastermix mit 600 µl APS und 60 µl TEMED vermischt, in eine Einmalspritze aufgezogen und das Gel gegossen. Das Gel wurde über Nacht auspolymerisiert und am nächsten Tag in eine vertikale Elektrophoresevorrichtung eingebaut.

Laden der Proben

Nach einem Gelvorlauf von ca. ½ Stunde, bei dem die richtige Geltemperatur mittels Verstellen der Stromstärke eingestellt wurde, wurden die DNA-Proben auf das Gel geladen. Dazu wurden die Proben zunächst 1:50 in SDS 0,1% / EDTA 10 mM verdünnt. 3 µl dieser Verdünnung wurden mit 3 µl Loading-Solution gemischt und dies dann im Cycler 2 min bei 98°C denaturiert, um die DNA als Einzelstränge vorliegen zu haben. Danach wurden die Proben sofort auf Eiswasser gestellt, herunterzentrifugiert und jeweils 2 µl zügig auf das Gel geladen.

Gellauf und Exposition

Während des Gellaufs wurde die Temperatur mittels auf das Glas geklebter temperatursensitiver Streifen detektiert, die Temperatur wurde mittels Stromstärke eingestellt und während des Laufs immer wieder kontrolliert. Der Lauf wurde solange durchgeführt, bis der untere Marker im Puffer angekommen war, dies dauerte ca. 4 Stunden. Danach wurden die Glasplatten aus der Apparatur ausgebaut und die kleinere Glasplatte vorsichtig abgehoben. Das Gel wurde mittels Whatman-Papier von der unteren Glasplatte abgezogen und mit einer Frischhaltefolie abgedeckt. Dann wurde es im Vakuumtrockner 1 Stunde bei 60°C getrocknet, auf einer Imaging Plate (IP) aufgelegt und in einer Filmkassette je nach Radioaktivitätsmenge über Nacht oder bis zu 3 Tagen bei Raumtemperatur exponiert.

Anschließend wurde das Ergebnis der SSCP mittels Phosphorimager-Analyse ausgewertet.

3.6.1 Radioaktive 5'-Endmarkierung von Primern

Für diese Reaktion werden T4 Polynukleotidkinase (T4-PNK), T4-PNK-Puffer und γ -³²P-ATP benötigt. T4-PNK katalysiert mit Hilfe von Magnesium und ATP die Übertragung des radioaktiven Phosphors auf das 5'-OH-Ende des Primers (Richardson 1971). Das im Puffer enthaltene Spermidin stimuliert die Inkorporation des Phosphats.

Zu 2 μ l Primer (100 pmol/ μ l) wurden 2 μ l H₂O hinzupipettiert, die Probe 10 min bei 37°C inkubiert und dann auf Eis gestellt. Zu diesem Gemisch wurden 1 μ l T4-PNK-Puffer, 1 μ l T4-PNK und 5 μ l γ -³²P-ATP hinzugefügt und die Markierungsreaktion bei 37°C für 60 min durchgeführt. Danach wurden 9 μ l H₂O zugegeben, um den markierten Primer auf die Arbeitskonzentration von

10 pmol/ μ l einzustellen. Anschliessend wurden die nicht eingebauten radioaktiven Nukleotide über eine Gel-Filtrationssäule (Sephadex G-25) entfernt.

Es wurde der Primer 80 markiert, mit dem die PCR für die SSCP durchgeführt wurde.

3.6.2 Nachweis von Radioaktivität mittels Phosphoimager

Der Phosphoimager ist ein Gerät, welches auf einem mit Phosphorkristallen beschichtete Platte (IP) gespeicherte Signale lesen kann. Die gelesenen Daten werden mit einem Computer erfasst und mittels geeigneter Software ausgewertet. Man benötigt für diese Methode eine IP, die radioaktive Energie speichern kann, welche anschliessend beim Einlesen im Gerät von diesem erkannt wird. Dazu werden Elektronen in den Kristallen durch die radioaktive Strahlung des Gels in einen angeregten, aber stabilen Zustand versetzt. Mit dem Laserstrahl des Bildplattenscanners werden die Kristalle abgetastet und dabei noch mehr angeregt, diesmal in einen instabilen Zustand versetzt und ihre freiwerdende Energie beim Zurückfallen in ihren Ausgangszustand von diesem Gerät dann gemessen. Diese Methode ist um ein vielfaches empfindlicher als Röntgenfilme, das heisst, sehr schwache Signale werden noch erkannt. Ausserdem ist es möglich, sehr starke und sehr schwache Signale linear zu erfassen, so dass die Methode besonders geeignet ist für Quantifizierungen.

Die SSCP-Gele wurden auf eine IP-Platte gelegt, welche zuvor „erased“ wurde, das bedeutet, sie wurde für ca. 20 min in ein Gerät (Eraser) gelegt, das diese Platte vor der Exposition von allen möglichen störenden Signalen befreite. Die IPs wurden mindestens 12 Stunden bei Raumtemperatur exponiert, danach vom Scanner eingelesen und mittels des Programmes Accuracy Enhancement

TINA 2.09d, Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt, D, ausgewertet. Hierbei wurde die Intensität der radioaktiven Signale quantitativ miteinander verglichen und das Zahlenverhältnis der Rot- und Grün- Promoter zueinander ermittelt.

3.6.3 Beurteilung des Gellaufes

Mit der SSCP wurden PCR-Fragmente des L-Gen-Promoters von denen des M-Gen-Promoters getrennt. Zuvor wurden die doppelsträngigen Fragmente durch Hitzedenaturierung in ihre Einzelstränge aufgetrennt. Nachgewiesen wurde bei der Detektion nur ein Strang, da nur dieser den radioaktiv markierten Primer eingebaut hatte. Im Idealfall sollten also zwei Banden (je eine für den M- und den L-Gen-Promoter) auftreten. Da trotz Hitzedenaturierung immer Einzelstränge zu Doppelsträngen renaturieren, sind also auch diese in der SSCP sichtbar. Sie wandern schneller als die Einzelstränge. Liegen nur Fragmente einer Sequenzart vor, reassoziieren die 5'- und 3'-Stränge zu Homoduplizaten, liegen Fragmente von mehreren Sequenzarten vor, können Homo- und Heteroduplizaten entstehen.

Zu Vergleichszwecken wurde in der SSCP immer auch eine Probe mit aufgetragen, deren Opsingen-Cluster nur ein L-Gen enthielt. Wurden mehr als zwei Banden sichtbar und trat diese zusätzliche Bande in allen Proben auf, musste dies als eine zweite Konformationsart eines der beiden Stränge interpretiert werden. Um diese zusätzliche Bande dem L- oder M-Gen zuzuordnen zu können, musste die Vergleichsprobe herangezogen werden. Enthielt auch sie diese zusätzliche Bande, dann wurde diese als Bande des L-Gen Promoters gewertet.

Jede Probe wurde drei Mal analysiert, jeweils in einem getrennten PCR-Ansatz, um die Ergebnisse statistisch abzusichern.

3.6.4 Auswertung mit dem Phosphoimager

Die Bandenstärken wurden mittels Phosphoimager quantifiziert. Dazu wurde die IP nach Exposition in den Phosphoimager gelegt und die Daten vom IP-Reader gelesen. Dieser Scan-Vorgang setzte die radioaktiven Signale proportional zu ihrer Intensität um, hierbei wurde die höchstmögliche Auflösung von 100 μm in maximal 4096 Graustufen gewählt. Mit Hilfe des Software-Programmes TINA 2.09, Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt, D, wurden die Graustufen in die herstellerdefinierte Einheit PSL umgerechnet. Um die relativen Bandenintensitäten zu bestimmen, wurde durch jede Probenspur ein Auswertungsfenster gelegt (Profil-Overlay). Die Banden wurden auf dem Computer als Peaks dargestellt, bei zwei Banden entstanden zwei Peaks. Die Grösse der Peakfläche korrelierte mit der Intensität der radioaktiven Bande. Da in jeder Probenbande radioaktiver Hintergrund entstand und dieser von Probenspur zu Probenspur variierte, konnte man für jede Probe getrennt eine definierte Basislinie bestimmen, mit deren Hilfe der Hintergrund von den Peakflächen abgezogen wurde. Diese Basislinie wurde empirisch bestimmt.

Die PSL-Werte der einzelnen Peaks wurden mit Hilfe des TINA 2.09-Programmes berechnet und aus diesen entsprechend der Fragmente die Quotienten M-Promoter/L-Promoter gebildet. Da man von einem einzelnen L-Gen ausging, wurde zu den Quotienten 1 dazu addiert, um die Gesamtgenanzahlen im Cluster zu errechnen.

3.7 Automatisierte Sequenzierung

Die verwendete Methode beruhte auf der Kettenabbruchmethode von Sanger et al. (1977). Als Ausgangsprodukt wird einzelsträngige DNA benötigt. Diese hybridisiert mit einem spezifischen Primer, eine zugesetzte Polymerase und Desoxynukleotide sorgen für die Verlängerung des Strangs. Im Reaktionsansatz befinden sich auch Didesoxynukleotide, die zu Strangabbrüchen führen, wenn sie statt der normalen Desoxynukleotide eingebaut werden, da durch die fehlende OH-Gruppe am 3'-C-Atom kein weiteres Nukleotid eingebaut werden kann. Die verschieden langen DNA-Stränge können nun auf einem denaturierenden Gel aufgetragen werden, wo sie entsprechend ihrer Länge aufgetrennt werden und dann auf verschiedene Arten detektiert werden können.

Hier wurde eine leicht abgewandelte Methode, das Cycle Sequencing, verwendet, die ähnlich wie eine PCR funktioniert, bei der aber statt zwei Primern nur einer eingesetzt wird. Es kann doppelsträngige DNA eingesetzt werden und als Enzym wird die Taq-Polymerase verwendet. Vorteil sind auch die hohen Temperaturen, mit denen Sekundärstrukturen und GC-reiche Sequenzen besser überwunden werden können, die benötigte Templatmenge ist gering.

Es wurden Exons 2 und 4 sequenziert und ihre polymorphen Stellen untersucht (vgl. Tabelle 2, 1.2.5). Die Protokolle der PCRs sind oben beschrieben (vgl. 3.3.2).

Zum Sequenzieren wurde der ABI PRISM™ BigDye™ Terminator V3.0 Cycle-Sequencing Ready Reaction Kit, Applied Biosystems Inc., Foster City, Ca, USA, benutzt. Zunächst musste die DNA aus den PCR-Reaktionen aufgereinigt werden. Dies wurde mit Hilfe des CONCERT Rapid PCR Purification System, GIBCO BRL, Life Technology Inc., Gaithersburg, USA, nach

Herstellereempfehlungen bewerkstelligt. Diese aufgereinigte DNA wurde anschliessend für das Cycle Sequencing verwendet.

Zunächst wurden 5 µl der aufgereinigten Produkte auf einem Agarosegel aufgetrennt und anhand der Stärke der Banden die Konzentration der DNA abgeschätzt. Je nach abgeschätzter Konzentration wurde mehr oder weniger DNA in die Reaktion eingesetzt. Die verwendeten Primer wurden 1:10 mit H₂O (UV) verdünnt.

Folgender Ansatz wurde für die Sequenzierreaktion verwendet:

Big Dye TM	2 µl
Primer: CB-24A (Exon 2) CB-30/ CB 2B (Exon 4)	0,5 µl
DNA	2-4 µl
H ₂ O	ad 10 µl

Der Ansatz wurde im Thermocycler folgendermassen inkubiert:

96 °C	96 °C	53 °C	60 °C	4 °C
2'	10"	15"	4'	>>
25x				

Danach wurden die PCR-Proben ausgefällt und gewaschen:

40 µl Isopropanol wurde zu den Proben gegeben, diese gewortext und anschliessend 30 min bei 13000 rmp zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 150 µl Ethanol gewaschen. Schliesslich wurde das Pellet im Thermocycler 1 min bei 60 °C getrocknet. Die Proben wurden zur automatischen Sequenzierung gegeben.

3.8 Phänotypisierung mit dem Anomaloskop

Das Ausmass der Farbsinnstörungen, das Diskriminierungsvermögen und die Helligkeitsfunktion der Probanden, wurden durch Rayleigh matches am Anomaloskop gemessen. Es wurde das Oculus HMC Anomaloskop verwendet. Das Gerät arbeitet nach dem Grundprinzip der additiven Farbmischung. Der farbliche Testbereich ist so gewählt, dass S-Zapfen und Stäbchen keinen Einfluss auf die Messung haben und die Abstimmung beider Felder nur durch die relativen Absorptionsraten von L- und M-Zapfen erreicht wird.

Die Versuche fanden in einem abgedunkelten Raum statt. Ein Auge des Probanden wurde mit einer Augenklappe abgedeckt, während er mit dem anderen Auge durch das Okular des Gerätes auf das Testbild blickte. Das Auge der Testperson wurde über die gesamte Rot-Grün-Breite hinweg vermessen.

Das Oculus-Anomaloskop hat eine integrierte automatische Neutralstimmung und das Licht wird durch Leuchtdioden erzeugt. Die Rot-Grün- und Gelb-Werte wurden von einem angeschlossenen Computer mit der vom Hersteller gelieferten Software erfasst. Die Rot-Grün-Vorgabe erfolgte in Fünferschritten. Wurde hiermit ein diskriminierbarer Bereich erfasst, wurden die Grenzen zwischen undiskriminierbarem Bereich (*matching range*) und diskriminierbarem Bereich bis auf eine Dezimalstelle genau vermessen und deren Reproduzierbarkeit durch Wiederholungen getestet.

Die Phänotypisierung wurde, wie eingangs erwähnt, auswärts durchgeführt.

4 ERGEBNISSE

Im folgenden werden die Ergebnisse der Genotypisierung ausführlich dargelegt sowie die phänotypischen Daten der Arbeitsgruppe in Ungarn dargestellt. Einige der Daten sind im Anhang tabellarisch zusammengefasst. Alle Darstellungen von Opsingen-Clustern beziehen sich auf die vermutlich exprimierten ersten beiden Gene. Weitere Gene wurden nur in ihrer ungefähren Anzahl registriert.

Die Untersuchungen wurden an 50 männlichen Personen durchgeführt, die in Ungarn von einer befreundeten Arbeitsgruppe rekrutiert und phänotypisch mit einem Oculus HMC Anomaloskop auf ihre Farbsinnstörung hin untersucht wurden.

Die Genotypisierung erfolgte mit Hilfe von SSCP, PCR, LR-PCR, Restriktionsverdau und Sequenzierung im Tübinger Labor.

Untersucht wurde die Gesamtgenanzahl, die Reihenfolge der Gene im Cluster, Basensequenzen in L- und M-Genen für Aminosäure-Positionen 65, 111, 116, 180, 230, 233, 236, 277 und die Punktmutation C203R.

4.1 Analyse der Gene und deren Reihenfolge im Cluster mittels LR-PCR

Die LR-PCR bot die Möglichkeit, sehr grosse Fragmente zu amplifizieren und so eine Unterscheidung zwischen L- und M-Genen vorzunehmen, die ansonsten aufgrund ihrer allzu grossen Homologie nicht differenzierbar wären. Auch konnten dadurch jeweils das erste und das letzte Gen eines Clusters spezifiziert werden. Aufgrund der Diskriminierungsfunktion der Primer war es ausserdem möglich, Hybridgene nachzuweisen.

4.1.1 Detektion des ersten Gens

Da der Forward-Primer (LCR1F) in der LCR (Locus Control Region) des Clusters bindet und diese nur einmal, und zwar am Beginn des Clusters, vorkommt, wurde mit der LR-PCR (vgl. 3.3.1.1) nur das erste Gen des Clusters amplifiziert. Als Reverse-Primer wurden (in getrennten Ansätzen) ein L-Gen-spezifischer bzw. ein M-Gen-spezifischer Primer verwendet (CB-79R bzw. CB-79G). Da bei Männern keine zwei verschiedenen ersten Gene vorkommen können (nur ein X-Chromosom), durfte nur in einem der beiden Ansätze ein Produkt amplifiziert werden. Der andere Ansatz diente also gleichzeitig als Kontrollreaktion. PCR-Produkte aus der Primerkombination LCR1F und CB-79R wurden als L-Gene eingeordnet, diejenigen aus der Kombination LCR1F und CB-79G als LM-Hybridgen.

Insgesamt fanden sich 26 (52%) Probanden mit einem L-Gen und 24 (48%) mit einem LM-Hybridgen an erster Stelle. Von den 26 Probanden mit einem L-Gen an erster Stelle erwiesen sich alle bei der phänotypischen Untersuchung als

deuteranomal/-anop. Die 24 Probanden mit einem LM-Gen an erster Stelle erwiesen sich allesamt als protanomal/-anop.

Die Kontrollreaktion zeigte in keinem Fall ein positives Ergebnis.

4.1.2 Distale Gene

Analog zur Detektion des ersten Gens wurde hier ein Forward-Primer (CB-171GF) verwendet, dessen Bindungsstelle nicht in L-Gen-spezifischen Promotern, sondern nur in M- und ML-Gen-spezifischen Promotern vorkommt. Somit war sichergestellt, dass nur M- oder ML-Gene amplifiziert wurden.

Der Forward-Primer wurde mit den gleichen Reverse-Primern kombiniert, die für die Detektion des ersten Gens verwendet wurden. Im Unterschied zur Untersuchung des ersten Gens konnten hier aber in beiden oder auch in keinem Ansatz Produkte amplifiziert werden, da es sowohl mehrere Arten von distalen Genen geben kann als auch gar keine.

PCR-Produkte aus der Primerkombination CB-171GF und CB-79R wurden als ML-Gene erfasst, diejenigen aus der Primerkombination CB-171GF und CB-79G M-Gene genannt. Wurde in beiden Ansätzen einer DNA-Probe ein Produkt amplifiziert, dann wurde davon ausgegangen, dass der Proband sowohl (ein) ML-Gen(e) als auch (ein) M-Gen(e) an distaler Position aufwies. Fand sich nur in einem der beiden Ansätze ein PCR-Produkt, wurde davon ausgegangen, dass der Proband nur (ein) M-Gen(e) bzw. nur (ein) ML-Gen(e) an distaler Position besass. Wurde in keinem der beiden Ansätze einer DNA-Probe ein PCR-Produkt amplifiziert, ging man davon aus, dass keine distalen Gene vorhanden sind. Die dazugehörigen Probanden waren demnach *Single-Gen-Dichromaten*.

Unter den **Protan-Defekten** wurden drei (12,5%) *Single-Gen* Probanden und 21 (87,5%) Multi-Gen Probanden gefunden. 19 dieser Multi-Gen Probanden wiesen distal nur M-Gene auf, zwei zusätzlich distale ML-Gene (10155, 10209). Die *Single-Gen* Probanden 10223 und 10259 waren *protanop*. Die anderen vier Protanopen hatten zusätzliche distale M-Gene. Interessanterweise fand sich ein *protanomaler* Fall mit einem *Single-Gen-Cluster* (10161) (vgl. 5.2.1.2).

Bei den **Deutan-Defekten** fanden sich fünf (19,2%) *Single-Gen* Probanden und 21 (80,8%) Multi-Gen Probanden. Diese wiederum besaßen bis auf zwei Ausnahmen distal sowohl ML- als auch M-Gene. Bei den zwei erwähnten Ausnahmen (10088, 10151) fand sich distal nur ein Hybridgen.

Bis auf eine Ausnahme (10187) (vgl. 5.2.2.2) waren alle *Single-Gen* Probanden mit Deutan-Defekten *deutanop*. Die anderen *Deuteranomalien* hatten bis auf die zwei o.g. Probanden zusätzlich zu ihrem ML-Gen ein oder mehrere M-Gene. Bei keinem der *deutanopen* Probanden wurde ein distales Gen gefunden.

4.1.3 Reihenfolge der Gene

Interessant war die Reihenfolge der Gene bei denjenigen Probanden, die distal sowohl M- als auch ML-Gene aufwiesen, da sich dann die Frage stellte, welches dieser Gene exprimiert wird. Laut heutigem Kenntnisstand werden nur die ersten beiden Gene in phänotypisch relevanten Mengen exprimiert (vgl. 1.2.6). Indirekt konnte die Reihenfolge der distalen Gene nicht bestimmt werden, da sie sich in ihren intergenen Sequenzen nicht voneinander unterscheiden.

Indem das letzte Gen typisiert wird, kann man wenigstens bei Clustern mit nur einem distalen M- und einem distalen ML-Gen die Reihenfolge der Gene mit

Sicherheit feststellen. Ähnlich wie es die LCR nur vor dem ersten Gen gibt, findet sich nur hinter dem letzten Gen im Cluster ein vollständiges TEX28 Gen. Dadurch unterscheidet sich das letzte Gen von den anderen distalen Genen.

Mit den entsprechenden Primern wurden LR-Produkte des letzten Gens amplifiziert. Zur Charakterisierung der amplifizierten Gene wurde nachfolgend ein Fragment von Exon 5 aus dem LR-Produkt amplifiziert und per Restriktionsverdau die Identität des Codons 277 bestimmt. Nur die L-Gen-spezifischen Exon 5 Sequenzen wurden dabei geschnitten. Wurde ein L-Gen-spezifisches Exon 5 gefunden, bedeutete dies demnach ein ML-Hybridgen an letzter Stelle, bei einem M-Gen-spezifischen Exon 5 musste sich ein M-Gen an letzter Stelle befinden.

Es wurden alle Cluster, die gleichzeitig distale M- als auch ML-Gene besaßen, unabhängig von ihrer geschätzten Gesamtgenanzahl auf ihr letztes Gen hin untersucht.

Bei keiner der untersuchten Proben fand sich ein Hybridgen an letzter Stelle.

4.2 S180A-Polymorphismus

Aus allen LR-PCR-Produkten wurde ein Fragment von Exon 3 amplifiziert und mit Fnu4HI verdaut. So konnte der Genotyp des Ser-Ala-Polymorphismus an Aminosäure-Position 180 getrennt für das erste Gen, die distalen M-Gene und die distalen ML-Gene bestimmt werden.

Bei 11 Probanden kodierte das erste L-Gen Serin an Position 180 und bei 15 Probanden Alanin. Dies entspricht einem Verhältnis von 42,3 : 57,7. Bei

Probanden mit einem Hybridgen (LM) an erster Stelle kodierte dieses sieben Mal Serin und 17 Mal Alanin.

Zwei Probanden kodierten in ihren distalen M-Genen an Aminosäure-Position 180 Serin und 19 Probanden Alanin. Dies entspricht in den M-Genen einem Verhältnis von 9,5 : 90,5. Die zwei Probanden mit distalen ML-Genen kodierten beide sowohl in ihrem ML-Gen als auch in ihrem M-Gen an Position 180 Alanin.

Bei den Deuteranomalien wurden distal nur die ML-Gene überprüft, da davon ausgegangen wurde, dass vorhandene zusätzliche M-Gene nicht exprimiert werden. Bei fünf Probanden kodierten die ML-Gene an Aminosäure-Position 180 Serin und bei 16 Probanden Alanin.

Bei keinem Verdau wurden nach Gelelektrophorese zwei Banden gefunden (also verdaute und unverdaute Anteile), so dass man davon ausgehen konnte, dass sich alle distalen Gene einer Probe an der Stelle jeweils gleichen, die für den S180A-Polymorphismus kodiert.

4.3 Mutation C203R

Diese Mutation kann für eine Deuteranomalie/-anopie verantwortlich sein. Aus genomischer DNA aller Probanden wurde ein Fragment von Exon 4 aller L-, M- und Hybridgene amplifiziert und mit BstUI verdaut. Es fand sich bei keiner Probe eine Schnittstelle, also konnte diese Mutation als Ursache für eine Farbsinnstörung ausgeschlossen werden.

4.4 SSCP-Auswertung

Hier wurde das Verhältnis der L- und M-Gen-spezifischen Promoterfragmente zueinander bestimmt und dadurch die Gesamtgenanzahl ermittelt. Die Methode eignete sich insgesamt eher als Möglichkeit der groben Abschätzung der Gesamtgenanzahl denn zur Quantifizierung. Sie erwies sich bei Genanzahlen von bis zu drei als zuverlässig, bei grösseren Gesamtgenanzahlen wurde die Zuverlässigkeit der Ergebnisse geringer, so dass man mit der SSCP nur feststellen konnte, ob die Genanzahl eins, zwei, drei oder mehr als drei betrug. Da diese Methode vor allem dazu angewandt wurde, um bei Probanden mit einer Gesamtgenanzahl von drei die Reihenfolge der Gene zu bestimmen, war es nicht notwendig, bei höheren Gesamtgenanzahlen eine genauere Differenzierung vorzunehmen (vgl. 3.6.4).

Die Banden des SSCP-Gels waren weit genug voneinander aufgetrennt, so dass sich die Peak-Flächen nicht überlappten und einzeln ausgewertet werden konnten.

Die durchschnittliche Gesamtgenanzahl der untersuchten 50 Probanden betrug 3,53. Hierbei lag der Durchschnitt bei den Deutan-Defekten bei 3,3. Bei den Protan-Defekten lag der Durchschnitt der Gesamtgenanzahl bei 3,75.

Eine tabellarische Darstellung der Genanzahlen der einzelnen Probanden findet sich in Tabellen 3 und 4 im Anhang, wobei die Gesamtzahlen über drei nur geschätzt werden konnten.

4.5 Sequenzierung

Es wurden die Exons 2 und 4 aus den LR-PCR-Produkten des ersten Gens, der distalen ML- und der distalen M-Gene sequenziert und auf die Aminosäure-Codons für Aminosäure-Positionen 65, 111 und 116, 230, 233 und 236 hin untersucht. Die distalen M-Gene der Deuteranopen/-anormalen wurden nicht sequenziert, da davon ausgegangen wurde, dass ihr distales ML-Hybridgen exprimiert wird (vgl. 3.3.2). Die Darstellungen der Opsingen-Cluster bezüglich der Farben (rot und grün) der einzelnen Exons in Abbildungen 10 und 11 im Anhang beziehen sich auf diese Codons, wobei die Darstellung von Exon 5 sich nur auf das Codon für Aminosäure-Position 277 bezieht, welche mit den Primern bei der LR-PCR diskriminiert wurde und die Darstellung von Exon 3 sich auf das Codon für Aminosäure-Position 180 bezieht, die im Restriktionsverdau bestimmt wurde.

In nahezu allen Fällen erwiesen sich die Exons, bezogen auf die sechs untersuchten Aminosäure-Codons, als einheitlich L- oder M-Gen-spezifisch.

Ausnahmen zeigten sich vor allem im Exon 4. Hier fanden sich bei deuteranormalen Probanden in sechs Fällen Gene, die die Aminosäurekombination I230/A233/V236 (statt üblicherweise I230/A233/M236) kodierten. Diese Kombination kam fünf Mal in einem ML-Hybridgen (10153, 10163, 10165, 10213, 10255) und ein Mal in einem L-Gen vor (10255). Somit kodierte ein Proband (10255) sowohl in seinem L- als auch in seinem Hybridgen diese Aminosäurekombination im Exon 4. Einmal kodierte Exon 4 die Kombination T230/A233/M236 (statt I230/A233/M236) in einem LM-Hybridgen eines Protanormalen (10106).

Exon 2 erwies sich, bezogen auf die L- bzw. M-Gen-Konformität der kodierten Aminosäuren, als nur einmal uneinheitlich. Es kodierte die Aminosäurekombination T65/V111/Y116 (statt I65/V111/Y116), nachgewiesen in einem ML-Hybridgen eines Deuteranormalen (10053).

Das proximalste Gen bei Probanden mit Deutan-Defekten erwies sich, ausser beim Probanden 10151, in Exons 2 und 4 als L-Gen-spezifisch. 10151 hatte stattdessen ein M-Gen-spezifisches Exon 4.

Die Tabellen 5 und 6 im Anhang zeigen die Ergebnisse der Sequenzierungen. Sequenzüberlagerungen deuten auf unterschiedliche Gene im verwendeten PCR-Produkt hin und sollten nur bei der Analyse der distalen Gene vorkommen. In den Sequenzen der proximalsten (5') Gene im Cluster fanden sich keine Sequenzüberlagerungen, ebenso nicht in den Sequenzen der distalen M-Gene. So konnte man davon ausgehen, dass alle distalen M-Gene konform bezüglich Exon 2 und Exon 4 waren (vgl. auch 5.1.2).

4.6 Ergebnisse mit dem Oculus HMC Anomaloskop

Jeder Proband wurde mit dem Oculus HMC Anomaloskop phänotypisiert. Dabei fanden sich vier (8%) deuteranope und sechs (12%) protanope Probanden. 22 (44%) waren deuteranomalous oder extrem deuteranomalous, 18 (36%) protanomalous oder extrem protanomalous. Abbildung 9 zeigt die Lage der *midpoints* und *matching ranges* in Bezug auf die Rayleigh-Skala. Die genaueren Werte sind aus Tabellen 7 und 8 im Anhang zu entnehmen.

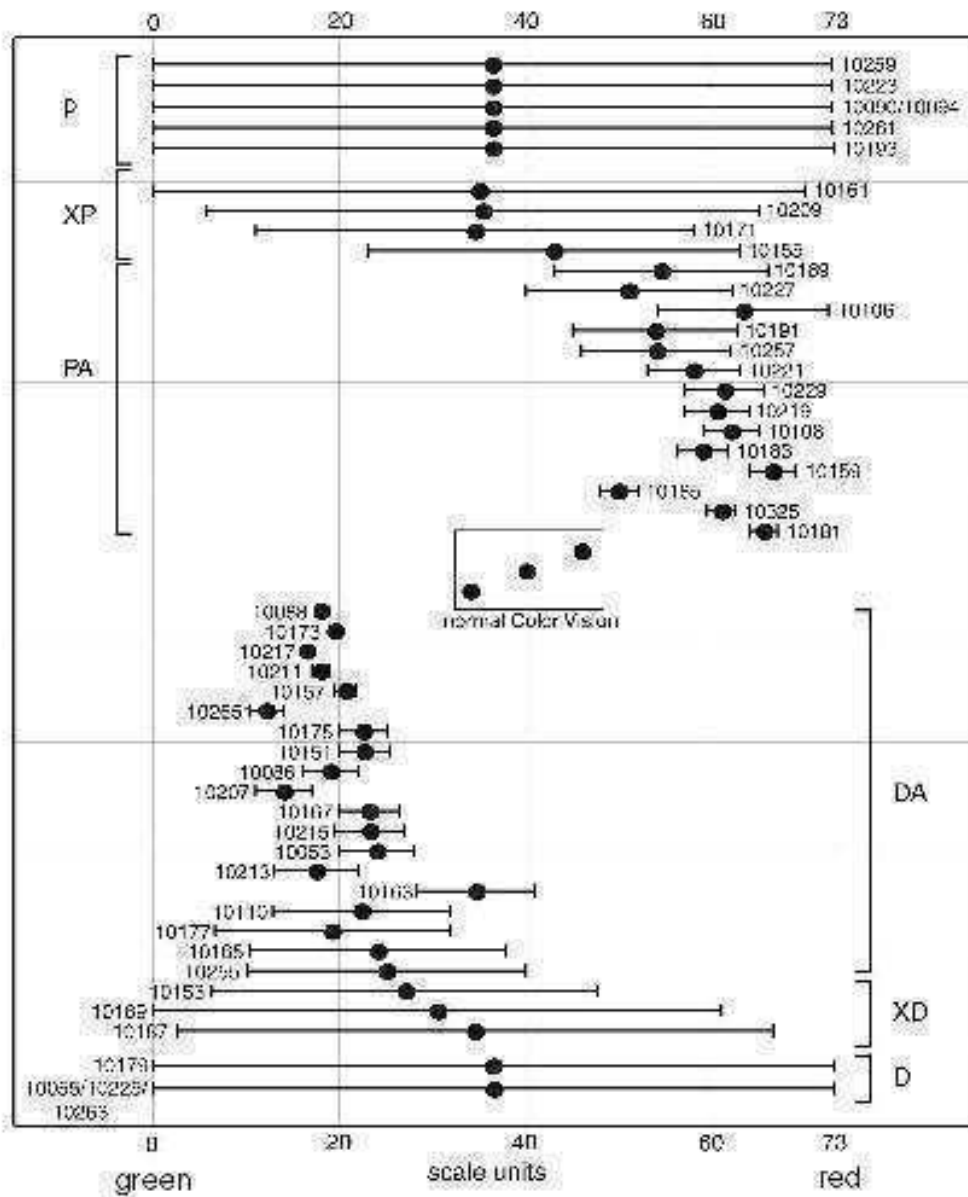


Abb. 9: Lage der midpoints und matching ranges in Bezug auf die Rayleigh-Skala
P=Protanop, PA=Protanomal, XP=extrem Protanomal, D=Deuteranop, DA=Deuteranomal, XD=extrem Deuteranomal.

4.7 Ableitung des Phänotyps anhand der Genotypisierung

Die Ableitung des Phänotyps anhand des Genotypen erfolgte anhand von in vitro ermittelten Daten der Absorptionsmaxima der verschiedenen L-, M-, ML und LM-Pigmente aus den Arbeiten von Merbs und Nathans (1992a, 1992b) und Asenjo, Rim und Oprian (1994), bei den Protan-Defekten zusätzlich auch aus den in vivo Daten von Sharpe et al. (1998). Waren für eine gefundene Genkombination keine Messdaten vorhanden, wurde das Absorptionsmaximum anhand der bekannten spektralen Verschiebungen der einzelnen Exons errechnet.

Im Anhang sind die errechneten Differenzen der Absorptionsmaxima ($\Delta\lambda_{\max}$) der Pigmentpaare bei den einzelnen Probanden in Tabellen 9 und 10 dargelegt.

4.8 Genotyp-Phänotyp Korrelation

Für die Korrelation von Geno- und Phänotyp wurde der Mittelwert des geschätzten $\Delta\lambda_{\max}$ -Wertes (vgl. Tabellen 9 und 10 im Anhang) und der am Oculus HMC Anomaloskop gemessene *matching range* (vgl. Tabellen 7 und 8 im Anhang) der jeweiligen Probanden in einem Scatterplot aufgetragen. Diese sind nachfolgend abgebildet.

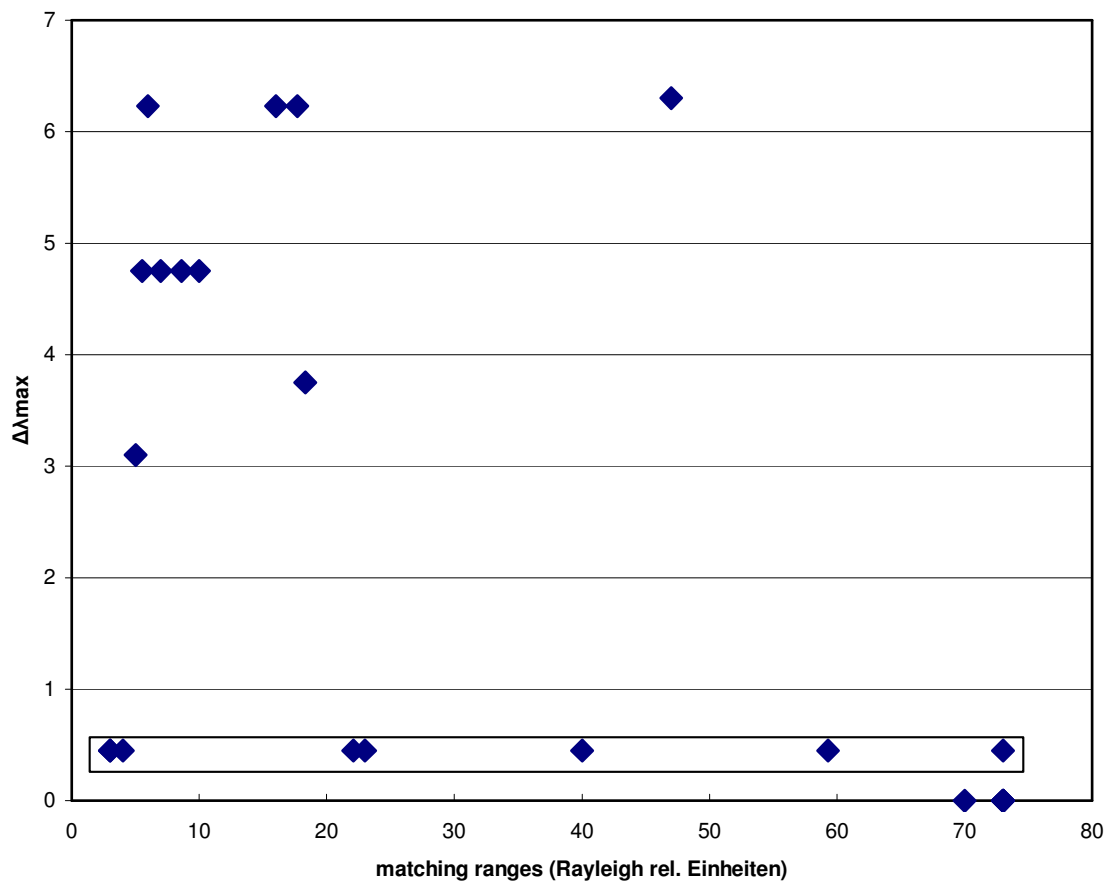


Abb. 13: Scatterplot zur Verdeutlichung des Zusammenhangs von *matching range* und $\Delta\lambda_{\max}$. Dargestellt sind die Werte aller Probanden mit Protan-Defekten, wobei ein Punkt mehrere Probanden darstellen kann. Umrandet sind die Probanden mit dem Genotyp L2M3(ala)/M(ala).

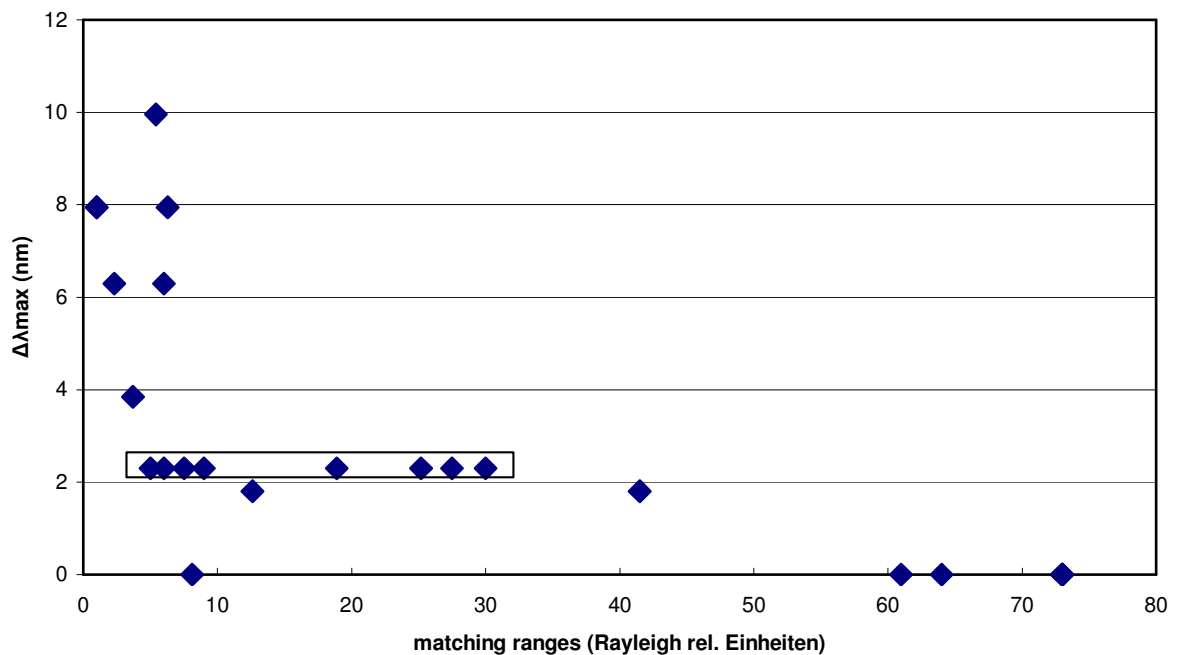


Abb. 14: Scatterplot zur Verdeutlichung des Zusammenhangs von matching range und $\Delta\lambda_{\max}$. Dargestellt sind die Werte aller Probanden mit Deutan-Defekten, wobei ein Punkt mehrere Probanden darstellen kann. Umrandet sind die Probanden mit dem Genotyp L(ala)/ M3L4(ala).

4.9 Zusammenfassende Darstellung der Genotypen

4.9.1 Protanop/Protanomali

Sechs Individuen waren **protanop**. Zwei von ihnen wiesen nur ein einzelnes Gen in ihrem Cluster auf (*Single-Gen-Dichromaten*): einer ein L2M3(A180)-Hybridgen, der andere ein L3M4(S180)-Hybridgen. Die anderen vier Protanopen hatten jeweils zwei, drei oder mehr Gene (*Multi-Gen-Dichromaten*). Zwei besaßen die Opsingen-Cluster L1M2(A180)/L(A180), einer das Opsingen-Cluster L1M2(S180)/M(S180), und einer L2M3(A180)/M(A180).

Unter den 18 **Protanomalen** fand sich bei einem Probanden (5,6%) ein singuläres L2M3(A180)-Gen. Alle anderen (94,4%) hatten mehrere Opsingene in ihrem Cluster, d.h. zusätzliche distale M-Gene. Zwei von diesen wiesen ausserdem noch ein distales Hybridgen der Struktur M4L5(A180) auf.

Das Sequenzieren des ersten Gens ergab einen T230I-Polymorphismus im Exon 4 bei einer Person (10106) mit dem Gen-Cluster L4M5(A180)/M(A180).

Bei zwei Probanden (10155, 10209) war nicht eindeutig festzustellen, welches distale Gen exprimiert wird, da sie distal sowohl ein ML- als auch ein M-Gen aufwiesen, die Genanzahl im Cluster aber mehr als drei betrug. Ihr Genotyp lautete also (bezieht man sich nur auf die wahrscheinlicherweise exprimierten Gene) L2M3(A180)/M(A180) oder L2M3(A180)/M4L5(A180).

Probanden mit Multi-Gen-Clustern, die ein L1M2-Hybridgen enthielten, waren alle protanop, alle anderen Hybridgene waren mit einer Protanomalie oder Protanopie assoziiert.

Wenn man davon ausgeht, dass nur die ersten beiden Gene im Cluster signifikant zum Farbsehen beitragen und die nachfolgenden Gene in nicht bedeutsamen Masse exprimiert werden, dann ergeben sich die in Abbildung 10 im Anhang dargestellten Opsingen-Cluster.

Insgesamt kamen die einzelnen Hybridgene in folgender Häufigkeit vor (vgl. Tabelle 11), wobei bei den Probanden 10155 und 10209 nicht eindeutig bestimmt werden konnte, ob deren Hybridgene exprimiert werden:

Hybridgen	Häufigkeit
L1M2(A180)	2 (8,3%)
L1M2(S180)	1 (4,2%)
L2M3	8 (+2) (41,7%)
L2M3(T230)	1 (4,2%)
L3M4	2 (8,3%)
L4M5(A180)	4 (16,7%)
L4M5(S180)	4 (16,7%)

Tab. 11: Häufigkeiten der gefundenen LM-Hybridgene bei Probanden mit Protan-Defekten.

4.9.2 Deuteranop/Deuteranomali

Diese Probanden wiesen, bezogen auf ihr Opsingen-Cluster, eine viel grössere Variabilität auf als die Protanopen/Protanomalen.

Vier **Deuteranope** hatten *Single-Gen-Cluster* mit einem einzelnen L-Gen (drei mit S180, einer mit A180).

Unter den 22 **Deuteranomalen** gab es einen Probanden (4,5%), der ein *Single-Gen-Cluster* mit einem L(S180)-Gen aufwies. 21 (95,5%) hatten Opsingen-Cluster, die aus einer der zwei L-Gen-Varianten bestanden, gefolgt von einem der fünf verschiedenen Typen von ML-Hybridgenen und meistens zusätzlich noch einem oder mehreren normalen M-Genen (die wahrscheinlich nicht zum Farbsehen beitragen).

Das Sequenzieren des Exon 4 ergab fünf Mal eine V236M-Genvariante: Bei zwei Probanden (10153, 10163) mit der Genkombination L(A180)/M2L3(S180) wurde die Genvariante im ML-Hybridgen kodiert, ebenso bei zwei Probanden (10165, 10213) mit der Genkombination L(A180)/M3L4(A180). Bei einem Probanden (10255) mit der Kombination L(A180)/M3L4(A180) wurde die V236M-Genvariante sowohl im L- als auch im ML-Hybridgen kodiert. Eine polymorphe Stelle in Exon 2 wurde nur bei einem Probanden (10053) gefunden. Dieser Proband kodierte eine T65I-Substitution im ML-Hybridgen eines L(S180)/M2L3(S180)-Gen-Clusters.

Es konnte kein Zusammenhang zwischen bestimmten Hybridgenen und Di- oder Trichromasie festgestellt werden, vielmehr konnten alle Hybridgene Di- oder Trichromasie bewirken. Es fiel lediglich auf, dass Probanden mit Multi-Gen-Clustern keine Dichromasie zeigten.

Die Zusammensetzungen der Opsingen-Cluster sind aus der Abbildung Nr. 11 im Anhang zu entnehmen, die Häufigkeit der Hybridgene aus nachfolgender Tabelle 12.

Hybridgen	Häufigkeit
M1L2(S180)	1 (4,3%)
M1L2(S180;T65)	1 (4,3%)
M2L3	1 (4,3%)
M2L3(V236)	2 (8,7%)
M3L4	8 (34,8)
M3L4(V236)	3 (13%)
M4L5(A180)	5 (21,7%)
L(S180;M4)	1 (4,3%)
L(A180;V236)	1 (4,3%)

Tab. 12: Häufigkeiten der gefundenen Hybridgene bei Probanden mit Deutan-Defekten

5 DISKUSSION

Zunächst wird auf die methodischen Schwierigkeiten bei der Geno- und Phänotypisierung eingegangen. Hierbei werden auch Messungenauigkeiten der Ergebnisse erörtert.

Danach sollen die gefundenen Genotypen genauer betrachtet werden und auf die Häufigkeit der einzelnen Hybridgene und Genkombinationen eingegangen werden. In diesem Zusammenhang werden die Probanden mit identischen Genotypen für das proximale Pigmentgen-Paar zusammengefasst und mit den resultierenden Phänotypen verglichen.

Es werden dann die aus den proximalen Pigmentgen-Paaren eines Clusters abgeleiteten Differenzen der Absorptionsmaxima ($\Delta\lambda_{\max}$) der Photopigmente mit dem *matching range* korreliert und die Zusammenhänge herausgearbeitet. Mögliche Erklärungsmodelle zur phänotypischen Variabilität werden anschliessend dargestellt.

Zum Schluss werden die Ergebnisse mit denen aus anderen Studien verglichen und in deren Kontext erörtert.

5.1 Methodische Schwierigkeiten

5.1.1 Messungengenauigkeiten am Anomaloskop

Da die Messung am Anomaloskop einen subjektiven Test darstellt und damit von der Mitarbeit des Probanden beeinflusst wird, kann hier die Exaktheit des Abgleichs von Proband zu Proband variieren – trotz genauer Einhaltung des Versuchprotokolls. Auch ist deren Konzentrationsfähigkeit bei den bis zu drei Stunden lang dauernden Messungen begrenzt.

Der mit dem Auge zum Okular einzuhaltende Abstand ist mit dem Oculus Anomaloskop nicht kontrollierbar. Dadurch können eventuell unterschiedliche Bereiche der Retina beleuchtet werden und somit auch weiter peripher gelegene Zapfen, die eine andere Form und Funktion besitzen als die zentral gelegenen, dicht gedrängten Rezeptoren, einen Einfluss auf die Messung haben. Es wird vermutet, dass durch die unterschiedliche Form der peripheren Zapfen deren Pigmente eine andere optische Dichte besitzen als Pigmente in zentral gelegenen Zapfen. Dadurch könnte die Diskriminierungsfähigkeit verändert sein.

Das Oculus Anomaloskop vermindert zu einem grossen Teil durch einen halbautomatisierten Messablauf den Einfluss des Untersuchers auf den Untersuchungsablauf und das Resultat.

5.1.2 Genotypisierung – methodische Grenzen

Unsicherheiten bei der Genotypisierung ergaben sich vor allem bei der Bestimmung der distalen Gene, sowohl was deren Anzahl betraf als auch deren Sequenz und Reihenfolge.

Das proximalste Gen im Cluster konnte immer mit Sicherheit analysiert werden. Da angenommen wird, dass nur die ersten beiden Gene im Cluster in signifikanter Menge exprimiert werden, wurde versucht, auch die Struktur des zweiten Gens zu ermitteln. Dieses gelingt aber nur bei Clustern, die aus maximal drei Genen bestehen. Bei Clustern mit mehr als drei Genen wurde bei Probanden mit Deutan-Defekten als wahrscheinlichste Variante das (wenn vorhandene) Hybridgen als zweites Gen definiert, da angenommen wurde, dass nicht ein distales M-Gen, sondern das ML-Hybridgen für die Anomalie verantwortlich ist. Mit direkten Verfahren wurde bei Personen mit Farbsinnstörungen das ML-Hybridgen immer an zweiter Stelle nachgewiesen (Winderickx et al. 1992a, Deeb & Motulsky 1998).

Bei Probanden mit Protan-Defekten, deren Cluster mehrere distale M-Gene aufwies, konnte die Sequenz dieser M-Gene nicht einzeln bestimmt werden, da bei der Sequenzierung aus methodischen Gründen alle M-Gene im gleichen Ansatz analysiert werden mussten. So können bei multiplen M-Genen Sequenzüberlagerungen zum Teil schwer erkannt werden. Einzelne Mutationen, die evtl. im exprimierten M-Gen vorlagen, konnten dadurch nicht nachgewiesen werden.

Die SSCP erwies sich als nicht ausreichend präzise Methode für die exakte Bestimmung der Gesamtgenanzahl im Cluster. Dies zeigte sich vor allem bei höheren Genanzahlen. Bei Gesamtgenanzahlen von bis zu drei war die SSCP noch ausreichend zuverlässig. Da man jedoch nur bei Gen-Clustern von bis zu drei Genen die Reihenfolge der Gene bestimmen kann, war es für diese Arbeit irrelevant, darüberhinausgehende Genanzahlen mit Sicherheit zu ermitteln. Ziel war, das zweite Gen zu bestimmen. Bei grösseren Opsingen-Clustern wurde

immer von der wahrscheinlichsten Variante ausgegangen, nämlich dass vorhandene Hybridgene für die jeweilige Farbsinnstörung verantwortlich sind.

5.2 Untersuchung der Genotypen

In allen Gen-Clustern fanden sich entweder Hybridgene oder sie bestanden aus nur einem Gen. Dies steht in Einklang mit der Modellvorstellung, dass Farbsinnstörungen auf inequale Rekombinationsereignisse zurückzuführen sind (Deeb et al. 1992, Sharpe et al. 1998). Es wurde immer von der Vermutung ausgegangen, dass nur die ersten beiden Gene im Cluster exprimiert werden (Nathans et al 1989, Winderickx et al 1992a), bei den Protan-Defekten also ein LM-Hybridgen und ein M-Gen, bei den Deutan-Defekten ein L-Gen und ein ML-Hybridgen. Die restlichen distalen M-Gene wurden bei der Darstellung der Genotypen nicht berücksichtigt. Man geht davon aus, dass diese normalen M-Pigmentgene die dritte oder weiter distale Positionen einnehmen und, wenn überhaupt, dann nicht so suffizient in die Retina exprimiert werden, dass sie zum Farbsehen beitragen (vgl. 1.2.6).

Im folgenden werden Probanden mit gleichen Genotypen bezüglich ihres proximalen Pigmentgen-Paares zusammengefasst und ihre phänotypische Variabilität dargestellt.

5.2.1 Protan-Defekte

Bei allen Probanden mit Protan-Defekten fand sich ein LM-Hybridgen. Dies steht im Einklang mit Untersuchungen von Deeb et al. (1992) und Sharpe et al. (1998), dass Protan-Defekte auf LM-Hybridgene zurückzuführen sind. Insgesamt erfüllten fast alle Fälle die Annahme, dass die Fähigkeit zur Farbdiskriminierung auf Unterschieden der exprimierten Opsingene in den Aminosäure-Codons, die für *spectral tuning* verantwortlich sind, beruht (Merbs & Nathans 1992, Asenjo et al. 1994, Sharpe et al. 1998). Je mehr sich die jeweiligen Pigmente in diesen Aminosäuren unterschieden, je grösser also die Differenz ihrer Absorptionsmaxima, desto besser das Farbunterscheidungsvermögen. Eine streng lineare Korrelation konnte jedoch nicht ermittelt werden (vgl. Abbildung 13, 4.8).

Insgesamt fanden sich 21 (87,5%) Probanden mit Multi-Gen-Clustern, wobei sieben verschiedene Variationen vorkamen (bezogen auf das proximale Pigmentgen-Paar). Bei drei (12,5%) Probanden wurden *Single-Gen-Cluster* nachgewiesen, die in zwei Variationen vorkamen.

Das Hybridgen L1M2 war bei Probanden mit Multi-Gen-Clustern durchgehend mit einer Dichromasie assoziiert, die Hybridgene L3M4 und L4M5 waren mit einer Trichromasie assoziiert. Laut Sharpe et al. (1999b) entsteht eine Protanopie gewöhnlich nur dann, wenn ein Crossing over sich vor Exon 3 ereignet hat, ansonsten entsteht eher eine Protanomalie. Dies stimmt mit den hier vorliegenden Ergebnissen übereinstimmt.

Auffallend war eine Gruppe von Probanden, die bei gleichem Genotyp für das proximale Pigmentgen-Paar erhebliche Variationen in ihrem Phänotyp zeigte. Die Sequenzen von Hybrid- und M-Gen unterschieden sich nur im Exon 2 voneinander.

5.2.1.1 Multi-Gen-Cluster

Unter den Probanden mit Protan-Defekten, die Multi-Gen-Cluster aufwiesen, waren 17 (80,95%) protanomale und vier (19,05%) protanop. Insgesamt kamen sieben verschiedene Hybridgene vor: fünf verschiedene bei den Protanomalen, zwei verschiedene bei den Protanopen, wobei jeweils die Kombination eines LM-Hybridgens mit einem M-Gen vorlag. Das Hybridgen unterschied sich von dem M-Gen in bis zu drei Exons (Exons 2 bis 4). Exons 1 und 6 sind jeweils in allen Genen sequenzgleich (vgl. 1.2.3).

a) Genotyp L2M3(ala)/ M(ala)

Die häufigste Genkombination (6 Personen) war ein L2M3(ala)-Hybridgen gefolgt von einem normalen M(ala)-Gen. Zusätzlich waren ein bis ca. sechs M-Gene vorhanden. Die Aminosäuresequenzen von Hybrid- und M-Gen unterschieden sich nur im **Exon 2** voneinander (bezogen auf die Aminosäure-Codons, die für Positionen 65, 111 und 116 kodieren). Die Differenz der Absorptionsmaxima der beiden Pigmente betrug hier nach in vitro Messungen von Merbs & Nathans (1992a, 1992b) und Asenjo, Rim und Oprian (1994) und nach in vivo Daten von Sharpe et al. (1998) 0,2 bis 0,7 nm und ist eigentlich zu gering, um trichromatisches Sehen zu ermöglichen. Entsprechend wird dieser Genotyp oft bei Protanopen gefunden (Jagla, Jäggle und Hayashi 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Genotyp aber eher bei Protanomalen gefunden und ist offensichtlich mit einer grossen Variabilität in den *matching ranges* assoziiert. Diese nahmen erstaunlicherweise Werte über nahezu das gesamte Spektrum an.

Offenbar tragen hier neben den durch die Sequenzunterschiede in Exon 2 verursachten spektralen Shift von 0,2 bis 0,7 nm andere Faktoren wesentlich zur Diskriminierungsfähigkeit bei (vgl. 5.4.3).

Man konnte die Phänotypen entsprechend ihrer *matching ranges* in drei Gruppen unterteilen:

(i) drei Probanden (10181, 10185, 10325) hatten *matching ranges* von 3 bis 4 und waren protanomal. Sie konnten also, trotz geringer errechneter Differenz der Absorptionsmaxima ihrer Pigmente, sehr gut diskriminieren. Möglicherweise könnten andere Einflussgrößen der von Exon 2 kodierten Aminosäuren auf die Pigmente und ihre Expression in Zapfen zu einer erhöhten Diskriminierungsfähigkeit führen. Aber auch Unterschiede auf postrezeptoraler Ebene könnten einen grösseren Beitrag zur Diskriminierungsfähigkeit dieser Probanden leisten als bei den übrigen Probanden (vgl. 5.4.3).

(ii) Zwei Probanden (10169, 10227) waren extrem protanomal. Sie hatten *matching ranges* von 22 und 23, die auch nicht allein durch den von Exon 2 verursachten spektralen Shift zu erklären sind; bei ihnen könnten ebenso die o.g. Faktoren eine Rolle spielen, wenn auch nicht so stark ausgeprägt.

(iii) Nur ein Proband war protanop (10193) mit einem *matching range* von 73. Hier wäre gegebenenfalls eine Nachuntersuchung am Anomaloskop sinnvoll. Nagy (1980) und Breton & Cowan (1981) haben gezeigt, dass Trichromasie bei (vermeintlichen) Dichromaten festgestellt werden kann, wenn Rayleigh matches unter anderen Versuchsbedingungen durchgeführt werden.

Zwei zusätzliche Probanden, deren Opsingen-Paar sich sehr wahrscheinlich auch nur im Exon 2 unterschied, könnten zu dieser Genotyp-Gruppierung hinzugezählt werden. Sie besaßen jedoch zusätzlich ein M4L5(ala)-Hybridgen an distaler Position, so dass nicht mit Sicherheit ermittelt werden konnte, welches der distalen Gene exprimiert wurde. Zudem besaßen beide Probanden leider mehr als drei Gene im Cluster und bei Genanzahlen von über drei kann die Reihenfolge der Gene nicht ermittelt werden. Das Hybridgen war jedoch nicht an letzter Stelle im Cluster. Ihr Genotyp für die ersten beiden Gene könnte sowohl L2M3(ala)/ M(ala) oder L2M3(ala)/ M4L5(ala) lauten. Wahrscheinlicher ist die erste Annahme, da der Phänotyp der beiden Probanden extrem protanomal war, mit *matching ranges* von 40 und 59,3. Hätten beide den letzteren Genotyp, müssten die Absorptionsmaxima ihrer

exprimierten Pigmente sehr viel weiter auseinander liegen, da vor allem durch Exon 5 der spektrale Shift sehr gross wird (20 bis 25 nm), die *matching ranges* müssten also kleiner sein.

Es ist bekannt, dass es durchaus Hybridgene an weit distaler Position geben kann, die offensichtlich nicht exprimiert werden, denn 4-8% der normalsichtigen Männer verfügen über distale (nicht exprimierte) ML-Hybridgene (Drummond-Borg et al. 1989, Jorgensen et al. 1990, Deeb et al. 1992, 1995).

b) Genotypen L4M5(ala)/ M(ala) und L4M5(ser)/ M(ser)

Vier Probanden (10183, 10219, 10221, 10229) bildeten die zweitgrösste Gruppe mit gemeinsamem Genotyp. Ihr Opsingen-Cluster bestand aus dem Pigmentgen-Paar L4M5(ala) und M(ala) gefolgt von bis zu ca. fünf M-Genen. Aus den Unterschieden in den Sequenzen der Pigmentgene in den **Exons 2 und 4** ist ein spektraler Abstand der Pigmente von 1,9 bis 7,6 nm abzuleiten. Es war daher zu erwarten, dass durch diese Unterschiede trichromatisches Sehen ermöglicht wird. Tatsächlich waren alle Probanden dieser Gruppierung protanomal mit *matching ranges* von 5,5 bis 10.

Ein zusätzlicher Proband (10106) unterschied sich von dieser Gruppe nur durch die in Exon 4 kodierte Aminosäure an Position 230, so dass die Differenz der Absorptionsmaxima seiner Pigmente im Vergleich zum L4M5(ala)/ M(ala)-Genotypen um 1 nm (also 0,9 bis 6,6 nm) verringert sein sollte (vgl. Tabelle 2). Auch er war Trichromat, wenn auch mit einem grösseren *matching range* von 18,3. Dies steht im Einklang mit der Vorstellung, dass kleinere Unterschiede im spektralen Abstand der Pigmentpaare zu grösseren *matching ranges* führen. Die Position 230 leistet hier also, wie erwartet, einen Beitrag zum *spectral tuning* (Merbs & Nathans 1993). Man muss aber hierbei bedenken, dass die durch einzelne Substitutionen verursachten spektralen Shifts sich nicht miteinander addieren lassen: die Grösse des Shifts hängt möglicherweise von der Identität der anderen relevanten Aminosäuren ab (Merbs & Nathans 1993,

Asenjo et al. 1994) und beträgt, auf das gesamte Gen bezogen, mehr oder weniger als 1 nm.

Die Opsingene eines Probanden (10171) unterschieden sich ebenfalls in den Exons 2 und 4, sie kodierten aber jeweils Serin statt Alanin an der Aminosäure-Position 180. Somit repräsentiert dieser Proband den Genotyp **L4M5(ser)/M(ser)** mit einem weiteren distalen M-Gen. Er ist extrem protanomal mit einem *matching range* von 47. Der errechnete spektrale Abstand seiner Pigmente betrug 1,9 bis 2,4 nm, obwohl sich die Pigmente an genau den gleichen Stellen unterscheiden wie beim L4M5(ala)/ M(ala) Genotyp. Offenbar spielt es also eine Rolle, ob die Positionen 180 der kodierten Opsine jeweils von Serin oder Alanin besetzt sind, d.h. die einzelnen Aminosäuren interagieren miteinander. Vielleicht spielen aber auch noch Messungenauigkeiten bei den in vivo und in vitro Ermittlungen der Absorptionsspektren der einzelnen Pigmente eine Rolle.

c) Genotyp **L4M5(ser)/ M(ala)**

Eine Dreiergruppe bildeten die Probanden 10108, 10191 und 10257. Ihre Opsingen-Cluster waren aus einem L4M5(ser)-, einem M(ala)-Opsingen und ein bis zwei distalen M-Genen zusammengesetzt. Die Opsingene unterschieden sich folglich in den **Exons 2 bis 4**. Die errechnete Differenz der Absorptionsmaxima der Pigmente ($\Delta\lambda_{\max}$) betrug 6 bis 6,4 nm, liess also erwarten, dass die Phänotypen Trichromaten waren. Da $\Delta\lambda_{\max}$ der Pigmentpaare grösser war als in Gruppe b) und in dieser Gruppe zusätzlich ein Unterschied der Pigmentpaare in der von Exon 3 kodierten Aminosäure an Position 180 bestand, der ja den spektralen Shift um ca. 4 nm verschieben soll (vgl. Tabelle 2), sollte man erwarten, dass die *matching ranges*, verglichen mit Gruppe b), kleiner sind. Dies traf jedoch nicht zu. Die *matching ranges* in dieser Gruppe betragen 6 bis 17,7. Da dies kein signifikanter Unterschied zur vorigen Gruppe ist, könnte dieses Ergebnis von Messungenauigkeiten bei der

Ermittlung des Phänotypen oder der Ermittlung der Absorptionsmaxima der einzelnen Pigmente herrühren.

d) Genotyp L3M4(ser)/ M(ala)

Das Gen-Cluster des Probanden 10159 bestand aus einem L3M4(ser)- und einem M(ala)-Gen mit ca. drei zusätzlichen M-Genen. Dies bedeutet, dass seine exprimierten Opsingene sich in den **Exons 2 und 3** unterschieden. Der geschätzte spektrale Abstand der Pigmente betrug 2 bis 3,7 nm, während der Proband einen *matching range* von 5 aufwies. Er konnte also besser diskriminieren als der Genotyp es erwarten liess. Auch dieses Phänomen könnte mit o.g. Faktoren (siehe Gruppe a), vgl. auch 5.4.3) erklärt werden.

e) Genotypen L1M2(ala)/ M(ala) und L1M2(ser)/ M(ser)

Eine letzte Gruppe von protan-defekten Probanden mit Multi-Gen-Clustern (10090, 10094, 10261) lässt sich abschliessend zusammenfassen. Die Genotypen dieser Probanden haben als Gemeinsamkeit ein LM-Hybridgen, das sich in keiner der wichtigen Aminosäure-Codons von den distalen M-Genen unterscheidet. Sie müssten somit alle protanop sein, da es in ihren exprimierten Pigmenten wahrscheinlich keinen wesentlichen Unterschied in den Absorptionsmaxima gibt. Tatsächlich traf dies auch zu.

5.2.1.2 Single-Gen-Cluster

Bei drei Probanden wurden *Single-Gen-Cluster* nachgewiesen. Zwei Probanden (10161, 10259) hatten den Genotyp **L2M3(ala)**, ein Proband (10223) den Genotyp **L3M4(ser)**. Alle müssten Dichromaten sein – ein Proband hiervon war jedoch extrem protanomal (10161) und zeigte im längerwelligen Bereich ein geringes trichromatisches Farbsehen bei einem *matching range* von 70. Gründe für seine Diskriminierungsfähigkeit könnten z.B. Inhomogenitäten in der Retina oder Unterschiede der Zapfenpigmente in ihrer optischen Dichte sein (vgl. auch 5.4.3).

5.2.2 Deutan-Defekte

Bei Probanden mit Deutan-Defekten waren diese allesamt auf ML-Hybridgene oder *Single-Gen-Cluster* (mit einem singulären L-Gen) zurückzuführen, was mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Deeb et al. 1992, Sharpe et al. 1998, Nathans et al. 1986a, Nathans et al. 1986b, Vollrath et al. 1988, Drummond-Borg et al. 1989) vereinbar ist. Bei fünf (19,23%) Probanden wurden *Single-Gen-Cluster* nachgewiesen, die in zwei Variationen vorkamen. 21 (80,77%) Probanden hatten Multi-Gen-Cluster, die, bezogen auf die ersten beiden Gene, in 11 verschiedenen Variationen vorkamen.

Auch hier konnte, wie bei den protan-defekten Probanden, keine streng lineare Korrelation zwischen den *matching ranges* der Probanden und der Differenz der Absorptionsmaxima ($\Delta\lambda_{\max}$) des jeweiligen L- und ML-Hybridpigments festgestellt werden (vgl. Abbildung 14, 4.8).

Auffallend war die im Vergleich zu den Probanden mit Protan-Defekten grössere Variabilität in den Opsingen-Clustern bezüglich Genvarianten, die sowohl im L- als auch im ML-Hybridgen vorkamen. Ein V236M-Austausch kam bei fünf Probanden vor, wobei einer von ihnen (10255) die V236-Variante in beiden Genen zeigte. Proband 10151 wies im Exon 4 seines L-Gens durchgehend eine M-Gen-spezifische Sequenz auf.

Es konnte kein Zusammenhang zwischen Hybridgenen und Di- oder Trichromasie festgestellt werden, vielmehr fand sich bei Multi-Gen-Clustern immer eine Trichromasie, während eine Dichromasie nur bei *Single-Gen-Clustern* auftrat. Nach Sharpe et al. (1999b) entsteht eine Deuteranopie meistens nur dann, wenn das Crossing over sich vor Exon 2 ereignet hat. Der einzige Proband, bei dem dies der Fall war (M1L2-Hybridgen), zeigte jedoch eine extreme Deuteranomalie. Es gab in der Probandengruppe zu wenige mit einem M1L2-Hybridgen (Crossing over vor Exon 2), um die These von Sharpe et al. letztendlich zu untermauern.

Wie bei den Probanden mit Protan-Defekten fiel auch hier eine Gruppe von Probanden auf, die sich bei gleichem Genotyp für das proximale Pigmentgen-Paar durch eine besonders grosse Variabilität in ihren resultierenden Phänotypen auszeichnete. Ihr Pigmentgen-Paar unterschied sich nur im Exon 2.

Im folgenden werden, wie bei den Probanden mit Protan-Defekten, die einzelnen Genotypen näher beleuchtet und mit den Phänotypen verglichen.

5.2.2.1 Multi-Gen-Cluster

Alle 21 Probanden mit Multi-Gen-Cluster waren Trichromaten. Ihre Opsingen-Cluster bestanden aus einem L-, einem ML- und bis zu ca. drei weiteren M-Genen, wobei das ML-Hybridgen in sieben verschiedenen Variationen vorkam. Das L-Gen unterschied sich vom ML-Hybridgen in bis zu drei Exons (bezogen auf Exons 2 bis 5).

a) Genotyp L(ala)/ M3L4(ala) und L(ser)/ M2L3(ser)

Die häufigste Genkombination bei den Deuteranomalien (8 Probanden) war ein M3L4(ala)-Gen kombiniert mit einem L(ala)-Gen und weiteren ein bis zwei M-Genen. Dies wiederum bedeutet nur einen Unterschied im **Exon 2** zwischen den beiden proximalen Pigmentgenen, wobei drei der Probanden zusätzlich eine V236-Variante in ihren Hybrid- bzw. in beiden Genen aufwiesen.

Hier wird (im Gegensatz zu 0,2 bis 0,7 nm beim korrespondierenden L2M3(ala)/M(ala)-Genotyp bei den Protan-Defekten in Gruppe a)) der spektrale Abstand auf 1,0 bis 3,6 nm geschätzt. Genauso wie bei der entsprechenden Gruppe unter den Protan-Defekten kamen auch hier sehr unterschiedliche Phänotypen vor. Die *matching ranges* erstreckten sich von 5 bis 30.

Auch hier kann man die Phänotypen entsprechend ihrer *matching ranges* in Gruppen unterteilen.

(i) Kleinere *matching ranges* von 5 bis 9 zeigten die Probanden 10175, 10207, 10213 und 10215. Unter diesen differierte der Proband 10213 durch die in seinem ML-Hybridgen kodierte V236-Variante. Die Aminosäure-Position wird in Exon 4 kodiert und soll nicht zum *spectral tuning* beitragen (Merbs & Nathans 1993). Der Proband 10165 (wird in der folgenden Gruppe (ii) aufgeführt) zeigte

einen identischen Genotyp, hatte aber einen grösseren *matching range* von 27,5. Die zwei Probanden mit der V236-Variante unterschieden sich also phänotypisch stark voneinander.

(ii) Probanden mit grösseren *matching ranges* zwischen 18,9 und 30 waren 10110, 10177, 10165 und 10255. Hier fiel, (ausser o.g. Proband 10165), Proband 10255 auf, bei dem die V236-Variante in beiden Opsingenen kodiert wurde. Er hatte den grössten *matching range* von 30.

Ob der V236M-Austausch den Phänotyp beeinflusst, z.B. durch einen Einfluss auf die optische Dichte, ist aus diesen Daten nicht zu erschliessen, hierzu müssten mehr Probanden mit einem solchen Genotyp untersucht werden.

Das Opsingen-Paar von Proband 10265 unterschied sich, wie beim L(ala)/M3L4(ala)-Genotyp, nur im Exon 2. Sein Genotyp war **L(ser)/ M2L3(ser)** mit ca. fünf weiteren M-Genen. Der *matching range* war 3,7. Der errechnete spektrale Abstand betrug hier 3,7 bis 4 nm, war also grösser als beim L(ala)/M3L4(ala)-Genotyp, obwohl sich die Pigmentgene ebenfalls nur in Exon 2 voneinander unterschieden.

Die möglichen Gründe für die variablen Phänotypen entsprechen denen, die bei den Protan-Defekten schon erwähnt wurden. Zusätzlich liesse sich hier jedoch spekulieren, dass die zusätzlichen M-Gene einen Beitrag zum Farbdiskriminierungsvermögen leisten könnten (vgl. hierzu auch 5.4.3).

b) Genotyp L(ala)/ M4L5(ala)

Probanden mit diesem Genotyp (10086, 10088, 10157, 10211) bildeten die zweitgrösste Gruppe unter den Deutan-Defekten. Zusätzlich wurden bis zu zwei weitere M-Gene gefunden. Hier unterschieden sich die exprimierten Opsingene in den **Exons 2 und 4**. Der errechnete spektrale Abstand der Pigmente betrug 5 bis 7,6 nm. Die *matching ranges* waren in dieser Gruppe nicht so variabel und ergaben Werte von 0 bis 6. Damit waren sie erstaunlicherweise sehr klein,

entsprachen aber in etwa der korrespondierenden Gruppe b) der Protan-Defekte. Proband 10088 hatte einen *matching range* von 0. Das ist besser als bei einigen Normalsichtigen und lässt sich z.B. durch postrezeptorale Mechanismen erklären, die sich individuell unterscheiden (vgl. 5.4.3).

c) Genotypen L(**ser**)/ M3L4(**ala**) und L(**ala**)/ M2L3(**ser**)

Eine Gruppe von drei Probanden (10167, 10173, 10217) zeigte den Genotyp L(**ser**) kombiniert mit einem M3L4(**ala**)-Gen und ein bis zwei weiteren M-Genen. Diese Opsingene (L(**ser**)/ M3L4(**ala**)) unterscheiden sich voneinander in den **Exons 2 und 3**; trichromatisches Sehen sollte also möglich sein. Die errechnete Differenz der Absorptionsmaxima der Pigmente betrug 7,9 bis 8 nm. Die *matching ranges* variierten von 1 bis 6,3, unterschieden sich also nicht wesentlich von denen der Gruppe b) und waren teilweise besser als erwartet. Zur Bewertung der möglichen zugrunde liegenden Mechanismen vgl. 5.4.3.

Ungewöhnlich war bei Proband 10151 der Genotyp: **L(M4,ser)/ M4L5(ala)**; weitere M-Gene wurden nicht gefunden. Das erste L-Gen enthielt ein M-Gen-spezifisches Exon 4. Da für diesen Genotyp in Vorarbeiten keine Absorptionsmaxima ermittelt wurden, wurde hier ein hypothetisches Absorptionsmaximum errechnet: L(**ser**) wird durch das M-Gen-spezifische Exon 4 in den kürzerwelligen Bereich verschoben. Da Exon 4 für ca. 2 nm Verschiebung des Absorptionsmaximums des Pigmentes zuständig ist (vgl. Tabelle 2, 1.2.5), wurden von dem aus Vorarbeiten ermittelten L(**ser**)-Wert (vgl. Tabelle 1) 2 nm abgezogen. Dieses Vorgehen ist nicht ganz exakt, da man Einzelwerte nicht genau miteinander addieren kann und die Aminosäuren sich im Pigmentmolekül wechselseitig beeinflussen. Dennoch konnte so eine ungefähre Abschätzung der Werte erfolgen. Das gleiche Vorgehen wurde für andere Genotypen, die nicht in Vorarbeiten untersucht wurden, verwendet (vgl. Tabelle 1 im Anhang).

Bei dem Probanden 10151 differierten die zwei untersuchten Opsingenkopien ebenfalls in den Exons 2 und 3; der errechnete spektrale Abstand der Pigmente betrug 9,9 bis 10 nm. Es wurde ein *matching range* von 5,4 ermittelt. Der Proband unterschied sich hierbei also nicht relevant von den anderen Probanden in dieser Gruppe.

Bei zwei weiteren Probanden (10153, 10163) unterschieden sich die beiden proximalen Opsingene ebenso nur in den Exons 2 und 3 voneinander. Der Genotyp stellte sich als **L(ala)/ M2L3(ser)** mit zwei weiteren M-Genen dar, zusätzlich fand sich im ML-Hybridpigment ein V236M-Austausch, welcher aber nicht zum *spectral tuning* beitragen soll (Merbs & Nathans 1993). Der errechnete spektrale Abstand der Pigmente betrug 0,6 bis 3 nm, die *matching ranges* 12,6 und 41,5. Der Unterschied kann durch Sequenzunterschiede der Opsingen-Paare im Exon 2 erklärt werden, vielleicht spielt aber auch der V236M-Austausch eine Rolle, indem er zur Stabilität des Pigmentes beiträgt. Ausserdem kommen noch Möglichkeiten in Frage, die bei anderen Genotypen schon erörtert wurden (s.o. und 5.4.3).

Insgesamt zeigte sich diese Gruppe homogen: grössere Abstände in den Absorptionsmaxima der Pigmente waren mit kleineren *matching ranges*, kleinere Abstände mit grösseren *matching ranges* korreliert.

d) Genotyp L(ser)/ M1L2(ser)

Der Genotyp L(ser)/ M1L2(ser) kam bei zwei Probanden vor (10053, 10189). Zusätzlich waren ca. zwei bzw. ca. drei M-Gene im Cluster vorhanden. Proband 10053 zeigte eine Besonderheit. In seinem ML-Pigment lag der I65T-Austausch vor, so dass sich seine Pigmente nur an den AS-Positionen 111 und 116 voneinander unterschieden. Beim Probanden 10189 zeigten sich zwischen beiden Pigmenten dagegen keinerlei Unterschiede an den untersuchten Stellen, er sollte also ein dichromates Farbsehen zeigen. Beim Probanden

10053 gab es trotz dieses Unterschiedes an Aminosäure-Positionen 111 und 116 aber ebenso keine Differenz in den Absorptionsmaxima seiner Pigmentpaare, da davon ausgegangen wird, dass Aminosäure-Positionen 111 und 116 nicht zum *spectral tuning* beitragen (Merbs & Nathans 1993). Beide hätten also Dichromaten sein müssen. Es zeigte sich aber bei der Phänotypisierung, dass 10053 einen *matching range* von 8,1 und 10189 von 61 besass, also beide anomale Trichromaten waren

Beim Probanden 10053 könnte das unerwartet gute Diskriminierungsvermögen durch eine besondere Rolle von Exon 2, v.a. der Aminosäure-Positionen 111 und/oder 116, bedingt sein. Bei beiden könnten zudem postrezeptorale Mechanismen oder distalere M-Gene eine Trichromasie erklären (vgl. auch 5.4.3).

5.2.2.2 Single-Gen-Cluster

Bei den fünf Probanden mit *Single-Gen-Clustern* waren vier, wie erwartet, phänotypisch deuteranop. Überraschenderweise zeigte ein Proband (10187), wenn auch gering ausgeprägt, trichromatisches Farbsehen, was nicht ohne weiteres erklärbar ist, da er nur dieses eine L-Pigmentgen in seinem Opsingen-Cluster exprimiert.

Genotyp L(ser)

Bei den Probanden 10055, 10187, 10225 und 10263 lag der Genotyp L(ser) vor. Alle bis auf den Probanden 10187 waren deuteranop. Dieser hatte einen *matching range* von 64. Sein geringfügiges Diskriminierungsvermögen lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass instrumentelle Artefakte die

Ergebnisse beeinflusst haben könnten, zusätzlich kämen noch andere Erklärungsmöglichkeiten in Frage (vgl. 5.4.3).

Genotyp L(ala)

Dieser Genotyp kam einmal vor, und zwar bei Proband 10179. Er war, wie erwartet, deuteranop, da ihm jegliche M-Opsingene fehlten

5.3 Phänotypisierung

Innerhalb der 50 phänotypisch untersuchten Probanden fanden sich 26 mit Deutan- und 24 mit Protan-Defekten. Unter den Probanden mit Deutan-Defekten waren 22 deuteranomal oder extrem deuteranomal und vier deuteranop. Bei den Protan-Defekten fanden sich 18 Protanomale bzw. extrem Protanomale und sechs Protanope. Dies entspricht einer relativen Verteilung der einzelnen Gruppen von 44% Deuteranomalen, 8% Deuteranopen, 36% Protanomalen und 12% Protanopen. Verglichen mit den eingangs erwähnten Verteilungen (vgl. 1.3.4 und 1.3.5) in der kaukasischen Bevölkerung entsprechen die Ergebnisse, umgerechnet auf 7,4% Rot-Grün-Farbsinnstörungen in der kaukasischen Bevölkerung, nicht genau diesen Werten. Vor allem die Gruppe der Protanomalen ist deutlich überrepräsentiert. Diese Abweichungen von den Literaturwerten lässt sich durch die, bezogen auf 7,4% Betroffenen in der kaukasischen Bevölkerung, relativ kleine Stichprobe erklären.

In Abbildung 9 (vgl. 4.6) wird die phänotypische Variabilität innerhalb der Probanden dargestellt; diese weicht nicht deutlich von früheren Studien ab (Deeb et al. 1992, Sharpe et al. 1998, Shevell & He 1995). Auffällig war, dass

trotz gleichen Genotyps (bezogen auf die ersten beiden Gene im Cluster) viele Probanden ein sehr unterschiedliches Farbdiskriminierungsvermögen zeigten. Dieser Aspekt wird in 5.2 und 5.4 diskutiert.

5.4 Vergleich Genotyp - Phänotyp

Ausgehend von Ergebnissen anderer Forschergruppen, aus denen hervorgeht, dass die einzelnen Aminosäurekombinationen der Opsinpigmente für bestimmte Absorptionsmaxima verantwortlich sind, wurde anhand von in vivo und in vitro Ergebnissen aus diesen Arbeiten (Merbs & Nathans 1992a, 1992b, 1993, Asenjo et al. 1994, Sharpe et al. 1998) (vgl. Tabelle 1 im Anhang und Tabelle 2, 1.2.5) die Absorptionsmaxima der einzelnen Pigmente ermittelt und für die jeweiligen Pigmentpaare die Differenz der Absorptionsmaxima ($\Delta\lambda_{\max}$) errechnet. Für Pigmenttypen, die in früheren Arbeiten nicht untersucht wurden, wurden die Absorptionsmaxima anhand von bekannten spektralen Verschiebungen der einzelnen Aminosäuren bzw. Exons aus o.g. Tabellen geschätzt.

Für die Korrelation wurden die $\Delta\lambda_{\max}$ -Werte mit den Werten der *matching ranges* in einem Scatterplot aufgetragen. Hier wird der Zusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp ersichtlich. Es wurde erwartet, dass je breiter der *matching range* der einzelnen Probanden war, desto kleiner der Abstand der Absorptionsmaxima der beiden exprimierten Opsine. Solch eine strenge lineare Korrelation konnte jedoch nicht gefunden werden.

Die Scatterplots sind oben aufgeführt (vgl. 4.8, Abbildungen 13 und 14).

5.4.1 Protan-Defekte

In der Gruppe der Protan-Defekte war im Scatterplot (Abbildung 13, 4.8) eine Tendenz zu erkennen: grosse $\Delta\lambda_{\max}$ (über 3 nm) waren mit kleinen *matching ranges*, $\Delta\lambda_{\max}$ -Werte von ca. 0,45 nm (0,2 bis 0,7 nm) und kleiner mit sehr variablen *matching ranges* korreliert.

Probanden mit zwei funktionell identischen Pigmenten hatten *matching ranges* von 73. Dies entspricht, wie erwartet, einer Dichromasie, denn wenn es zwischen dem LM-Hybrid- und dem M-Opsinpigment keinerlei Unterschied im Absorptionsmaximum gibt, ist es nicht möglich, am Anomaloskop einen Abgleich zu erzielen; der *matching range* erstreckt sich somit über den gesamten Testbereich von 73 (vgl. auch 1.3.4 und 1.3.5). *Single-Gen* Probanden hatten *matching ranges* von 70 bis 73. Hier hätte man, da diese Probanden nur einen der beiden Pigmenttypen in ihren Zapfen exprimieren und der $\Delta\lambda_{\max}$ -Wert somit 0 nm beträgt, erwartet, dass sie alle einen *matching range* von 73 aufweisen. Der *matching ranges* von 70 wird in 5.2.1.2 und 5.4.3 erläutert.

Alle anderen Probanden mit geschätzten $\Delta\lambda_{\max}$ -Werten von 0,2 bis 0,7 nm (Mittelwert 0,45 nm) und grösser hatten *matching ranges*, die kleiner als 73 waren. Ihre $\Delta\lambda_{\max}$ -Werte betragen 0,2 bis 7,6 nm. Ausnahme war Proband 10193 mit einem *matching range* von 73 und $\Delta\lambda_{\max}$ von 0,2 bis 0,7 nm. Ab welchen genauen $\Delta\lambda_{\max}$ -Werten trichromatisches Sehen möglich wird, ist nicht genau bekannt; aus diesen Daten lässt sich nur folgern, dass Werte oberhalb 3 nm sicher zu trichromatischem Sehen führen.

Eine Gruppierung fiel auf, diese ist im Scatterplot (vgl. Abbildung 13, 4.8) umrandet: Genotyp L2M3(ala)/ M(ala) unterscheidet sich in seinen Opsingenen nur im Exon 2. Dieser Genotyp war mit einer grossen Streuung des *matching ranges* assoziiert (vgl. auch 5.2.1.1). Bei den Untersuchungen von Jagla et al. (2002) wurde dieser Genotyp auch bei 10 Probanden mit Protanopie (*matching range* ca. 73) nachgewiesen. Offenbar spielt Exon 2 eine besondere Rolle bei

der Phänotyp-Ausprägung. Vielleicht kommen aber auch bei Probanden mit kleinem $\Delta\lambda_{\max}$ andere Mechanismen stärker zum Tragen als bei Normalsichtigen und Probanden mit grösserem $\Delta\lambda_{\max}$ (vgl. 5.4.3).

Allgemein kann man anhand des Scatterplots (vgl. Abbildung 13, 4.8) folgern, dass $\Delta\lambda_{\max}$ -Werte von über 3 nm sicher zu trichromatischem Sehen führen. Im Scatterplot zeigten alle Probanden oberhalb dieses Wertes *matching ranges*, die 47 und kleiner waren. Dies entspricht per Definitionem einer Trichromasie (vgl. 1.3.4 und 1.3.5). $\Delta\lambda_{\max}$ -Werte von 0,45 nm und kleiner führten zu Di- oder Trichromasie, es fanden sich hier also *matching ranges* von 0 bis 73, wobei 73 einer Dichromasie entspricht. Im $\Delta\lambda_{\max}$ -Bereich zwischen 0,45 und 3 nm fanden sich keine Probanden, so dass in diesem Bereich keine Aussage zu phänotypischen Ausprägungen getroffen werden kann.

5.4.2 Deutan-Defekte

Ähnlich wie bei der Probandengruppe mit Protan-Defekten war auch hier die Tendenz zu erkennen, dass grössere $\Delta\lambda_{\max}$ zu kleineren *matching ranges* führen, während kleinere $\Delta\lambda_{\max}$ zu variablen *matching ranges* führen.

Wie im Scatterplot (Abbildung 14, 4.8) zu sehen, hatten Probanden, deren Pigmente laut Berechnung identische Absorptionsmaxima zeigten, nicht, wie erwartet (vgl. 5.4.1), *matching ranges* von 73, was einer Dichromasie entsprechen würde, sondern von 8,1 und 61. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist in 5.2.2.1, 5.4.3 und 5.5 genannt. Bis auf eine Ausnahme (10187) hatten *Single-Gen* Probanden, wie erwartet (vgl. 5.4.1), *matching ranges* von 73. Dieser *Single-Gen* Proband zeigte einen *matching range* von 64.

Alle Probanden mit geschätzten $\Delta\lambda_{\max}$ von über ca. 1,8 nm (0,6 bis 3 nm) waren Trichromaten, sie wiesen *matching ranges* zwischen 1 und 41,5 auf.

Wenn man davon ausgeht, dass Normalsichtige eine Differenz im Absorptionsmaximum zwischen ihrem L- und M-Opsin von ca. 32 nm haben und Dichromaten von 0 nm (Merbs & Nathans 1992, Asenjo et al. 1994, Sharpe et al. 1998), ist dieses Ergebnis vorstellbar. Allerdings erklärt es nicht, warum Probanden mit Werten von 0 nm trotzdem trichromatisches Sehen zeigten, d.h. *matching ranges* von 8,1 bzw. 64 aufwiesen.

Wie bei den Protan-Defekten gab es auch hier eine auffällige Gruppierung (im Scatterplot, Abbildung 14, 4.8 umrandet), und zwar die Probanden mit dem Genotyp L(ala)/ M3L4. Auch hier unterschieden sich die beiden proximalen Pigmentgene nur im Exon 2. Probanden mit diesem Genotyp zeigten eine hohe phänotypische Variabilität, die sich auch in einer Arbeit von Jagla et al. (2002) zeigte. Hier wurden 15 Probanden mit diesem Genotyp als deuteranop klassifiziert, während in vorliegender Arbeit bei gleichem Genotyp keine Deuteranopie vorkam.

Es lässt sich anhand des Scatterplots (vgl. Abbildung 14, 4.8) allgemein folgern, dass $\Delta\lambda_{\max}$ -Werte über ca. 1,8 nm sicher zu trichromatischem Sehen führen (die *matching ranges* in diesem Bereich waren alle kleiner als 42), während Werte von 0 nm eine Di- oder Trichromasie bewirken (*matching ranges* bis 73). Eine Trichromasie bei einem $\Delta\lambda_{\max}$ -Wert von 0 nm ist nicht ohne weiteres erklärbar, diese Tatsache wird in 5.4.3 näher erörtert.

5.4.3 Erklärungsmodelle zur phänotypischen Variabilität

Theoretisch können mehrere Einflussgrößen zur phänotypischen Variabilität beitragen. Im wesentlichen sind dies unterschiedliche optische Dichte der Zapfenpigmente innerhalb einer Retina, postrezeptorale Mechanismen, Expressionsmechanismen und instrumentelle Artefakte bei der Ermittlung des

Phänotyps. Sie sind in den vorigen Kapiteln schon kurz genannt worden. Es folgt hier eine ausführlichere Erörterung.

Rolle von Exon 2

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Probanden fiel eine grössere Gruppe auf, deren gemeinsames Merkmal war, dass ihr proximales Opsingen-Paar sich nur im Exon 2 unterschied, die aber trotz gleichen Genotyps für dieses Opsingen-Paar erhebliche Variationen in ihrem Phänotyp zeigte. Einige von diesen Probanden hatten erstaunlich geringe *matching ranges*, die sich nicht durch den spektralen Shift von Exon 2 (vgl. Tabelle 2, 1.2.5) erklären lassen. Das bedeutet, dass neben den durch die Sequenzunterschiede des proximalen Opsingen-Paares in Exon 2 verursachten spektralen Shift von maximal 1 nm andere Einflussgrößen der von Exon 2 kodierten Aminosäuren auf die Opsine und ihre Expression in Zapfen zu einer erhöhten Farbdiskriminierungsfähigkeit führen. Die von Exon 2 kodierten Aminosäuren haben möglicherweise Einfluss auf die Stabilität des Pigmentes und damit auf die optische Dichte in den Zapfen. Ob speziell die von Exon 2 kodierte Aminosäure-Position 65 für die veränderte Stabilität des resultierenden Pigments (Neitz et al. 1999) verantwortlich ist, ist noch nicht abschliessend geklärt (vgl. 5.5 und 5.2.2.1).

Postrezeptorale Mechanismen

Auch Unterschiede auf postrezeptoraler Ebene könnten einen Beitrag zum unerwartet guten Farbdiskriminierungsvermögen einiger Probanden leisten. So könnten bei diesen Probanden die postrezeptoralen on-off-Systeme (Eysel 1995) eine verstärkende Wirkung auf die relativen Erregungen der Zapfen besitzen als bei Probanden mit gleichem Genotyp bezüglich des proximalen Opsingen-Paares und schlechterem Diskriminierungsvermögen.

Instrumentelle Artefakte

Besonders bei Probanden, die trotz *Single-Gen-Cluster* eine anomale Trichromasie aufweisen oder die nach der Genotypisierung Dichromaten oder extrem anomale Trichromaten sein müssten, könnten Inhomogenitäten in der Retina oder instrumentelle Artefakte bei der Ermittlung des Phänotypen eine Rolle bezüglich ihres Farbdiskriminierungsvermögens spielen (vgl. 5.1.1). Eine Nachuntersuchung derjenigen Probanden am Anomaloskop, die eine Dichromasie trotz vermuteter (extremer) anomaler Trichromasie aufwiesen, wäre gegebenenfalls sinnvoll. Nagy (1980) und Breton & Cowan (1981) haben gezeigt, dass Trichromasie bei (vermeintlichen) Dichromaten festgestellt werden kann, wenn Rayleigh matches unter anderen Versuchsbedingungen durchgeführt werden.

Ebenso wäre diese Vorgehensweise bei Probanden mit *Single-Gen-Clustern* denkbar, die nach der Genotypisierung eigentlich Dichromaten sein müssten. Nathans et al. (1986b), Neitz et al. (1989), Deeb et al. (1992), Crognale et al. (1999) fanden bei Probanden mit *Single-Gen-Cluster* trichromatische Farbwahrnehmung, wenn bei der Messung weitere Bereiche der Retina beleuchtet wurden. Dies weist darauf hin, dass nicht nur die Expression von unterschiedlichen Opsinpigmenten zur Farbdiskriminierung beiträgt, sondern auch andere Faktoren, wie z.B. Einflüsse von S-Zapfen oder Stäbchen, unterschiedliche Morphologie oder Funktion der L- und M-Zapfen (das Vorkommen eines L-Pigmentes in einem M-Zapfen könnte ein anderes Absorptionsverhalten bewirken, als wenn dieses L-Pigment in einem L-Zapfen exprimiert wird), unterschiedliche optische Dichte der Pigmente zentral und parafoveal oder örtliche Unterschiede in der Pigmentierung der Macula.

Genexpression

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die phänotypische Variabilität könnte sein, dass ein Teil der distaleren M-Gene zur Farbwahrnehmung beiträgt und

so ein verbessertes Farbdiskriminierungsvermögen ermöglicht (vgl. 1.2.6). Dies könnte sich vor allem bei deuteranopen Probanden bemerkbar machen (Deeb et al. 1992). Denkbar wären auch Sequenzänderungen in der Promoterregion, den Introns oder den Exons 1 und 6, die sich auf die Genexpression auswirken könnten.

Vielleicht gab es bei manchen Probanden unentdeckte Punktmutationen oder Deletionen in Genen, die z.B. anstatt des vermuteten Hybridgens exprimiert wurden. Die Lage des distalen Hybridgens kann nicht mit Sicherheit bestimmt werden.

Insgesamt könnten diese genannten Mechanismen gerade bei solchen Probanden, deren $\Delta\lambda_{\max}$ -Werte sehr klein sind, eine verstärkte Rolle spielen.

5.5 Vergleich mit anderen Arbeiten und Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die Limitierung in der Vorhersagbarkeit der Farbwahrnehmung durch eine Genotypisierung der L- und M-Opsingene. Aufgrund der grossen Variabilität in der phänotypischen Ausprägung bei gleichem Genotyp müssen auch noch andere Faktoren ausser der Differenz im Absorptionsmaximum der Photopigmente einen Einfluss auf die Farbwahrnehmung haben. Es konnte zwar gezeigt werden, dass sich mit zunehmendem $\Delta\lambda_{\max}$ der Photopigmente die Farbdiskriminierung generell verbessert, aber es bestand hierbei kein linearer Zusammenhang.

Möglicherweise spielen retinale (Nathans et al. 1986b, Neitz et al. 1989, Deeb et al. 1992, Crognale et al. 1999) und kortikale Faktoren eine Rolle bei der phänotypischen Ausprägung. Sie könnten zusätzlich zur Farbdiskriminierung beitragen oder auf die Photopigmente einwirken. Zudem könnten auf genetischer Basis regulatorische Mechanismen bezüglich der Expression der

Opsingene eine Rolle spielen oder auch Faktoren, die die Dichte der Pigmente in den Zapfen beeinflussen (vgl. 5.4.3).

He & Shevell (1994) nennen drei mögliche Ursachen für individuelle Unterschiede im *matching range*: i) Differenzen im Absorptionsmaximum der Photopigmente, ii) optische Dichte der Zapfen und/oder iii) post-rezeptorale Prozesse.

Zu i) Sie untersuchten den Geno- und Phänotyp von Deuteranomalien und fanden, dass $\Delta\lambda_{\max}$ signifikant den *matching range* und damit die Farbdiskriminierung von Deuteranomalien beeinflussen kann. Bei $\Delta\lambda_{\max}$ unter 2 nm war die phänotypische Variabilität der untersuchten deuteranormalen Probanden grösser als bei $\Delta\lambda_{\max}$ über 2 nm. Dies entspricht in etwa auch den Ergebnissen dieser Arbeit: die Farbdiskriminierung wurde im allgemeinen bei grösseren $\Delta\lambda_{\max}$ besser und die phänotypische Variabilität bei Probanden mit kleineren $\Delta\lambda_{\max}$ grösser. Hier wurde allerdings bei den Probanden mit Protan-Defekten die Variabilität bei $\Delta\lambda_{\max}$ unter 0,46 nm grösser und bei den Deutan-Fällen schon bei $\Delta\lambda_{\max}$ ab 2,3 nm (vgl. Scatterplots, Abbildungen 13 und 14 in 4.8). Die Auswirkung auf die phänotypische Variabilität ist also in vorliegender Arbeit insgesamt bei $\Delta\lambda_{\max}$ -Werten unter 2,3 bis 0,45 nm grösser. Innerhalb dieses Bereiches kommen möglicherweise andere Faktoren als $\Delta\lambda_{\max}$ stärker zum Tragen (vgl. 5.4.3).

Zu ii) Durch unterschiedliche optische Dichte der Zapfenpigmente innerhalb einer Retina kann die relative Empfindlichkeit der Rezeptoren verändert werden, so dass trotz identischer Absorptionsmaxima die Zapfenpigmente aufgrund ihrer unterschiedlichen optischen Dichte vom selben Reiz verschieden stark erregt werden und daher unterschiedliche Informationen an die postrezeptoralen Nervenzellen weiterleiten. Ebenso wie die unterschiedlichen Erregungszustände, die durch unterschiedliche Wellenlängen erzeugt werden, vergleicht das verarbeitende System die Erregungen, die durch unterschiedliche Pigmentdichten erzeugt wurden, miteinander. Dadurch kann allein durch variable Pigmentdichten der einzelnen Zapfen einer Retina eine bessere Farbdiskriminierung erzeugt werden. Der Effekt der optischen Dichte

soll vor allem bei kleinen $\Delta\lambda_{\max}$ zum Tragen kommen; bei grossen $\Delta\lambda_{\max}$ ist der Effekt schwach (Shevell & He 1995, Neitz et al. 1999).

Auch in dieser Arbeit fanden sich Probanden, bei denen die Farbdiskriminierung trotz zwei funktionell nahezu identischer Pigmente möglich war. Insbesondere fanden sich hier, entsprechend einer Arbeit von Neitz et al. (1999), mehrere Fälle von anomaler Trichromasie bei Genotypen, bei denen die beiden proximalen Opsingene sich nur im Exon 2 voneinander unterschieden. Da Exon 2 lediglich für eine spektrale Verschiebung des Absorptionsmaximums von höchstens 1 nm verantwortlich sein soll, ist eine Trichromasie in diesen Fällen kaum verständlich.

Ob die Aminosäure-Position 65 oder 116 für die spektrale Verschiebung verantwortlich ist, wird kontrovers diskutiert. Merbs & Nathans (1993) fanden einen spektralen Effekt der Aminosäure-Position 65 (vgl. Tabelle 2), und Asenjo et al. (1994) einen Effekt der Aminosäure-Position 116, aber keinen an der Aminosäure-Position 65. Die spektrale Verschiebung betrug jedoch in beiden Arbeiten nicht mehr als 1 nm. Da die Aminosäure an Position 116 nicht direkt mit dem Chromophor interagiert (vgl. 1.2.4.1), ist es aber eher unwahrscheinlich, dass diese Einfluss auf den spektralen Shift hat.

Neitz et al. (1999), denen bei der phänotypischen Ausprägung ihrer Probanden eine Assoziation mit der Aminosäure-Position 65 auffiel, vermuteten, dass die Aminosäurespezifität an dieser Stelle nicht zur spektralen Verschiebung, sondern vielmehr zur Stabilität des Pigmentes beitragen könnte. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind insofern übereinstimmend mit vorliegender Arbeit, als auch hier auffallend viele Probanden mit diesem Genotyp (dessen Opsingen-Paare sich nur im Exon 2 voneinander unterschieden) teilweise erstaunlich geringe *matching ranges* aufwiesen. Allerdings fiel bei diesen Probanden nicht nur die Aminosäure-Position 65 besonders auf: bis auf einen Fall (10053) unterschieden sich die Opsingen-Paare zwar an Aminosäure-Positionen 65, jedoch auch an den Positionen 111 und 116. Somit konnte die Farbdiskriminierung nicht alleine auf Aminosäure-Position 65 zurückgeführt werden. Dies ist mit der Vermutung von Neitz et al. (1999) zwar vereinbar, kann jedoch aufgrund der Unterschiede auch in den Aminosäuren an Positionen

111 und 116 diese These letztlich nicht untermauern. Der o.g. Proband 10053 (mit einem *matching range* von 8,1) zeigte an Aminosäure-Position 65 keinen Unterschied zwischen seinen beiden Pigmenten, sondern nur an Positionen 111 und 116, so dass in diesem Fall Aminosäure-Position 65 keine Rolle für sein erstaunlich gutes Farbdiskriminierungsvermögen gespielt hat. Andere mögliche Gründe für dieses Phänomen sind in 5.4.3 aufgeführt.

Zu iii) Es gibt in dieser und anderen Arbeiten sowohl *Single-Gen* Probanden als auch Probanden mit zwei funktionell identischen Pigmenten, die in gewissen Bereichen trichromatisch sehen konnten (s.o.). Dies lässt vermuten, dass die mögliche Variabilität in der optischen Dichte nicht allein auf Unterschiede in Exon 2 zurückzuführen ist. Es ist allerdings unklar, ob in den o.g. Fällen die optische Dichte überhaupt die entscheidende Einflussgrösse darstellt. Vielleicht waren auch instrumentelle Artefakte oder postrezeptorale Prozesse massgeblich (vgl. 5.4.3). Warum diese Probanden trichromatisch sehen konnten, ist zur Zeit nicht erklärbar.

Hurvich (1972) vermutete, dass die phänotypische Variabilität unter anomalen Trichromaten ein Hinweis für veränderte postrezeptorale Prozesse sein könnte. Diese Tatsache könnte erschwerend in die Geno-Phänotyp-Korrelation mit einfließen, wobei anhand der Ergebnisse dieser Arbeit keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob und in welchen Fällen veränderte postrezeptorale Prozesse einen Beitrag zur Anomalie leisten. Postrezeptorale Einflüsse könnten womöglich bei Fällen mit geringen $\Delta\lambda_{\max}$ der exprimierten Pigmente und unerwartet gutem trichromatischem Diskriminierungsvermögen einen Einfluss haben. Womöglich spielen gerade bei diesen Personen verstärkt Lernprozesse eine Rolle, denn je schlechter das Farbsehvermögen, desto wichtiger werden andere Mechanismen, die die schlechte Diskriminierungsfähigkeit kompensieren.

In dieser Arbeit fiel zudem bei Deuteranomalien eine noch nicht beschriebene Genvariante auf: Ein V236M-Austausch wurde in 5 ML-Hybridpigmenten und einem L-Pigment nachgewiesen. Ob und welche Bedeutung dies hat, ist unklar.

Es konnte anhand der geringen Probenzahl nicht beurteilt werden, welchen Einfluss dies möglicherweise auf das Farbdiskriminierungsvermögen der untersuchten Probanden haben könnte (vgl. 5.2.2).

Das Wissen um die Expressionsregulation des L/M-Opsingen-Clusters ist noch lückenhaft. Möglicherweise werden im Opsingen-Cluster auch weiter distal gelegene Gene exprimiert, so dass z.B. die zusätzliche Expression eines dritten Opsingens zu Variationen im Farbsehen und somit zu phänotypischen Unterschieden bei identischem Genotyp für das proximale Opsingen-Paar führen könnte oder gar zu einem tetrachromatischen Farbsehen. Bisherige Arbeiten zu diesem Thema haben keinen Zusammenhang zwischen Anzahl der Gene im Opsingen-Cluster und Diskriminierungsvermögen feststellen können (Knau et al. 2002). Auch in dieser Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen Anzahl der distalen Gene und Diskriminierungsfähigkeit festgestellt werden.

In früheren Arbeiten wurde durch cDNA-Untersuchungen gezeigt, dass drei oder mehr verschiedene Opsingene in der Retina exprimiert werden können (Sjoberg et al. 1998, Hagstrom et al. 2000), andere Untersucher stellten jedoch fest, dass nur zwei Gene in nennenswertem Umfang exprimiert werden (Deeb et al. 1992, Hayashi et al. 1999, 2001, Winderickx et al. 1992a). Man kann mit cDNA-Untersuchungen allerdings nicht bestimmen, ob Unterschiede in der Quantität der verschiedenen mRNA Transkripte auf der unterschiedlichen Anzahl von L- und M-Zapfen in der Retina beruhen oder ob sie mit der Menge des Pigmentes, welches in den L- und M-Zapfen synthetisiert wird, im Zusammenhang stehen. Durch Transkriptionsanalysen kann man die selektive Expression (welche Gene im Cluster werden exprimiert?) und die differentielle Transkription (werden L-Opsingene öfter als M-Opsingene in die Zapfen exprimiert?) untersuchen (vgl. 1.2.6), es fehlen jedoch systematische Analysen in Korrelation zum Phänotyp, da Retinapräparate nur post mortem zur Verfügung stehen.

Ein Opsingen-Cluster bestehend aus genau drei Genen, die sich voneinander unterscheiden, z. B. das erste ein L- das zweite ein M- und das dritte ein ML-Hybridgen und mit deuteranomalem oder deuteranopem Phänotyp würde

darauf hinweisen, dass auch das dritte Gen und nicht nur die ersten beiden Gene im Cluster exprimiert werden. Solch ein Opsingen-Cluster fand sich bei den hier untersuchten Probanden allerdings nicht.

Die Sachverhalte zur Expression der Pigmentgene werden derzeit weiter erforscht, und werden künftig noch mehr Klarheiten in die Geno-Phänotyp-Korrelation bringen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Nach heutigem Wissensstand sind in den meisten Fällen intra- oder intergene Rekombinationsereignisse für Rot-Grün-Farbsinnstörungen verantwortlich. Im ersten Fall entstehen Hybridgene, während im zweiten Fall *Single-Gen-Cluster* entstehen können. Nach der derzeitigen Vorstellung führen Opsingen-Cluster bestehend aus einem L-Gen und einem ML-Hybridgen zu Deutan-Defekten, solche bestehend aus einem LM-Hybridgen und einem M-Gen zu Protan-Defekten und *Single-Gen-Cluster* zu einer Dichromasie.

Hybridgene kodieren für Pigmente, deren Absorptionsmaxima zwischen denen der normalen L- und M-Gene liegen. Man nimmt an, dass die Schwere der Farbsinnstörung von der Differenz der Absorptionsmaxima ($\Delta\lambda_{\max}$) der exprimierten Pigmente abhängt. Mit abnehmender Differenz der Absorptionsmaxima verringert sich auch die Differenz zwischen den entsprechenden Zapfensignalen und somit dem Eingangssignal zum Rot-Grün-Gegenfarbenprozess; somit verschlechtert sich die Farbsinnstörung.

Um diese These genauer zu überprüfen, wurden 50 Probanden geno- und phänotypisch untersucht und die Ergebnisse miteinander korreliert. Es fanden sich 24 Probanden mit Protan-Defekten und 26 mit Deutan-Defekten. Dabei waren alle Protan-Defekte auf LM-Hybridgene zurückzuführen. Die Deutan-Defekte waren auf ML-Hybridgene oder *Single-Gen (L-Gen)-Cluster* zurückzuführen. Alle Protan-Defekte mit Multi-Gen-Clustern und L/M-Hybridformation im Intron 3 oder 4 waren mit Trichromasie, diejenigen mit Hybridbildung im Intron 2 mit Di- oder Trichromasie und diejenigen mit Hybridbildung im Intron 1 mit Dichromasie assoziiert. Alle Deutan-Defekte mit Multi-Gen-Clustern waren mit Trichromasie assoziiert.

Von acht Probanden mit *Single-Gen-Clustern* waren zwei keine Dichromaten; einer war extrem protanomal, der andere extrem deuteranomal. Ob diese Tatsache auf Inhomogenitäten in der Retina, unbekannte

Expressionsmechanismen oder andere unbekannte Faktoren zurückzuführen ist, ist bislang nicht geklärt. Bei einem Proband lagen zwei identische Opsingene vor; er war aber ebenso in der Lage, in gewissen Bereichen zu diskriminieren. Bei den Deutan-Defekten fiel in fünf Fällen eine V236M-Substitution auf; was dies für eine Bedeutung hat, ist unklar.

Des Weiteren wurden die Probanden bezüglich der C203R-Mutation untersucht, die auch für Farbsinnstörungen verantwortlich sein kann. Sie kam bei keinem der Probanden vor.

Ausserdem wurden Analysen zur Position des Hybridgens im Opsingen-Cluster durchgeführt. Dies ist nach der heutigen Technik nur bei Gen-Clustern von bis zu drei Opsingenen möglich. In der Probandenserie fand sich kein einziger Fall, bei dem das Hybridgen an letzter Stelle im Cluster lag. Geht man davon aus, dass nur die ersten beiden Gene exprimiert werden und Hybridgene für Farbsinnstörungen verantwortlich sind, waren somit die gefundenen distalen Hybridgene sehr wahrscheinlich an zweiter Stelle im Opsingen-Cluster gelegen und daher auch für die jeweilige Farbsinnstörung verantwortlich.

Es stellte sich heraus, dass das anhand des Genotypen errechnete $\Delta\lambda_{\max}$ der mutmasslich exprimierten Photopigment-Paare nicht streng mit dem Phänotyp der Farbsinnstörung korrelierte. Eine Zunahme von $\Delta\lambda_{\max}$ war generell mit einer verbesserten Farbdiskriminierung korreliert. Bei kleinem $\Delta\lambda_{\max}$ gab es jedoch erhebliche phänotypische Variationen. Hier fielen die Probanden, deren Pigmentgen-Paar sich genotypisch nur in Exon 2 unterschied, besonders auf. Sie bildeten die grösste Gruppe unter den Trichromaten. Die Unterschiede in Exon 2 sollten theoretisch eine Differenz der Absorptionsmaxima von maximal 1 nm verursachen. Die *matching ranges* nahmen aber die gesamte mögliche Bandbreite an. Es muss daher vermutet werden, dass Exon 2 eine andere Rolle bei der Bestimmung der Farbdiskriminierung einnimmt als nur einen spektralen Shift von maximal 1 nm zu bewirken. Vielleicht spielen Sequenzen in Exon 2 eine Rolle bei der Ausbildung der dreidimensionalen Struktur des

Pigments und beeinflussen damit auch die optische Dichte der Zapfepigmente. Unterschiedliche optische Dichte der Pigmente allein kann schon eine Farbdiskriminierung bewirken.

Aufgrund der grossen phänotypischen Variabilität bei Probanden gleichen Genotyps scheinen vor allem bei kleinem $\Delta\lambda_{\max}$ der Pigmente andere Mechanismen und Faktoren die Farbwahrnehmung zu beeinflussen. Hier spielen möglicherweise postrezeptorale Mechanismen, die optische Dichte der Pigmente oder auch regulatorische Mechanismen bei der Expression der Opsingene eine Rolle.

Variationen im Phänotyp scheinen somit nicht nur in Sequenzunterschieden der Opsingene begründet zu liegen. Daher lässt sich das genaue Ausmass von Rot-Grün-Farbsinnstörungen nicht durch Sequenzanalysen der Opsingene alleine bestimmen. Dies konnte durch vorliegende Arbeit gezeigt werden.

Zur Zeit werden die genauen Mechanismen der Expression im Opsingen-Cluster noch erforscht. In der Zukunft werden die Ergebnisse dieser Studien aufbauend auf der Genotyp-Phänotyp-Korrelation noch mehr Klarheit in die genetischen Ursachen der Rot/Grün-Farbsinnstörungen bringen.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Asenjo AB, Rim J, Oprian DD (1994) Molecular Determinants of Human Red/Green Color Discrimination. *Neuron* 12:1131-8

Balding SD, Sjöberg SA, Neitz J, Neitz M (1998) Pigment gene expression in protan color vision defects. *Vision Research* 38:3359-64

Baldwin JM (1993) The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *EMBO J* 12:1693-703

Berendschot TTJM, van de Kraats J, van Norren D (1996) Foveal cone mosaic and visual pigment density in dichromats. *Journal of Physiology* 492:307-14

Bollinger K, Bialozynski C, Neitz J, Neitz M (2001) The Importance of Deleterious Mutations of M-Pigment Genes as a Cause of Color Vision Defects. *Color Research and Application Supplement Volume* 26:100-5

Breton ME, Cowan WB (1981) Deuteranomalous color matching in the deuteranopic eye. *J Opt Soc Am* 71:1220-3

Caron MC, Lefkowitz RJ (1991) Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu Rev Biochem* 60:653-88

Chiu MI, Zack DJ, Wang Y, Nathans J (1994) Murine & bovine blue cone pigment genes: Cloning and characterization of two new members of the S family of visual pigments. *Genomics* 21:440-43

Cicerone CM, Nerger JL (1989) The relative numbers of long-wavelength-sensitive and middle-wavelength-sensitive cones in the human fovea centralis. *Vision Research* 19:115-28

Crognale MA, Teller DY, Motulsky AG, Deeb SS (1998) Severity of color vision defects: electroretinographic (ERG), molecular and behavioral studies. *Vision Research* 38:3377-85

Crognale MA, Teller DY, Yamaguchi T, Motulsky AG, Deeb SS (1999) Analysis of red/green color discrimination in subjects with a single X-linked photopigment gene. *Vision Research* 39:707-719

Cruz-Coke R (1964) *Colour blindness – an evolutionary approach*. Charles C Thomas, Springfield, Illinois.

Curcio CA, Allen KA, Sloan KR, Lerea CL, Hurley JB, Klock IB, Milam AH (1991) Distribution and morphology of human cone photoreceptors stained with anti-blue opsin. *Journal of Comparative Neurology* 312:610-24

Curcio CA, Sloan KR, Kalina RE, Hendrickson A (1990) Human photoreceptor topography. *J Comp Neurol* 292:497-523

Dartnall HJA, Bowmaker JK, Mollon JD (1983) Human visual pigments: microspectrophotometric results from the eyes of seven persons. *Proc Roy Soc Lond B* 220:115-30

Deeb SS, Alvarez A, Mallicki M, Motulsky AG (1995) Molecular patterns and sequence polymorphisms in the red and green visual pigment genes of Japanese men. *Hum Genet* 95:501-6

Deeb SS, Lindsey DT, Hibiya Y, Sanocki E, Winderix J, Teller DY, Motulsky AG (1992) Genotype-Phenotype Relationships in Human Red/Green Color-Vision Defects: Molecular and Psychophysical Studies. *American Journal of Human Genetics* 51:687-700

Deeb SS, Motulsky AG (1998) Disorders of color vision. In: Traboulsi EI (Hrsg.) *Genetic Diseases of the Eye*. Oxford University Press, Oxford, 303-325

Deeb SS, Hayashi T, Winderickx J, Yamaguchi T (2000) Molecular Analysis of Human Red/Green Visual Pigment Gene Locus: Relationship to Color Vision. *Methods in Enzymologie* 316:651-670

Dillon N, Grosveld F (1991) Human gamma-globin genes silenced independently of other genes in the beta-globin locus. *Nature* 350:252-4

Drummond-Borg M, Deeb SS, Motulsky AG (1989) Molecular patterns of X chromosome-linked color vision genes among 134 men of European ancestry. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86:983-7

Eysel U (1995) Sehen. In: Schmidt RF (Hrsg.) *Neuro- und Sinnesphysiologie*, 2. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 263-304

Feil R, Aubourg P, Helig R, Mandel JL (1990) A 195-kb cosmid walk encompassing the human Xp28 color vision pigment genes. *Genomics* 6:367-73

Fitzgibbon J, Appukuttan B, Gayther S, Wells D, Delhanty J, Hunt DM (1994) Localisation of the human blue cone pigment gene to chromosome band 7q31.3-32. *Human Genetics* 93:79-80

Fletcher R, Voke J (1985) *Defective colour vision: fundamentals, diagnosis and management*. Adam Hilger, Bristol

Fryxell KJ, Meyerowitz EM (1991) The evolution of rhodopsins and neurotransmitter receptors. *J Mol Evol* 33:367-78

Fung BKK, Hurley JB, Stryer L (1981) Flow of information in the light triggered cyclic nucleotide cascade of vision. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:152-6

Fung BKK, Stryer L (1980) Photolyzed rhodopsin catalyses the exchange of GTP for bound GDP in retinal rod outer segments. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:2500-4

Garth T (1933) The incidence of color-blindness among races. *Science* 77:333

Gouras P, Zrenner E (1981) Color Vision: A Review from a Neurophysiological Perspective. In: Ottoson (Hrsg.) *Progress in Sensory Physiology* Vol. 1. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 139-79

Hagstrom SA, Neitz M, Neitz J (2000) Cone pigment gene expression in individual photoreceptors and the chromatic topography of the retina. *J Opt Soc Am A* 17:527-37

Hanna MC, Platts JT, Kirkness EF (1997) Identification of a gene within the tandem array of red and green color pigment genes. *Genomics* 43:384-6

Hanscombe O, Vidal M, Kaeda J, Luzzatto L, Greaves DR, Grosveld F (1989) High-level, erythroid-specific expression of the human alpha-globin gene in transgenic mice and the production of human hemoglobin in murine erythrocytes. *Genes Dev* 3:1572-81

Hargrave PA, McDowell JH, Feldmann RJ, Atkinson PH, Rao JKM, Argos P (1984) Rhodopsin's protein and carbohydrate structure: selected aspects. *Vision Research* 24:1487-99

Hayashi T, Yamaguchi T, Kitahara K, Sharpe LT, Jägle H, Yamade S, Ueyama H, Motulsky AG, Deeb SS (2001) The Importance of Gene Order in Expression of the Red and Green Visual Pigment Genes and in Color Vision. *Color Res Appl* 26:79-83

Hayashi T, Motulsky AG, Deeb SS (1999) Position of a 'green-red' hybrid gene in the visual pigment array determines colour-vision phenotype. *Nature Genetics* 22:letter.

Hays TR, Lin SH, Eyring H (1980) Wavelength regulation in rhodopsin: Effects of dipoles and amino acid side chains. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:6314-8

He JC, Shevell SK (1995) Variation in color matching and discrimination among deuteranomalous trichromats: Theoretical implications of small differences in photopigments. *Vision Research* 35:2579-88

Helmholtz von HLF (1852) Über die Theorie der zusammengesetzten Farben. *Ann Phys Leipzig* 887:45-66

Hendley CD, Hecht S (1949) The colors of natural objects and terrains and their relation to visual color deficiency. *Journal of the Optical Society of America* 39:870-3

Hess RF, Mullen KT, Sharpe LT, Zrenner E (1989a) The photoreceptors in atypical achromatopsia. *Journal of Physiology* 417:123-49

Hess RF, Mullen KT, Zrenner E (1989b) Human photopic vision with only short wavelength cones: Postreceptoral properties. *Journal of Physiology* 417:150-69

Hisatomi O, Kayada S, Aoki Y, Iwasa T, Tokunaga F (1994) Phylogenetic relationships among vertebrate visual pigments. *Vision Res* 24(23):3097-102

Hurvich LM (1972) Color vision deficiencies. In: Jameson D & Hurvich LM (Hrsg.), *Handbook of sensory physiology, Vol. VII/4:Visual psychophysics*. Springer, Berlin, 582-624

Ibbotson RE, Hunt DM, Bowmaker JK, Mollon JD (1992) Sequence divergence and copy number of the middle- and long-wave photopigment genes in Old World monkeys. *Proc Roy Soc Lond B Biol Sci* 247:145-54

Inuma I, Handa Y (1976) A consideration of the racial incidence of congenital dyschromats in males and females. *Modern Problems in Ophthalmology* 17:151-7

Jacobs GH (1996) Primate photopigments and primate color vision. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:577-81

Jagla WM, Jägle H, Hayashi T, Sharpe LT, Deeb SS (2002) The molecular basis of dichromatic color vision in males with multiple red and green visual pigment genes. *Human Molecular Genetics* 11:23-32

Jorgensen AL, Deeb SS, Motulsky AG (1990) Molecular genetics of X chromosome-linked color vision among populations of African and Japanese ancestry: high frequency of a shortened red pigment gene among Afro-Americans. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:6512-6

Knau H, Kremers J, Schmidt HJ, Wolf S, Wissinger B, Sharpe LT (2002) M-cone opsin gene number does not correlate with variation in L/M-cone sensitivity. *Vision Res* 42(15):1888-96

Knau H, Sharpe LT (1998) Psychophysical estimates of cone pigment densities in dichromats & trichromats. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 38:S120

Knight JD, Li R, Botchan M (1991) The activation domain of the bovine papillomavirus E2 protein mediates association of DNA-bound dimers to form DNA loops. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 88:3204-8

Kropf A, Hubbard R (1958) The mechanism of bleaching rhodopsin. *Annals of the New York Academy of Science* 74:266-80

Lerea CL, Bunt-Milam AH, Hurley JB (1989) A transducin is present in blue-, green-, and red-sensitive cones photoreceptors in the human retina. *Neuron* 3:367-76

Lyon MF (1972) X-chromosome inactivation and developmental patterns in mammals. *Biological Review of the Cambridge Philosophical Society* 47:1-35

Lyon MF (1961) Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Musculus L.*). *Nature* 190:372

Lythgoe JN (1972) The adaptation of visual pigments to their photic environment. In: Dartnall, HJA (Hrsg.) *Handbook of Sensory Physiology, Volume VII/I, Photochemistry of vision.* Springer, Berlin, 566-603

Macke JP, Nathans J (1997) Individual variation in the size of the human red and green visual pigment gene array. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 38:1040-3

Mastrangelo IA, Courey AJ, Wall JS, Jackson SP, Hough PV (1991) Looping and Sp1 multimer links: A mechanism for transcriptional synergism and enhancement. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 88:5670-4

Mathies R, Stryer L (1976) Retinal has a highly dipolar vertically excited singlet state: implications for vision. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 73:2169-73

Maxwell JC (1855) *Experiments on colour, as perceived by the eye, with remarks on colourblindness.* *Trans Roy Soc Edinb* 21:275-98

Meagher MJ, Jorgensen AL, Deeb SS (1996) Sequence and evolutionary history of the length polymorphism in intron 1 of the human red pigment gene. *J Mol Evol* 43:622-30

Merbs SL, Nathans J (1992) Absorption Spectra of the Hybrid Pigments for Anomalous Color Vision. *Science* 258:464-6

Merbs SL, Nathans J (1993) Role of hydroxyl-bearing amino acids in differentially tuning the absorption spectra of the human red and green cone pigments. *Photochem Photobiol* 58:706-10

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Research* 16:1215

Miller SS (1972) Psychophysical estimates of visual pigment densities in red-green dichromats. *Journal of Physiology* 223:89-107

Mollon JD (1996) The evolution of trichromacy: an essay to mark the bicentennial of Thomas Young's graduation in Göttingen. In: Elsner, N, Schnitzler, HU (Hrsg.) *Brain and Evolution. Proceedings of the 24th Göttingen Neurobiology Conference 1996, Volume I.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 124-39

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*, 51:263-273

Nagy AL (1980) Large-field substitution Rayleigh matches of Dichromats. *J Opt Soc Am* 70:778-84

Nathans J (1987) Molecular biology of visual pigments. *Annu Rev Neurosci* 10:163-94

Nathans J, Davenport CM, Maumenee IH, Lewis RA, Hejtmancik JF, Litt M, Lovrien E, Weleber R, Bachynski B, Zwas F, Klingaman R, Fishman G. (1989) Molecular genetics of human blue cone monochromacy. *Science*, 245:831-8

Nathans J, Maumenee IH, Zrenner E, Sadowski B, Sharpe LT, Lewis RA, Hansen E, Rosenberg T, Schwartz M, Heckenlively JR, Traboulsi E, Klingaman R, Bech-Hansen NT, LaRoche GR, Pagon RA, Murphey WH, Weleber RG (1993) Genetic heterogeneity among blue-cone monochromats. *Am J Hum Genet* 53(5):987-1000

Nathans J, Piantanida TP, Eddy RL, Shows TB, Hogness DS (1986b) Molecular genetics of inherited variation in human color vision. *Science* 232:203-10

Nathans J, Sung CH, Weitz CJ, Davenport CM, Merbs SL, Wang Y (1992) Visual pigments and inherited variation in human vision. *Soc Gen Physiol Ser.* 47:109-31

Nathans J, Thomas D, Hogness DS (1986a) Molecular Genetics of Human Color Vision: The genes encoding blue, green, and red pigments. *Science* 232:193-202

Nei M, Zhang J, Yokoyama S (1997) Color vision of ancestral organisms of higher primates. *Mol Biol Evol* 14:611-8

Neitz J, Carroll J, Neitz M (2001) Almost Reason Enough for Having Eyes. *Optics and Photonics News*, 26-33

- Neitz J, Jacobs GH (1989) Polymorphism of cone pigments in colour normals: evidence from colour matching. In: Verriest G, Drum B (Hrsg.) *Colour Vision Deficiencies IX*. Kluwer, Dordrecht, 27-34
- Neitz J, Neitz M, He JC, Shevell SK (1999) Trichromatic color vision with only two spectrally distinct photopigments. *Nature Neuroscience* 2(10), 884-8
- Neitz M, Neitz J (1995) Numbers and ratios of visual pigment genes for normal red-green color vision. *Science* 267:1013-6
- Neitz M, Neitz J (1998) Molecular genetics and the biological basis of color vision. In: Backhaus WGK, Kliegel R, Werner JS (Hrsg.) *Color vision: perspectives from different disciplines*. Walter de Gruyter, Berlin, 101-19
- Neitz M, Neitz J (2000) Molecular Genetics of Color Vision and Color Vision Defects. *Archives of Ophthalmology* 118:691-700
- Neitz M, Neitz J, Grishok A (1995) Polymorphism in the number of genes encoding long-wavelength-sensitive cone pigments among males with normal color vision. *Vision Research* 35:2395-407
- Neitz M, Neitz J, Jacobs GH (1991) Spectral tuning of pigments underlying red-green color vision. *Science* 252:971-4
- Neitz M, Neitz J, Jacobs GH (1995) Genetic Basis of Photopigment Variations in Human Dichromats. *Vision Reserch* 35:2095-2103
- Oprian DD, Asenjo AB, Lee N, Pelleier SL (1991) Design, chemical synthesis and expression for three human color vision pigments. *Biochemistry* 30:11367-72
- Pokorny J, Smith VC, Verriest G, Pinckers AJLG (1979) *Congenital and Acquired Color Vision Defects*. Grune and Stratton, New York
- Pokorny J, Smith VC, Went LN (1981) Color matching in autosomal dominant tritan defect. *Journal of the Optical Society of America* 71:1327-34
- Pokorny J, Smith VC, Wesner M (1991) Variability in cone populations and implications. In: Valberg A, Lee BB (Hrsg.) *From Pigments to Perception*. Plenum, New York, 23-34
- Pugh EN, Lamb TD (1993) Amplification and kinetics of the activation steps in phototransduction. *Biochim Biophys Acta* 1141:111-49
- Rayleigh Lord (Strutt, RJ) (1881) Experiments on colour. *Nature* 25:64-6

Regan BC, Reffin JP, Mollon JD (1994) Luminance noise and the rapid determination of discrimination ellipses in colour deficiency. *Vision research* 34:1279-99

Reichel E, Bruce AM, Sandberg MA, Berson EL (1989) An electroretinographic and molecular genetic study of X-linked cone degeneration. *American Journal of Ophthalmology* 108:540-7

Reitner A, Sharpe LT, Zrenner E (1991) Is colour vision possible with only rods and blue-sensitive cones? *Nature* 352:798-800

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-91

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74(12):5463-7

Sharpe LT, Nordby K (1990) Total colour-blindness: an introduction, Chapter 7. In: Hess RF, Sharpe LT, Nordby K (Hrsg) *Night Vision: Basic, Clinical and Applied Aspects*. Cambridge University Press, Cambridge, 253-89

Sharpe LT, Stockman A, Jägle H, Knau H, Klausen G, Reitner A, Nathans J (1998) Red, Green, and Red-Green Hybrid Pigments in the Human Retina: Correlations between Deduced Protein Sequences and Psychophysically Measured Spectral Sensitivities. *The Journal of Neuroscience* 18(23):10053-69

Sharpe LT, Stockman A, Jägle H, Knau H, Nathans J (1999a) L, M and L-M hybrid cone photopigments in man: deriving λ_{max} from flicker photometric spectral sensitivities. *Vision Research* 39:3513-25

Sharpe LT, Stockman A, Jägle H, Nathans J (1999b) Opsin genes, cone photopigments, color vision and color blindness, Chapter 1. In: Gegenfurtner, K., Sharpe, L.T. (Hrsg.) *Color Vision: from genes to perception*. Cambridge University Press, Cambridge, 3-52

Shevell SK, He JC (1995) Phenotypes of anomalous trichromacy. In: Cavonius, CR (Hrsg.) *Color Vision Deficiencies XIII*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 45-58

Shevell SK, He JC (1997) The visual photopigments of simple deuteranomalous trichromats inferred from color matching. *Vision Res* 37:1115-27

Shyue SK, Hewett-Emmett D, Sperling HG, Hunt DM, Bowmaker JK, Mollon JD, Li, WH (1995) Adaptive evolution of color vision genes in higher primates. *Science* 269:1265-7

Sjoberg SA, Neitz M, Balding SD, Neitz J (1998) L-cone pigment genes expressed in normal colour vision. *Vision Research* 18:3213-9

Smith VC, Pokorny J (1973) Psychophysical estimates of optical density in human cones. *Vision Research* 13:1199-202

Stryer L (1996) *Biochemie*. 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

Tovee MJ (1994) The molecular genetics and evolution of primate colour vision. *Trends Neurosci* 17:30-7

Ueyama H, Li YH, Fu GL, Lertrit P, Atchaneeyasakul LO, Oda S, Tanabe S, Nishida Y, Yamade S, Ohkubo I (2003) An A-71C substitution in a green gene at the second position in the red/green visual-pigment gene array is associated with deutan color vision deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(6):3357-62

Vollrath D, Nathans J, Davis RW (1988) Tandem array of human visual pigment genes at Xq28. *Science* 240:1669-72

Van de Merendonk S, Went LN (1980) Two cases of inherited deutan and tritan disturbances in the same person, and a study of their family. In: Verriest G (Hrsg.) *Colour Vision Deficiencies V*. Adam Hilger, Bristol, 268-72

Van Norren D, Went LN (1981) New test for the detection of tritan defects evaluated in two surveys. *Vision Research* 21:1303-6

Waardenburg PJ (1963) Achromatopsia congenita. In: Franceschetti A, Klein D (Hrsg) *Genetics and Ophthalmology*, Vol II. Royal van Gorcum, Assen, The Netherlands, 1695-718

Wald G (1968) The molecular basis of visual excitation. *Nature* 219:800-7

Wang Y, Macke JP, Merbs SL, Zack DJ, Klaunberg B, Bennett J, Gearhart J, Nathans J (1992) A locus control region adjacent to the human red and green visual pigment genes. *Neuron* 9:429-40

Watson S, Arkinstall S (1994) *The G-protein Linked Receptor Facts Book*. Academic, London

Winderickx J, Battisti L, Hibiya Y, Motulsky AG, Deeb SS (1993) Haplotype diversity in the human red and green opsin genes: evidence for frequent exchange in exon 3. *Human Molecular Genetics* 2(9):1413-21

Winderickx J, Battisti L, Motulsky AG, Deeb SS (1992a) Selective expression of human X chromosome-linked green opsin genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 89:9710-4

Winderickx J, Sanocki E, Lindsey DT, Teller DY, Motulsky AR, Deeb SS (1992b) Defective colour vision associated with a missense mutation in the human green visual pigment gene. *Nature Genet* 1:251-5

Wissinger B, Sharpe LT (1998) Genetics of Perception '98. New Aspects of an Old Theme: The Genetic Basis of Human Color Vision. *American Journal of Human Genetics* 63:1257-62

Wolf C (2002) Photopigmentgene: Der Einfluss von Variabilitäten der codierenden Sequenzen auf Farbsehdefekte. Biol. Diplomarbeit, Universität Würzburg

Wolf S, Sharpe LT, Knau H, Wissinger B (1998) Numbers and ratios of X-chromosomal- linked opsin genes. *Vision Research* 38:3227-31

Wolf S, Sharpe LT, Schmidt H-J, Knau H, Weitz S, Kioschis P, Poustka A, Zrenner E, Lichter P, Wissinger B (1999) Direct visual resolution of gene copy number in the human photopigment gene array. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 (7):1585-9

Wright WD (1946) Researches on normal and defective colour vision. Henry Kimpton, London

Yamaguchi T, Motulsky AG, Deeb SS (1997) Visual pigment gene structure and expression in human retinae. *Human Molecular Genetics* 6(7):981-90

Yokoyama S, Starmer WT, Yokoyama R (1993) Paralogous origin of the red- and green-sensitive visual pigment genes in vertebrates. *Molecular Biology and Evolution* 10:527-38

Yokoyama S, Yokoyama R (1989) Molecular evolution of human visual pigment genes. *Mol Biol Evol* 6:186-97

Zrenner E (1983) Neurophysiological aspects of color mechanisms in the primates: Comparative studies on simian retinal ganglion cells and the human visual system. Monograph. *Studies of Brain Function Vol. 9*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo

Zrenner E, Gouras P (1981) Characteristics of the blue sensitive cone mechanism in primate retinal ganglion cells. *Vision Research* 21:1605-9

Genotyp	Sharpe et al. (1998)	Merbs&Nathans (1992)	Asenjo et al. (1994)
S	418,9	426,3	424
L (ser), M1L2 (ser)	560,3	556,7	563
L (ala), M1L2 (ala)	557,9	552,4	556
L1M2 (ala), M (ala)	527,8	529,7	532
L2M3 (ala)	528,5	529,5	532
L3M4 (ser)	531,5	533,3	534
L4M5 (ala)	535,4	531,6	-
L4M5 (ser)	534,2	536	538
M (ala)	527,8	529,7	532
M1L2 (ser)	560,3	556,7	563
M1L2 (ala)	557,9	552,4	556
M2L3 (ala)	-	549,6	-
M2L3 (ser)	-	553	559
M3L4, M3L4 (ala)	-	548,8	555
M4L5, M4L5 (ala)	-	544,8	551

errechnete Werte

M4L5 (ser)	-	548,8	555
M (ser), L1M2 (ser)	531,8	533,9	536
L (M4, ser)	558,3	554,7	561
L4M5 (ala, thr230)	536,4	532,6	-

Tab. 1: Absorptionsmaxima der verschiedenen Photopigmente, ermittelt durch *in vivo* und *in vitro* Versuchen von o.g. Arbeitsgruppen. Für Hybridgene, die nicht untersucht wurden und die in dieser Arbeit gefunden wurden, wurden die Werte anhand der bekannten Absorptionsmaxima und spektralen Shifts errechnet.

DNA-Nummer	Gesamtgenanzahl
10090	3
10094	5
10106	4
10108	4
10155	6
10159	5
10161	1
10169	3
10171	3
10181	3
10183	3
10185	3
10191	4
10193	3
10209	4
10219	7
10221	6
10223	1
10227	8
10229	3
10257	3
10259	1
10261	3
10325	4

Tab. 3: Zusammenfassung der mittels SSCP geschätzten Gesamtzahl der Opsingene der Probanden mit Protan-Defekten

DNA-Nummer	Gesamtgenanzahl
10053	5
10055	1
10086	4
10088	2
10110	3
10151	2
10153	4
10157	5
10163	4
10165	4
10167	3
10173	3
10175	4
10177	4
10179	1
10187	1
10189	4
10207	4
10211	4
10213	3-4
10215	4
10217	4
10225	1
10255	4
10263	1
10265	7

Tab. 4: Zusammenfassung der mittels SSCP geschätzten Gesamtzahl der Opsingene der Probanden mit Deutan-Defekten

DNA-Nr.	erstes Gen								Grüngen							
	ile65tyr	val111ile	tyr116ser	ala180ser	thr230ile	ser233ala	val236met	phe277tyr	ile65tyr	val111ile	tyr116ser	ala180ser	thr230ile	ser233ala	val236met	phe277tyr
10090	ile	val	tyr	ala	thr	ser	val	phe	ile	val	tyr	ala	thr	ser	val	phe
10094	ile	val	tyr	ala	thr	ser	val	phe	ile	val	tyr	ala	thr	ser	val	phe
10106	thr	ile	ser	ala	thr	ala	met	phe	ile	val	tyr	ala	thr	ser	val	phe
10108	thr	ile	ser	ser	ile	ala	met	phe	ile	val	tyr	ala	thr	ser	val	phe
10155	thr	ile	ser	ala	thr	ser	val	phe	ile	val	tyr	ala	thr	ser	val	phe
10159	thr	ile	ser	ser	thr	ser	val	phe	ile	val	tyr	ala	thr	ser	val	phe
10161	thr	ile	ser	ala	thr	ser	val	phe	-	-	-	-	-	-	-	-
10169	thr	ile	ser	ala	thr	ser	val	phe	ile	val	tyr	ala	thr	ser	val	phe
10171	thr	ile	ser	ser	ile	ala	met	phe	ile	val	tyr	ser	thr	ser	val	phe
10181	thr	ile	ser	ala	thr	ser	val	phe	ile	val	tyr	ala	thr	ser	val	phe
10183	thr	ile	ser	ala	ile	ala	met	phe	ile	val	tyr	ala	thr	ser	val	phe
10185	thr	ile	ser	ala	thr	ser	val	phe	ile	val	tyr	ala	thr	ser	val	phe
10191	thr	ile	ser	ser	ile	ala	met	phe	ile	val	tyr	ala	thr	ser	val	phe
10193	thr	ile	ser	ala	thr	ser	val	phe	ile	val	tyr	ala	thr	ser	val	phe
10209	thr	ile	ser	ala	thr	ser	val	phe	ile	val	tyr	ala	thr	ser	val	phe
10219	thr	ile	ser	ala	ile	ala	met	phe	ile	val	tyr	ala	thr	ser	val	phe
10221	thr	ile	ser	ala	ile	ala	met	phe	ile	val	tyr	ala	thr	ser	val	phe
10223	thr	ile	ser	ser	thr	ser	val	phe	-	-	-	-	-	-	-	-
10227	thr	ile	ser	ala	thr	ser	val	phe	ile	val	tyr	ala	thr	ser	val	phe
10229	thr	ile	ser	ala	ile	ala	met	phe	ile	val	tyr	ala	thr	ser	val	phe
10257	thr	ile	ser	ser	ile	ala	met	phe	ile	val	tyr	ala	thr	ser	val	phe
10259	thr	ile	ser	ala	thr	ser	val	phe	-	-	-	-	-	-	-	-
10261	ile	val	tyr	ser	thr	ser	val	phe	ile	val	tyr	ser	thr	ser	val	phe
10325	thr	ile	ser	ala	thr	ser	val	phe	ile	val	tyr	ala	thr	ser	val	phe

Tab. 5: Sequenzanalysen der Opsingene bei Probanden mit Protan-Defekten. Untersucht wurden die Aminosäurecodons an Positionen 65, 111, 116, 180, 230, 233, 236. Die Position 277 wurde durch LR-PCR ermittelt.

DNA-Nr.	erstes Gen								Hybridgen							
	ile65thr	val111ile	tyr116ser	ala180ser	thr230ile	ser233ala	val236met	phe277tyr	ile65thr	val111ile	tyr116ser	ala180ser	thr230ile	ser233ala	val236met	phe277tyr
10053	thr	ile	ser	ser	ile	ala	met	tyr	thr	val	tyr	ser	ile	ala	met	tyr
10055	thr	ile	ser	ser	ile	ala	met	tyr	-	-	-	-	-	-	-	-
10086	thr	ile	ser	ala	ile	ala	met	tyr	ile	val	tyr	ala	thr	ser	val	tyr
10088	thr	ile	ser	ala	ile	ala	met	tyr	ile	val	tyr	ala	thr	ser	val	tyr
10110	thr	ile	ser	ala	ile	ala	met	tyr	ile	val	tyr	ala	ile	ala	met	tyr
10151	thr	ile	ser	ser	thr	ser	val	tyr	ile	val	tyr	ala	thr	ser	val	tyr
10153	thr	ile	ser	ala	ile	ala	met	tyr	ile	val	tyr	ser	ile	ala	val	tyr
10157	thr	ile	ser	ala	ile	ala	met	tyr	ile	val	tyr	ala	thr	ser	val	tyr
10163	thr	ile	ser	ala	ile	ala	met	tyr	ile	val	tyr	ser	ile	ala	val	tyr
10165	thr	ile	ser	ala	ile	ala	met	tyr	ile	val	tyr	ala	ile	ala	val	tyr
10167	thr	ile	ser	ser	ile	ala	met	tyr	ile	val	tyr	ala	ile	ala	met	tyr
10173	thr	ile	ser	ser	ile	ala	met	tyr	ile	val	tyr	ala	ile	ala	met	tyr
10175	thr	ile	ser	ala	ile	ala	met	tyr	ile	val	tyr	ala	ile	ala	met	tyr
10177	thr	ile	ser	ala	ile	ala	met	tyr	ile	val	tyr	ala	ile	ala	met	tyr
10179	thr	ile	ser	ala	ile	ala	met	tyr	-	-	-	-	-	-	-	-
10187	thr	ile	ser	ser	ile	ala	met	tyr	-	-	-	-	-	-	-	-
10189	thr	ile	ser	ser	ile	ala	met	tyr	thr	ile	ser	ser	ile	ala	met	tyr
10207	thr	ile	ser	ala	ile	ala	met	tyr	ile	val	tyr	ala	ile	ala	met	tyr
10211	thr	ile	ser	ala	ile	ala	met	tyr	ile	val	tyr	ala	thr	ser	val	tyr
10213	thr	ile	ser	ala	ile	ala	met	tyr	ile	val	tyr	ala	ile	ala	val	tyr
10215	thr	ile	ser	ala	ile	ala	met	tyr	ile	val	tyr	ala	ile	ala	met	tyr
10217	thr	ile	ser	ser	ile	ala	met	tyr	ile	val	tyr	ala	ile	ala	met	tyr
10225	thr	ile	ser	ser	ile	ala	met	tyr	-	-	-	-	-	-	-	-
10255	thr	ile	ser	ala	ile	ala	val	tyr	ile	val	tyr	ala	ile	ala	val	tyr
10263	thr	ile	ser	ser	ile	ala	met	tyr	-	-	-	-	-	-	-	-
10265	thr	ile	ser	ser	ile	ala	met	tyr	ile	val	tyr	ser	ile	ala	met	tyr

Tab. 6: Sequenzanalysen der Opsingene bei Probanden mit Deutan-Defekten, untersucht wurden die Aminosäurecodons an Positionen 65, 111, 116, 180, 230, 233, 236. Position 277 wurde durch LR-PCR ermittelt.

DNA-Nr.	Oculus diagn.	Range	MIDRG	Slope
10090	P	73	-	32,8
10094	P	73	-	32,5
10106	PA	18,3	63,3	-
10108	PA	6	62	-
10155	XP	40	43	24,4
10159	PA	5	66,5	-
10161	XP	70	-	36,2
10169	XP	23	54,5	12,5
10171	XP	47	34,5	21
10181	PA	3	65,5	-
10183	PA	5,5	59	-
10185	PA	4	50	-
10191	PA	17,7	53,85	-
10193	P	73	-	38,3
10209	XP	59,3	35,35	30
10219	PA	7	60,5	-
10221	PA	10	58	-
10223	P	73	-	29,5
10227	XP	22,1	51,05	14,9
10229	PA	8,6	61,3	-
10257	XP	16	54	5
10259	P	73	-	29,9
10261	P	73	-	13

Tab. 7: Zusammenfassung der mit dem Oculus HMC Anomaloskop ermittelten Daten der Probanden mit Protan-Defekten. P=Protanop, XP=extrem Protanomal, PA=Protanomal, Range=matching range, MIDRG=Midpoint, Slope=Steigung der Regressionsgeraden.

DNA-Nr.	Oculus diagn.	Range	MIDRG	Slope
10053	DA	8,1	24	-
10055	D	73	-	3,3
10086	DA	6	19	-
10088	DA	0	18	-
10110	DA	18,9	22,3	-
10151	DA	5,4	22,6	-
10153	XD	41,5	27,05	6,2
10157	DA	2,3	20,65	-
10163	XD	12,6	34,6	0,6
10165	XD	27,5	24,05	1
10167	DA	6,3	23,15	-
10173	DA	1	19,5	-
10175	DA	5	22,5	-
10177	DA	25,2	19,2	-
10179	D	73	-	8,1
10187	XD	64	34,5	-
10189	XD	61	30,5	2,5
10207	DA	6	14	-
10211	DA	2	18	-
10213	DA	9	17,5	-
10215	DA	7,5	23,25	-
10217	DA	1	16,5	-
10225	D	73	-	2,6
10255	XD	30	25	-
10263	D	73	-	1
10265	DA	3,7	12,15	-

Tab. 8: Zusammenfassung der mittels Oculus HMC Anomaloskop ermittelten Daten der Probanden mit Deutan-Defekten. D=Deutanop, XD=extrem Deutanomal, DA=Deutanomal, Range=matching range, MIDRG=Midpoint, Slope=Steigung der Regressionsgeraden.

DNA-Nr.	geschätzte $\Delta\lambda_{max}$ -Werte		
	Sharpe et al. (1998)	Merbs&Nathans (1992)	Asenjo et al. (1994)
10090	0,0	0	0
10094	0,0	0	0
10106	6,6	0,9	-
10108	6,4	6,3	6
10155	0,7	0,2	0
10159	3,7	3,6	2
10161	-	-	-
10169	0,7	0,2	0
10171	2,4	1,9	2
10181	0,7	0,2	0
10183	7,6	1,9	-
10185	0,7	0,2	0
10191	6,4	6,3	6
10193	0,7	0,2	0
10209	0,7	0,2	0
10219	7,6	1,9	-
10221	7,6	1,9	-
10223	-	-	-
10227	0,7	0,2	0
10229	7,6	1,9	-
10257	6,4	6,3	6
10259	-	-	-
10261	0,0	0	0
10325	0,7	0,2	0

Tab. 9: Anhand der ermittelten Genotypen geschätzte $\Delta\lambda_{max}$ -Werte der Probanden mit Protan-Defekten aus Arbeiten von Sharpe et al. 1998, Merbs&Nathans 1992, Asenjo et al. 1994 (Tab. 1).

DNA-Nr.	geschätzte $\Delta\lambda_{max}$ -Werte		
	Sharpe et al. (1998)	Merbs&Nathans (1992)	Asenjo et al. (1994)
10053/ 54	0,0	0,00	0,00
10055/ 56	-	-	-
10086/ 87	-	7,60	5,00
10088/ 89	-	7,60	5,00
10110/ 11	-	3,60	1,00
10151/ 52	-	9,90	10,00
10153/ 54	-	0,60	3,00
10157/ 58	-	7,60	5,00
10163/ 64	-	0,60	3,00
10165/ 66	-	3,60	1,00
10167/ 68	-	7,90	8,00
10173/ 74	-	7,90	8,00
10175/ 76	-	3,60	1,00
10177/ 78	-	3,60	1,00
10179/ 80	-	-	-
10187/ 88	-	-	-
10189/ 90	0,0	0,00	0,00
10207/ 08	-	3,60	1,00
10211/ 12	-	7,60	5,00
10213/ 14	-	3,60	1,00
10215/ 16	-	3,60	1,00
10217/ 18	-	7,90	8,00
10225/ 26	-	-	-
10255/ 56	-	3,60	1,00
10263/ 64	-	-	-
10265/ 66	-	3,70	4,00

Tab. 10: Anhand der ermittelten Genotypen geschätzte $\Delta\lambda_{max}$ -Werte der Probanden mit Deutan-Defekten aus Arbeiten von Sharpe et al. 1998, Merbs&Nathans 1992, Asenjo et al. 1994 (Tab. 1).



Abb. 10: Opsingen-Cluster der Probanden mit Protan-Defekten. Dargestellt sind nur die vermuteten ersten beiden Gene. Weitere distale Gene blieben unberücksichtigt. Die farbige Darstellung der einzelnen Exons bezieht sich auf die untersuchten Codons-Triplets. Bei Proben 10155 und 10209 sind zwei distale Gene angegeben, hier ist nicht klar, welches der beiden exprimiert wird. Ein Exon entspricht einem Kästchen, eine Gruppe mit sechs Kästchen stellt ein Gen dar. Rot=Codon-Triplets, die typischerweise in L-Genen vorkommen, grün= Codon-Triplets, die typischerweise in M-Genen vorkommen.



Abb. 11: Opsingen-Cluster der Probanden mit Deutan-Defekten. Dargestellt sind nur die vermutlich ersten beiden Gene, distale M-Gene blieben unberücksichtigt. Die farbige Darstellung der einzelnen Exons bezieht sich auf die untersuchten Codon-Triplets.

Ein Exon entspricht einem Kästchen, eine Gruppe mit sechs Kästchen stellt ein Gen dar.

Rot=Codon-Triplets, die typischerweise in L-Genen vorkommen, grün= Codon-Triplets, die typischerweise in M-Genen vorkommen.

DANKSAGUNG

Zuallererst möchte ich Herrn Prof. Sharpe, der mittlerweile an der University of Newcastle tätig ist, für die Überlassung des Themas danken. Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Zrenner, ärztlicher Direktor der Universitäts-Augenklinik Tübingen, Abteilung II, für die Übernahme der Arbeit als Doktorvater und der Erstellung des Gutachtens.

Mein herzlichster Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Bernd Wissinger, Leiter der AG im molekulargenetischen Labor der Abt. II der Universitäts-Augenklinik Tübingen für die wertvolle Hilfe bei der schriftlichen Fertigung dieser Dissertation. Ausserdem danke ich ihm für die Bereitstellung der Einrichtungen im Labor.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. Wolfgang Jagla für seine grosse Unterstützung vor allem in den Anfängen dieser Arbeit und bei der Einführung in die Labortechniken.

Weiterhin danke ich Christiane Wolf; wir haben mit viel Spass im Labor zusammengearbeitet und auch einen guten wissenschaftlichen Austausch über das Thema gehabt.

Natürlich danke ich auch den weiteren Mitgliedern der AG Wissinger für praktische Hinweise, der DNA-Aufbereitung der Blutproben und der Bearbeitung der Sequenzierproben.

Vielen Dank den Probanden für das bereitwillige Mitmachen bei den Untersuchungen.

Der Arbeitsgruppe aus Ungarn danke ich herzlich für die Rekrutierung der Probanden, deren Phänotypisierung und der Verschickung ihrer Blutproben ins Tübinger Labor zur DNA-Analyse.

Besonderer Dank gilt meinem Freund Rüdiger Schmid, der mir vor allem gegen Ende dieser Arbeit eine grosse Unterstützung war und mir viele wichtige Hinweise geben konnte.

Zuallerletzt möchte ich meiner Mutter meinen tiefsten Dank aussprechen. Sie hat mir dieses Studium überhaupt erst ermöglicht und mich zu jeder Zeit unterstützt.

LEBENS LAUF

TANJA BREITSPRECHER

Geboren: 04.10.1971 in Berlin

SCHULBILDUNG

1976 bis 1978
1978 bis 1980
1980
1980 bis 1983
1983 bis 1992
1992

Grundschule Glasgow, Schottland
Grundschule Oxford, England
Grundschule Pasadena, Kalifornien
Grundschule Mannheim
Lessing-Gymnasium Mannheim
Abitur

BERUFS AUSBILDUNG/BERUFS PRAXIS

1993 bis 1996

1996
1996 bis 1997
seit 05/2004

Ausbildung zur medizinisch-technischen Assistentin (MTA)
in Tübingen
Staatsexamen zur MTA
MTA im Max-Planck-Institut für Immunogenetik
Ärztin im BKH-Günzburg

STUDIUM

1997
1999
2000
2002
10 bis 11/2002
07.11.2003

Medizinstudium in Tübingen
Ärztliche Vorprüfung
Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Praktisches Jahr im Städtischen Klinikum Esslingen
Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

PUBLIKATION

05/2003

Jagla, W., Breitsprecher, T., Kucsera, I., Kovacs, G.,
Wissinger, B., Deeb, S. S. & Sharpe, L. T. Hybrid Pigment
Genes, Dichromacy and Anomalous Trichromacy. In: Mollon,
J. D., Pokorny, J., Knoblauch, K., eds. *Normal and Defective
Colour Vision*. Oxford: Oxford University Press; 2003:307-317

NEBENTÄTIGKEIT

2000 bis 2003

Wissenschaftliche Mitarbeit im molekularbiologischen Labor
der Universitäts-Augenklinik, Tübingen