

Molekulare Ursachen der X-chromosomalen kongenitalen Nachtblindheit

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)
am Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Christina Zeitz
Hanau/Main

Zürich
Oktober 2003

Für meine Eltern

Christa und Rüdiger Zeitz

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	8
1 EINLEITUNG	12
1.1 Das visuelle System	12
1.1.1 Die Anatomie des menschlichen Auges	12
1.1.2 Die Netzhaut	14
1.1.3 Ophthalmologische Untersuchungen der Netzhaut	16
1.1.4 Die Biochemie der Sehkaskade	17
1.2 Hereditäre Netzhauterkrankungen	20
1.2.1 Diagnostik und Therapie vererbter Netzhauterkrankungen	23
1.2.2 Kongenitale stationäre Nachtblindheit	25
1.2.2.1 Klinische Befunde der CSNB1	26
1.2.2.2 Genetische Kartierung des CSNB1-Lokus	28
1.3 Zielsetzung der Arbeit	31
2 MATERIAL UND METHODEN	32
2.1 Material	32
2.1.1 Verbrauchsmaterialien und Kits	32
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien	32
2.1.3 Zellkultur-Materialien	34
2.1.4 Radiochemikalien	34
2.1.5 Enzyme	34
2.1.6 Antibiotika	35
2.1.7 Längenstandards	35
2.1.8 Bakterienstämme	35
2.1.9 Säugertierzellen	35
2.1.10 Vektoren	36
2.1.11 Artifizielle Chromosomen Bibliotheken	36
2.1.12 Antikörper und Marker	36
2.1.13 Apparaturen	36
2.1.14 Puffer und Lösungen	37
2.1.14.1 Bakterienmedien	37
2.1.14.2 DNA Puffer und Lösungen	37
2.1.14.3 RNA Puffer und Lösungen	38
2.1.14.4 Protein Puffer und Lösungen	39
2.1.14.5 Elektrophoresepuffer	39
2.1.14.6 SSCP-Analyse Lösungen	40
2.1.14.7 Lösungen für die Southern-Blot Analyse	40
2.1.14.8 Lösungen für die radioaktive Markierung und Hybridisierung	40
2.1.14.9 Lösungen für SDS-PAGE Gele und für Western-Blot Analyse	40
2.1.14.10 Färbungslösungen	41
2.1.14.11 Lösungen für die Antikörper Affinitätsaufreinigung	41
2.1.14.12 Lösungen für die 2D-Gelelektrophorese	42
2.1.14.13 Lösungen für die Immunfluoreszenzanalyse	42
2.2 Methoden	43
2.2.1 Allgemeine molekularbiologische Verfahren	43

2.2.1.1	Isolierung von DNA	43
2.2.1.1.1	Isolierung genomischer DNA aus Blut	43
2.2.1.1.2	Isolierung genomischer DNA aus Zellpellets	43
2.2.1.1.3	Isolierung von Plasmid, BAC- und PAC-DNA	43
2.2.1.1.4	Isolierung von Gesamt-Hefe-DNA	44
2.2.1.1.5	Isolierung von YAC-DNA durch Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	44
2.2.1.1.5.1	Präparation von Agarose-Blöckchen für die PFGE	44
2.2.1.1.5.2	Elektrophoretische Trennung der Agarose Blöckchen	45
2.2.1.1.5.3	YAC-DNA-Isolierung	45
2.2.1.2	Generierung von Amplikons	45
2.2.1.2.1	YAC-DNA-Verdau	45
2.2.1.2.2	Adapter Ligation	45
2.2.1.2.3	Adapter Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	46
2.2.1.3	Southern-Blot Analyse	46
2.2.1.4	RNA Isolierung aus Mausgeweben	46
2.2.1.4.1	Isolierung von Gesamt-RNA	46
2.2.1.4.2	Isolierung von Poly(A) ⁺ -RNA	47
2.2.1.5	Northern-Blot Analyse	47
2.2.1.6	Radioaktive Markierung von DNA-Proben	48
2.2.1.6.1	Markierung	48
2.2.1.6.2	Aufreinigung der markierten Probe und Präassoziation	49
2.2.1.7	Hybridisierung	49
2.2.1.7.1	Hybridisierung von Southern-Blots mit radioaktiv markierten Proben	49
2.2.1.7.2	Hybridisierung von Northern-Blots mit radioaktiv markierten Proben	49
2.2.1.8	PCR auf genomischer DNA	50
2.2.2	Mutationsanalyse bei CSNB Patienten	50
2.2.2.1	SSCP (engl.: single strand conformation polymorphism)-Analyse im <i>CACNA1F</i> -Gen	50
2.2.2.2	Computer-Vorhersageprogramme und Datenbankenanalysen	51
2.2.2.3	Untersuchung auf submikroskopische Veränderungen im CSNB1 Locus bei Patienten	52
2.2.2.4	Mutationsanalysen durch SSCP-Analyse und direkte Sequenzierung	52
2.2.2.5	ARMS PCR	53
2.2.3	Klonierung des <i>Nyx</i> -Gens der Maus	53
2.2.3.1	Isolierung der genomischen <i>Nyx</i> -Sequenz	53
2.2.3.2	cDNA Synthese und RACE-PCR	54
2.2.3.3	Ermittlung der vollständigen genomischen Sequenz von <i>Nyx</i>	55
2.2.3.4	Expressionsanalyse von <i>Nyx</i> in Mausgeweben mittels RT-PCR	55
2.2.4	Herstellung polyklonaler Antikörper gegen das NYX-Protein	55
2.2.4.1	Proteinantikörper aus Kaninchen	55
2.2.4.1.1	Konstrukte und Expression der Proteine	55
2.2.4.1.2	Aufreinigung der Proteine	56
2.2.4.1.3	Spezifität der Protein Antiseren	56
2.2.4.2	Peptidantikörper aus Kaninchen	57
2.2.4.3	Affinitätsaufreinigung der Antiseren	57
2.2.5	Studien von funktionellen Domänen in NYX	59
2.2.5.1	Klonierung von <i>NYX</i> -Expressionskonstrukten mit V5-Erkennungsstelle	59
2.2.5.2	Transfektion in COS-7 und HeLa Zellen	60
2.2.5.3	Immunfluoreszenz	60

2.2.5.4	Zellfraktionierung und Western-Blot Analyse	61
2.2.6	Untersuchungen zur putativen Promoter Region	62
2.2.6.1	Klonierung der putativen Promoter Region von <i>NYX</i> in Maus und Mensch	62
2.2.6.2	Dual-Glo™Luciferase Assay	62
2.2.6.3	Deletionskonstrukte	64
3	ERGEBNISSE	65
3.1	X-chromosomale kongenitale stationäre Nachtblindheit	65
3.1.1	Mutationsanalyse von XLCSNB-Patienten-DNA in <i>CACNA1F</i>	65
3.2	Klonierung des CSNB1-Gens	67
3.2.1	Untersuchung auf submikroskopische Veränderungen im CSNB1 Lokus	67
3.2.2	Mutationsanalyse von XLCSNB-Patienten-DNA in <i>NYX</i>	70
3.2.3	Expressionsanalyse von <i>NYX</i>	71
3.3	Klonierung und Charakterisierung des <i>Nyx</i>-Gens der Maus	72
3.3.1	Isolierung des <i>Nyx</i> -Gens der Maus	72
3.3.2	Generierung der vollständigen Sequenz des Maus <i>Nyx</i> -Gens	74
3.3.3	Expressionsanalyse von <i>Nyx</i>	74
3.4	Antikörper gegen NYX	76
3.5	Molekulare Charakterisierung des NYX-Proteins in Mensch und Maus	78
3.5.1	Studien der Eigenschaften und funktionellen Domänen von Nyctalopin	78
3.5.1.1	Klassifizierung von NYX in die unterschiedlichen Gruppen der SLRP Protein	80
3.5.1.2	Identifizierung von homologen Proteinen durch Sequenzvergleiche	81
3.5.2	Protein-Lokalisationsstudien	83
3.5.2.1	Subzelluläre Lokalisierung von NYX in Maus und Mensch	83
3.5.2.2	Kokolisationsstudien von NYX	86
3.5.2.3	Funktionelle Charakterisierung des C-Terminus von NYX bei Mensch und Maus	88
3.5.2.4	Funktionelle Charakterisierung der vorhergesagten Signalsequenz am N-Terminus von <i>Nyx</i>	90
3.5.2.5	Subzelluläre Lokalisierung mutierter V5-NYX	91
3.6	Identifizierung Transkriptions-regulierender Elemente in NYX	92
3.6.1	Vergleichende genomische Sequenzanalyse	92
3.6.2	Motivuntersuchungen der genomischen Sequenz von <i>NYX</i> in Maus und Mensch	93
3.6.3	Funktionelle Charakterisierung der potentiellen Promotoren bei Mensch und Maus mittels Luziferase Reporter-Konstrukte	95
4	DISKUSSION	99
4.1	Identifizierung des NYX-Gens	99
4.2	Mutationspektrum in <i>CACNA1F</i> und <i>NYX</i>	102
4.3	Expression von NYX in Mensch und Maus	105
4.4	Antikörper gegen das NYX Protein	107
4.5	Charakterisierung funktioneller Domänen von Nyctalopin	108
4.6	Transkriptionelle Regulation des NYX-Gens in Mensch und Maus	111

4.7	Bedeutung der Erkenntnisse für zukünftige Studien von Nyctalopin	112
5	ZUSAMMENFASSUNG - SUMMARY	115
6	LITERATURVERZEICHNIS	119
7	ANHANG	130
7.1	Patientenproben	130
7.2	Oligonukleotide	130
7.2.1	Adapter Primer	130
7.2.2	<i>CACANAIF</i> Primer	130
7.2.3	Humane <i>NYX</i> Primer	132
7.2.4	Maus <i>Nyx</i> Primer	133
7.2.5	<i>NYX</i> Primer für die <i>E.coli</i> -Expressionskonstrukte	134
7.2.6	<i>NYX</i> Primer für die Säugerzellen-Expressionskonstrukte	135
7.2.7	<i>NYX</i> Promotor Primer	136
8	VERÖFFENTLICHUNGEN UND KONGRESS- BEITRÄGE	137
8.1	Wissenschaftliche Veröffentlichungen	137
8.2	Kongressbeiträge	138
	DANKSAGUNG	139
	LEBENS LAUF	140
	ERKLÄRUNG	141

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Erläuterung
ABCA4	Engl.: ATP-binding cassette, subfamily A (ATP-bindende Kasette, Untergruppe A)
ad	autosomal dominant
AIPL1	engl.: arylhydrocarbon-interacting receptor protein-like 1 (Arylhydrokarbon-interagierendes Rezeptor-ähnliches Protein)
AK	Antikörper
AMD	Altersbedingte Makuladegeneration
ar	autosomal rezessiv
ARMS	engl.: amplification r <u>e</u> fractory <u>m</u> utation <u>s</u> ystem
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-Triphosphat
BSA	engl.: bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
bp	Basenpaare
CASK	engl.: calcium calmodulin-dependent protein kinase (Kalzium Kalmodulin-abhängige Protein Kinase)
cd	Candela
cDNA	engl.: complementary desoxyribonucleic-acid (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
CGD	engl.: chronic granulomatous disease (chronische Granulomatose)
cGMP	engl.: cyclic guanosine monophosphate phosphodiesterase (zyklisches Guanosinmonophosphat)
cGMP PDE	engl.: cyclic guanosine monophosphate phosphodiesterase (zyklische Guanosinmonophosphat-Phosphodiesterase)
cM	Centi Morgan
COS-7 Zellen	Nierenzellen des Afrikanischen Grünen Affens
CNG	engl.: cyclic nucleotide-gated cation channels (zyklische Nukleotidkationen Kanal)

CRalBP	engl.: cellular retinaldehyde-binding protein (Retinaldehyd-Bindungsprotein)
CRX	engl.: cone-rod homeobox-containing gene (Zapfen-Stäbchen-spezifisches Homeobox-Gen)
DDX3	DEAD/H BOX X-linked
DFFRX	Drosophila fat facets related X
del	Deletion
DMEM	engl.: Dulbecco's Modified Eagle's Minimum Essential Medium (Dulbecco's modifiziertes Eagle's minimales essentielles Medium)
DNA	engl.: desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	1,4-Dithio-DL-threit, (±)-threo-1,4-Dimercapto-2,3-butandiol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
ERG	Elektroretinogramm
faf	Drosophila fat facets gene
g	Gramm bei Massenangaben
Gapdh	Glyzerinaldehyd-3`-phosphat-Dehydrogenase
GCAP	engl.: guanylyl cyclase activating protein (Guanylat-Cyklase-Aktivator-Protein)
GFP	engl.: green fluorescent protein (grün fluoreszierendes Protein)
GMP	Guanosin-Monophosphat
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GPR34	engl.: G protein-coupled receptor 34 (G-Protein gekoppelter Rezeptor)
GTP	Guanosin-Triphosphat
h	Stunde
H ₂ O _{dd}	doppelt destilliertes Wasser
HeLa-Zellen	Tumorzellen ursprünglich von Frau Henrietta Lacks gewonnen
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure

HRP	engl.: horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
HSD	Heringsperma-DNA
IF	Immunofluoreszenz
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilo Dalton, 1 g/mol
LB	Luria Bertani
LCA	Leber congenitale Amaurosis
min	Minute
ml	Milliliter
NIH	National Institute of Health
Ni-NTA	engl.: Nickel-Nitrietriacetat (Triessigsäurenitril)
NIX	engl.: nucleic acid identification (Identifizierung von Nukleinsäuren)
nk	Nukleotid
NYX	engl.: nyctalopin on chromosome X (Nyctalopin auf dem X-Chromosom)
PDE	Phosphodiesterase
ORF	engl.: open reading frame (offener Leserahmen)
PBS	engl.: phosphate buffer saline (salzhaltiger Phosphatpuffer)
PCR	engl.: polymer chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PVDF	engl.: microporous polyvinylidene difluoride membrane (Mikroporöse Polyvinyliden-difluorid Membran)
RACE	engl.: rapid amplification of cDNA ends (schnelle Amplifizierung von cDNA Enden)
RDH5	Retinoldehydrogenase 5
RDS	engl.: retinal degeneration, slow (Retinale Degeneration, langsam)
RHOK	Rhodopsin Kinase

RK	Rhodopsinkinase
RNA	engl.: ribonucleic acid (Ribonucleinsäure)
RPGR	engl.: Retinopathia Pigmentosa GTPase Regulator (RP-GTPase Regulator)
RP	Retinopathia Pigmentosa
RPE	Retina-Pigmentepithel
RPGRIP	egl.: retinitis pigmentosa GTPase regulator-interacting protein (RP-GTPase Regulator-interagierendes Protein)
rpm	Rotationen (Umdrehungen) pro Minute
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkriptase
s	Sekunde
SS	Signalsequenz
SDS	engl.: sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Taq	Thermus aquaticus
TEMED	N,N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
U	engl.: Unit (Enzymeinheit)
üN	Über Nacht
V	Volt
v/v	engl.: volume per volume (Volumen pro Volumen)
w/v	engl.: weight per volume (Gewicht pro Volumen)
XLCSNB	engl.: X-linked congenital stationary night blindness (X-chromosomale kongenitale stationäre Nachtblindheit)
YAC	engl.: yeast artificial chromosome (Hefe artifizielles Chromosom)
YRH	YAC-Repräsentations-Hybridisierung