

1 EINLEITUNG

1.1 Das visuelle System

Mit unseren fünf Sinnen orientieren wir uns in der Umwelt. Erst das menschliche Gehirn setzt das „Feuerwerk“ der Neuronen aus Sehen, Hören, Riechen, Schmecken und Tasten zu einem sinnvollen Ganzen zusammen. Das Sehen ist vielleicht der wichtigste Sinn um die Vielfältigkeit der Welt, in der wir leben, wahrzunehmen und mit anderen Menschen in Kontakt treten zu können. Der Sehsinn liefert 80% der Informationen, während ihm die anderen Sinne untergeordnet sind. So ist es wahrscheinlich die größte Einschränkung, wenn durch Blindheit diese Form der Wahrnehmung nicht mehr möglich ist.

1.1.1 Die Anatomie des menschlichen Auges

Zum Schutz vor äußeren Einwirkungen wird das Auge (Abbildung 1) von der harten weißen Lederhaut (Sklera) umgeben. An diese Schicht grenzt im Inneren die Aderhaut (Choroidea), eine blutgefäßreiche Schicht des Auges, die der Versorgung der äußeren Netzhautschichten und zur Gewährleistung einer konstanten Temperatur dient. Weiter im Innern folgt das Pigmentepithel. Der dunkle Farbstoff (Melanin) verhindert die Reflexion des eingefallenen Lichts. Die sich anschließende innerste Schicht des Auges stellt die Netzhaut (Retina) dar. Der Hohlraum des Auges wird durch einen transparenten Glaskörper ausgefüllt. Der durchsichtige und nach vorne gewölbte Teil der Lederhaut stellt die Hornhaut (Cornea) dar, durch die Licht in das Auge einfallen kann. Linse und Hornhaut fokussieren die einfallenden Lichtstrahlen auf die Netzhaut, sodass das Bild der Umgebung auf ihr abgebildet wird. Durch Kontraktion bzw. Entspannung der Ziliarmuskeln wird die Krümmung der Linse verändert und die Schärfe des Bildes gewährleistet. Die Pupille ist die Öffnung in der Iris (Regenbogenhaut), die Licht in das Innere des Auges lässt. Die Iris ist somit vergleichbar mit einer farbigen Blende einer Kamera. Sie zieht sich bei Helligkeit zusammen (Pupille wird enger) und dämpft den Lichteinfall. Der Pigmentgehalt der Regenbogenhaut bestimmt die Augenfarbe. Der visuelle Apparat des Linsenauges wirft ein umgekehrtes und verkleinertes Bild der Umwelt auf die Retina. Diese besteht aus den Sinneszellen oder auch Photorezeptoren, den sogenannten Zapfen und Stäbchen, die für das Farbsehen bzw. für das Schwarz/Weiss-Sehen zuständig sind. Die Stelle des schärfsten Sehens stellt der „gelbe Fleck“ (Fovea centralis, makula lutea) dar. Hier sind die Zapfen am dichtesten, während die Stäbchen fehlen. Außerdem enthält die Retina eine Region, an der die Nervenfasern austreten.

Dieses Gebiet enthält keine Photorezeptoren und bildet dadurch einen „blinden Fleck“ (Papille) (Abbildung 2).

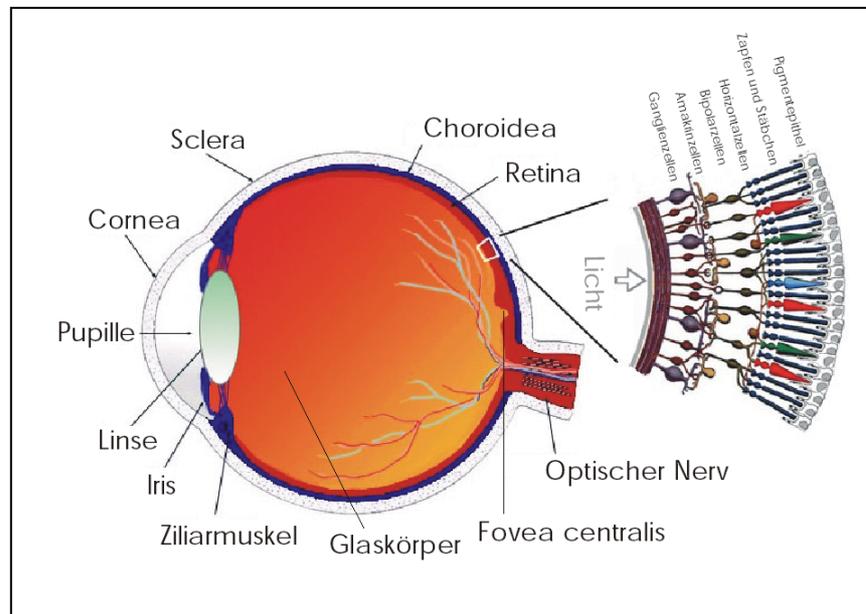


Abbildung 1: Anatomie des menschlichen Auges

Dargestellt ist schematisch ein horizontaler Schnitt durch das Auge des Menschen. Die Netzhaut ist in rot hervorgehoben und rechts als Feinstruktur mit ihren unterschiedlichen Schichten vergrößert abgebildet. Entnommen und verändert aus <http://webvision.med.utah.edu/index.html>

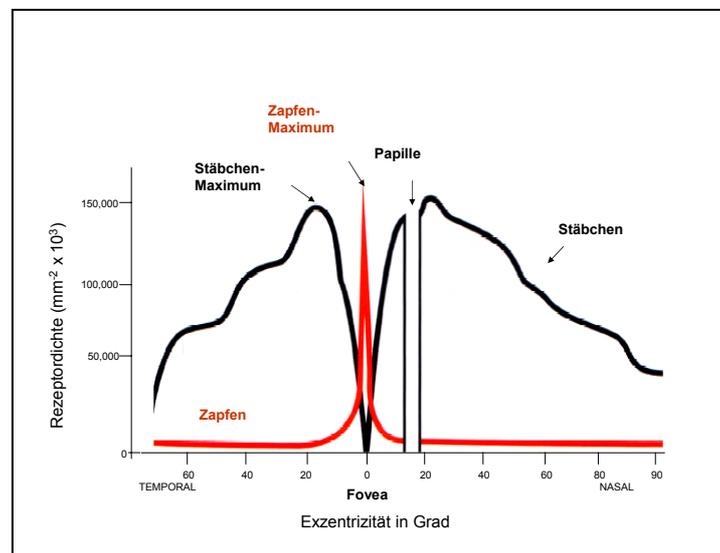


Abbildung 2: Verteilung der Photorezeptorzellen

Die Zapfendichte ist in der Fovea am größten, wogegen die Stäbchen in ca. 18° Abstand ihre maximale Dichte haben ($160,000/\text{mm}^2$). Grundsätzlich ist die Stäbchendichte in der Peripherie viel größer. Am blinden Fleck (Papille), bei ca. 15°, gibt es keine Rezeptoren. Die Rezeptorenverteilung zeigt, dass durch den Mangel an Stäbchen am gelben Fleck (Fovea) in der Dämmerung nur unscharf gesehen werden kann. Auch können dann keine Farben wahrgenommen werden. Modifiziert nach Osterberg 1935.

1.1.2 Die Netzhaut

Die Netzhaut (Retina) setzt sich bei allen Wirbeltieren aus unterschiedlichen Schichten zusammen: aus den Lichtsinneszellen (Photorezeptorzellen), gegliedert in die Außensegmente und Innensegmente mit den Zellkernen (engl.: ONL = outer nuclear layer; äußere nukleäre Schicht), der Schicht der Interneuronen (engl.: INL = inner nuclear layer; innere nukleäre Schicht), bestehend aus Horizontalzellen, Bipolarzellen und Amakrinzellen und aus der Schicht der Ganglienzellen (engl.: GCL = ganglian cell layer). Die äußere nukleäre Schicht und die innere nukleäre Schicht werden durch die äußere synaptische Schicht (engl.: OPL = outer plexiform layer), die innere nukleäre Schicht und die Schicht der Ganglienzellen durch die innere synaptische Schicht (engl.: IPL = inner plexiform layer) getrennt. Diese Zwischenlagen sind praktisch frei von Zellkörpern, aber reich an Neuronenkontakten (Abbildung 3).

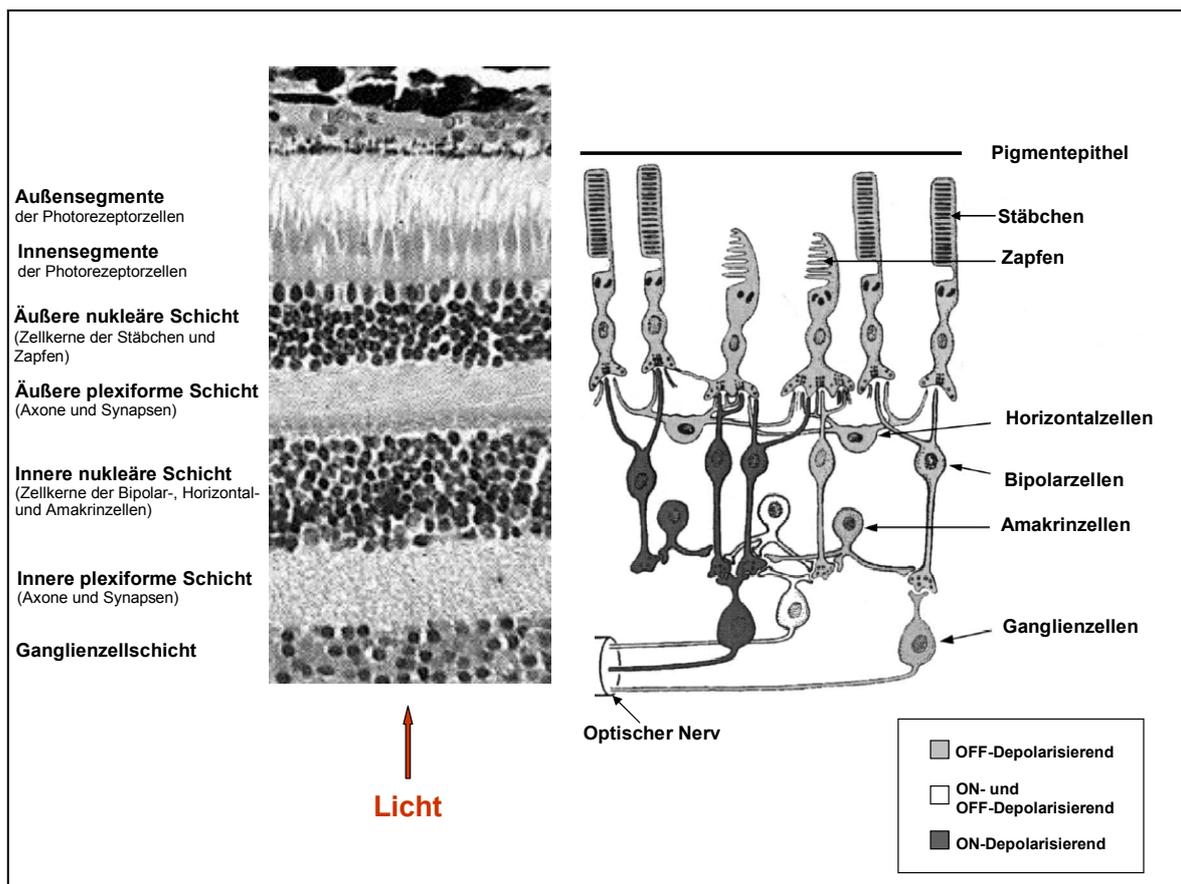


Abbildung 3: Aufbau der Zellschichten der Retina

Das linke Bild zeigt eine mikroskopische Aufnahme einer humanen Retina, im rechten Teil sind die unterschiedlichen Schichten des mikroskopischen Bildes schematisch dargestellt. Modifiziert nach Caputto und Guido, 2002.

Interessanterweise sind die Lichtsinneszellen nicht dem Licht zugewandt, sondern das Licht muss erst die anderen Zellschichten durchdringen (Abbildungen 1 und 3). Deshalb nennt man das Auge der Wirbeltiere auch „inverses Auge“. Das eintretende Licht wird von den Außensegmenten der Photorezeptoren absorbiert. Insgesamt gibt es in der adulten humanen Retina 6,4 Millionen Zapfen und 110 – 125 Millionen Stäbchen, die durch Phototransduktion Lichtreize in neuronale Signale umwandeln. Wie der Name schon impliziert, sind die Zapfen kurze, konische und die Stäbchen lange, stäbchenförmige Zellen. Neben der unterschiedlichen Form haben beide Zelltypen eine verschiedene Aufgabe. Die Zapfen stellen die Träger des photopischen Sehens, d.h. das Scharfsehen, etwa beim Lesen bei heller Umgebungsbeleuchtung dar und sind für die räumliche Wahrnehmung und für das Farbsehen verantwortlich. Die lichtempfindlichen Stäbchen dienen dem skotopischen Sehens, d.h. dem Sehens bei schwachem Licht zur Unterscheidung von Grautönen. Sie sind für die Verarbeitung von Kontrast, Helligkeit und Bewegung zuständig. In den Außensegmenten der Photorezeptoren befinden sich Membranstapel, an denen in den Zapfen das rote-, blaue- und grüne- Opsin und in den Stäbchen das Rhodopsin lokalisiert sind. Der äußere Teil der Außensegmente der Photorezeptoren ragt in das Pigmentepithel der Retina (RPE), das neben der Abschirmung des Lichtes nach hinten auch für die Verarbeitung abgestoßener Membranstapel der Photorezeptoren zuständig ist. In den Zellen des RPEs läuft auch ein Teil der biochemischen Regeneration des Chromophors Retinal ab, das danach wieder zurück in die Photorezeptoren transportiert wird, wo es sich erneut mit dem Proteinanteil des Rhodopsins verbindet. Die von den Photorezeptoren umgewandelten neuronalen Signale werden von den Bipolarzellen empfangen und an die Ganglienzellen weiter geleitet. Zwischen den Photorezeptorzellen und den Bipolarzellen befinden sich die Horizontalzellen, die aber nur mit den Photorezeptorzellen in Kontakt stehen und für die Verstärkung der räumlichen Unterschiede der Lichtintensität durch laterale Inhibition zuständig sind. Die Amakrinzellen haben direkten Kontakt zu den Bipolar- und Ganglienzellen. Es werden drei verschiedene Arten von Amakrinzellen unterschiedlicher Größe und Morphologie beschrieben, deren Funktion meist aber noch unbekannt ist. Die gesammelte Information der verschiedenen Amakrin- und Bipolarzellen wird dann von den Axonen der Ganglienzellen, die sich zum optischen Nerv vereinigen, in Form von Aktionspotenzialen an das Gehirn weiter geleitet.

1.1.3 Ophthalmologische Untersuchungen der Netzhaut

Eine Methode zur Erkennung von Netzhauterkrankungen stellt die Untersuchung des Augenhintergrundes dar. Mit Hilfe einer Spiegelreflexkamera können pathologische Fundusveränderungen dokumentiert werden. Insbesondere pathologische Prozesse an den innersten Netzhautschichten, wie Veränderungen der Nervenfaserschicht, Blutungen oder Mikroaneurysmen, stellt das rotfreie Bild der Funduskamera kontrastreich dar. Nicht immer sind Netzhauterkrankungen aber mit einem auffälligen Fundus assoziiert. Die Elektroretinographie (ERG) ist eine weitere klinische Standardmethode, die Aufschluss über retinale Defekte liefern kann. Bei dieser Untersuchungsmethode wird die elektrische Antwort der Netzhaut auf kurze Lichtexposition mit Hilfe von Elektroden aufgezeichnet. Abhängig von der zu untersuchenden Funktion eines bestimmten Bereiches der Netzhaut, werden verschiedene Formen der ERG angewandt: bei dem skotopischen ERG, werden die Photorezeptoren an die Dunkelheit adaptiert, während bei dem photopischen ERG die Rezeptorzellen an eine bestimmte Lichtintensität gewöhnt werden. Zur Messung der elektrischen Antwort der Retina auf diesen Lichtblitz wird extraokular eine Kontaktlinselektrode angebracht. Beim skotopischen ERG wird nach 20-30-minütiger Dunkeladaptation mit einem schwachen, weißen Blitz ($0,001-0,3 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$) die Stäbchenantwort gemessen. Ein heller Lichtblitz ($1,0-3,0 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$) nach Dunkeladaptation führt zur kombinierten Stäbchen-Zapfenantwort. Wenn diese Antwort in einem veränderten Frequenzbereich abgeleitet wird, spricht man von den oszillatorischen Potenzialen. Beim photopischen ERG nach einer 10-minütigen Helladaptation mit einem hellen, weißen Blitz wird die Zapfenantwort registriert. Ein heller, weißer Lichtblitz resultiert in der Flimmerlicht-Zapfenantwort. Die Trennung der stäbchen- und zapfenabhängigen Antworten erlaubt die Differenzierung dieser Photorezeptorsysteme. Dabei resultieren die Einzelblitzantworten in einer negativen a-Welle und einer positiven b-Welle. Die a-Welle ist ein Indikator vorwiegend für die Funktion beider Photorezeptorsysteme, während die b-Welle Funktionsstörungen hauptsächlich in den Bipolarzellen widerspiegelt. Veränderungen der oszillatorischen Potenziale weisen auf Funktionsstörungen in den mittleren Netzhautschichten, wahrscheinlich in den Amakrinzellen, hin. Viele Netzhauterkrankungen sind durch ein „negatives“ ERG gekennzeichnet, d.h., die b-Welle ist niedriger als die a-Welle, was ein Hinweis auf intraretinale Transmissionsstörungen oder eine Ischämie der inneren Netzhautschichten sein kann.

1.1.4 Die Biochemie der Sehkaskade

Die Phototransduktion beschreibt den Umwandlungsprozess von absorbierten Lichtquanten am lichtsensorischen Pigment der Photorezeptoren in biochemische Signale und dann in elektrische Impulse, die über den Sehnerv ins Gehirn weitergeleitet werden. Das lichtsensorische Pigment, das sich in den Membranstapeln der äußeren Segmente der Photorezeptoren befindet, besteht aus den oben erwähnten Opsinen (Rhodopsin in den Stäbchen und rote-, grüne- und blaue Opsine in den Zapfen) und einem Chromophor, dem Vitamin A-Derivat Retinal. Bei der Phototransduktion wird ein Photon von Retinal absorbiert, wodurch das 11-*cis* Retinal zu *all-trans*-Retinal isomerisiert. Diese Reaktion ist der einzige lichtabhängige Schritt des Sehvorgangs. Als Folge der Konformationsveränderung passt Retinal nicht mehr an die Bindungsstelle des Opsins, sodass das Molekül in einen Übergangszustand des Metarhodopsins II überführt wird. Die katalytisch aktive Form des Sehpigments Metarhodopsin II aktiviert das GTP-bindende Protein Transduzin, wodurch die Hemmung der retinalen Phosphodiesterase aufgehoben wird. Die aktivierte Phosphodiesterase hydrolysiert cGMP, wodurch der intrazelluläre cGMP-Spiegel abgesenkt wird. Dies führt zur Schließung cGMP-gesteuerter Kationenkanäle (CNG-Kanäle) in der Plasmamembran. Im Dunklen sind diese Kanäle durch eine hohe intrazelluläre cGMP-Konzentration ständig geöffnet und erlauben somit ein ständiges Einströmen von Natrium- und Kalzium-Ionen (Dunkelstrom), was zur partiellen Depolarisierung der Photorezeptoren führt. Dies hat die Freisetzung des Neurotransmitters Glutamat an den synaptischen Enden der Photorezeptoren zur Folge. Die Schließung der Kationenkanäle als Folge der Lichtanregung führt zu einer lokalen Hyperpolarisation, wodurch die Freisetzung des Glutamats an den synaptischen Enden der Photorezeptoren vermindert wird (Stryer 1991; Yau, 1994 und Kawamura, 1995). Zusätzlich zur Hyperpolarisation wird durch die Schließung der Kationenkanäle der Ca^{2+} -Einstrom vermindert. Der $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher transportiert aber weiterhin Ca^{2+} -Ionen aus der Zelle, was eine Senkung des intrazellulären Ca^{2+} -Stroms zur Folge hat. Dadurch beschleunigt die retinale Guanylatzyklase die cGMP Resynthese. Die Aktivierung der Guanylatzyklase erfolgt durch GCAP (Guanylat-Cyklase-Aktivator-Protein), einem Protein, das direkt durch die Bindung von Ca^{2+} reguliert wird. Außerdem wird das aktive Rhodopsin durch die Bindung einer Rhodopsinkinase (RK) und mit Hilfe des Arrestin-Proteins aus der Enzymkaskade entfernt. Durch eine endogene GTPase-Aktivität inaktiviert sich das Transduzin nach einiger Zeit selbst. Dies ist wichtig für die

Deaktivierung des Sehpigments, der Wiederherstellung der cGMP-Konzentration und der Lichtadaptation (Kaupp und Kock 1992; Koutalos und Yau 1996; Molday 1998) (Abbildung 3). Zapfen und Stäbchen gehorchen in ähnlicher Weise diesen molekularen Mechanismen der Phototransduktion.

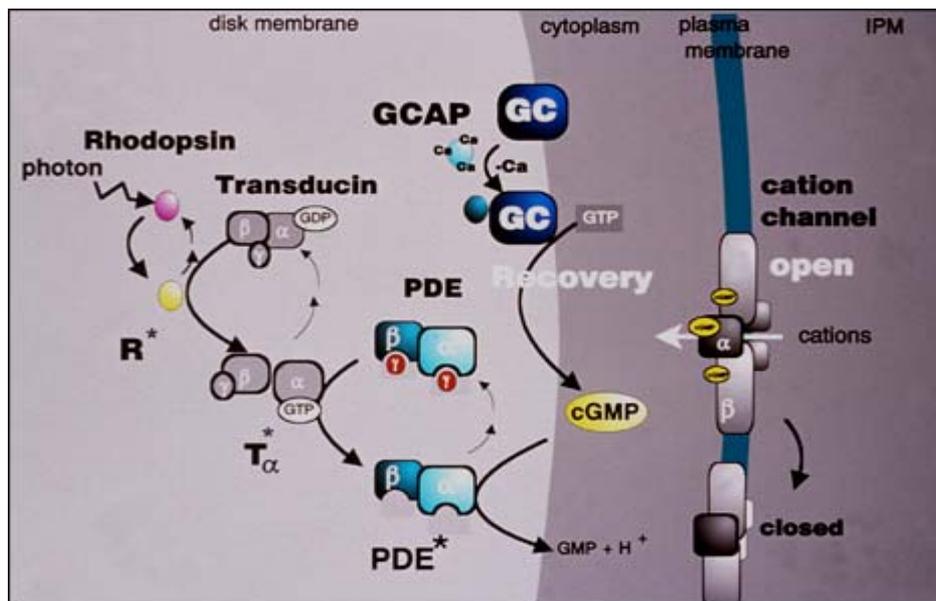


Abbildung 4: Mechanismus der Phototransduktion

Das lichtsensorische Pigment Rhodopsin (R) der Stäbchen besteht aus dem Protein Opsin und dem Chromophor 11-*cis* Retinal und ist in den äußeren Segmenten lokalisiert. Die Photonen Absorption des Chromophors führt zu seiner Isomerisierung zur all-*trans* Konfiguration. Die Photolysierte Form von R, R* ist katalytisch aktiv, bindet und aktiviert Transducin, ein heterotrimeres G-Protein. Daraufhin aktiviert R* die Membran-assoziierte Phosphodiesterase (PDE), die wiederum cGMP hydrolysiert, was zu einer Schließung der Kationenkanäle führt. Die Schließung der Kanäle hat die Senkung der Kationen Konzentration und somit eine Hyperpolarisation der Plasmamembran, eine Inhibition der Freisetzung des Neurotransmitters Glutamat und die Signalübertragung an angrenzende neuronale Zellen zur Folge. Im Dunklen ist die Ca²⁺- Ionen Konzentration hoch und die Guanylatzyklase (GC) Aktivität niedrig. Nach der Photoaktivierung wird durch die Schließung der Kanäle die Ca²⁺-Konzentration erniedrigt. Außerdem transportieren Na⁺/K⁺ und Ca²⁺-Austauscher weiterhin Ca²⁺ aus der Zelle, was die Resynthese von cGMP durch GC zur Folge hat. Entnommen aus einer Arbeit von Polans *et al.* 1996.

Im weiteren Verlauf der Sehkaskade werden die elektrischen Signale über die Bipolarzellen zu den Ganglienzellen übertragen. Man unterscheidet zwei Arten von Bipolarzellen, die auf das von den Synapsen der Photorezeptoren freigesetzte Glutamat reagieren: die ON- und OFF Bipolarzellen. Beide Sorten sind von einem Umfeld (engl.: surround) in ihrem entsprechenden rezeptiven Feld umgeben, dessen Polarität dem Zellinnern (engl.: center) entgegengesetzt ist. Anhand eines kleinen Lichtpunktes, den man in das Zentrum des rezeptiven Feldes projiziert, können ON- und OFF Bipolarzellen unterschieden werden. Die ON-Zentrum-Neuronen werden erregt, wenn das Licht auf das

Zentrum des rezeptiven Feldes gerichtet ist und depolarisiert. OFF-Zentrum-Neuronen werden durch einen Lichtreiz gehemmt, der das Zentrum ihres rezeptiven Feldes trifft und hyperpolarisiert. Ein entgegengesetzter Effekt wird durch die Applikation von Licht auf das Umfeld der ON- bzw. OFF Bipolarzelle erzielt. Eine diffuse Beleuchtung des gesamten rezeptiven Feldes löst nur eine schwache Entladung aus, da sich die Wirkung des Zentrums und des Umfeldes gegenseitig neutralisieren. Die Veränderungen der Glutamatkonzentration werden sowohl von ON- als auch für OFF-Zentrum Bipolarzellen von unterschiedlichen Glutamatrezeptoren erkannt. Bei Anwesenheit von Licht steigt die Leitfähigkeit der ON-Bipolarzellen, während sie bei den OFF-Bipolarzellen sinkt (Nelson, 1973; Toyoda, 1973). Die Senkung der Leitfähigkeit der OFF-Bipolarzellen kann durch die in Anwesenheit von Licht verursachte Senkung der Glutamatfreisetzung der Photorezeptoren erklärt werden (Dacheux und Miller, 1976). Die Erhöhung der Leitfähigkeit der ON-Bipolarzellen bei Lichtanregung lässt sich durch eine Schließung eines Kationen-Kanals durch einen metabotropen Glutamatrezeptor erklären. Metabotrope Rezeptoren stellen im Gegensatz zu ionotropen Glutamatrezeptoren selbst keine Ionenkanäle dar, können solche aber beeinflussen. Es wurde gezeigt, dass sie in den Enden der Axone beider Photorezeptoren (Hirasawa *et al.*, 2002) und in den Bipolarzellen (Awatramani und Slaughter, 2001) exprimiert sind. Neben der Expression von metabotropen sind auch ionotrope Glutamatrezeptoren in ON-Zentrum-Bipolarzellen exprimiert (Vardi *et al.*, 1998), während OFF-Bipolarzellen nur eine Immunreaktivität für ionotrope Glutamatrezeptoren zeigten. Unterschiedliche Studien zu der Funktion der Bipolarzellen ergaben, dass ON-Bipolarzellen und ihre Glutamatrezeptoren sehr angreifbar sind. Der Verlust dieser Zellen kann mit bestimmten Krankheiten assoziiert sein und durch pharmakologische Behandlungen ihre Funktion blockiert werden. Als Beispiel sei hier ein transgenes Mausmodell genannt, dem der metabotrope Glutamatrezeptor mGluR6 fehlt, was zum Verlust der elektroretinographischen b-Welle führt (Masu *et al.*, 1995). Die selektive Blockierung dieses Rezeptors wird durch APB (2-amino-4-phosphonobutyrat) erreicht und führt zum gleichen Effekt (Schiller, 1982; Schiller 1984; Knapp und Mistler, 1983). Dieses Defizit der ON-Bipolarzellen führt bei Menschen und Mausmodellen zu einem Verlust des Nachtsehens bei relativ normalem Tagsehen.

1.2 Hereditäre Netzhauterkrankungen

Erblich bedingte Netzhautdefekte stellen einen großen Anteil der Augenerkrankungen wie der Retinitis pigmentosa (RP), verschiedene Formen der Makuladegenerationen und der Leberschen kongenitalen Amauroses (LCA) dar. Sie resultieren aus Mutationen in Genen unterschiedlicher Funktion in der Netzhaut. Die Aufklärung der Mechanismen der Phototransduktion lieferte Kandidatengene, die mit diesen Netzhauterkrankungen assoziiert sein könnten. Die größte Gruppe dieser Netzhauterkrankungen ist die RP. Unter diesem Namen ist eine klinisch nicht unterscheidbare Gruppe von Erkrankungen mit verschiedenen Erbgängen und multiplen zugrunde liegenden Genmutationen in verschiedenen Genen zusammengefasst. Es handelt sich dabei um eine in der Netzhautperipherie beginnende, fortschreitende Degeneration vorerst der Stäbchen und anschließend der Zapfen. Weltweit ist die Häufigkeit von RP 1:5000, womit etwa 1,2 Millionen Menschen von RP betroffen sind. Mutationen in Genen aus der Stäbchen-Phototransduktionskaskade können, wie im Falle der beiden katalytischen Untereinheiten der cGMP Phosphodiesterase PDE, *PDE6A* und *PDE6B*, zur autosomal rezessiv vererbten RP führen (Huang *et al.*, 1995; Danciger *et al.*, 1996; McLaughlin *et al.*, 1993; Bayes *et al.*, 1995). Mutationen in diesen Genen führen zur Instabilität des Holoenzym PDE, so verliert es seine hydrolytische Funktion und das zyklische GMP kann nicht mehr hydrolysiert werden. Durch die Erhöhung des cGMP-Spiegels auf einen zelltoxischen Wert, kommt es zur Degeneration der Rezeptorzellen. Weiter führen auch Mutationen in den für die cGMP-gesteuerten Kationenkanäle kodierenden Gene *CNG1* (Dryja *et al.*, 1995) und *CNG2* (Bareil *et al.*, 2001) zu der rezessiv vererbten Form der RP. Mutationen in Rhodopsin (*RHO*) wurden in RP Patienten mit einem sowohl rezessiven als auch dominant autosomalen Vererbungsmodus gefunden (Sohocki *et al.*, 2001). Auch das Photorezeptor-Strukturprotein Peripherin kann durch Mutationen in dem entsprechenden Gen (*RDS*) zur adRP führen (Kajiawara *et al.*, 1991). Aberrationen in Proteinen, die eine wichtige Rolle im Photorezeptormetabolismus spielen, wie zum Beispiel das zellulär Retinaldehyd-bindende Protein *CralBP*, verursachen ar-RP durch die fehlende oder eingeschränkte Regeneration des 11-cis Retinals (Crabb *et al.*, 1991; Maw *et al.*, 1997). Durch die Aufklärung der Pathogenesemechanismen dieser Erkrankungen wurde aber auch gezeigt, dass Aberrationen in einem Gen unterschiedliche Defekte zur Folge haben können. So führen Mutationen in einigen dieser genannten Gene zu einem milderem Phänotyp wie zum Beispiel der Nachtblindheit (siehe Einleitung 1.2.2 Kongenitale

stationäre Nachtblindheit). Neben der Identifizierung von Mutationen in Genen mit bekannter Funktion, die zur RP führen, wurden auch Veränderungen in Genen mit noch unbekannter Funktion in RP-Patienten gefunden. Hierzu zählen beispielsweise der Retinopathia Pigmentosa GTPase Regulator {(*RPGR*, RP3) (Meindl *et al.*, 1996; Roepman *et al.*, 1996)} und *RP2* (Schwahn *et al.*, 1998)}. Beide Erkrankungen haben einen X-chromosomalen Vererbungsverlauf. Für das *RPGR*-Gen wurden unterschiedliche Spleißvarianten gefunden (Kirschner *et al.*, 1999), inwiefern die mutierten Formen dieser Varianten aber einen Einfluss auf die Erkrankung haben, ist noch nicht bekannt. Alle beschriebenen Isoformen beinhalten jedoch eine Interaktionsdomäne für die δ -Untereinheit der Stäbchen-Phosphodiesterase, was auf eine Funktion in der Solubilisierung bzw. Membraninsertion von isoprenylierten Proteinen schließen lässt (Linari *et al.*, 1999; Vervoort *et al.*, 2000). Das *RP2*-Gen kodiert für ein Protein mit einer Homologie zu Kofaktor C. Kofaktor C ist in Faltungs- und Heterodimerisierungsprozessen von α - und β -Tubulin involviert, die den Grundbaustein für die Mikrotubuli des Zytoskeletts darstellen. Inwiefern sich diese Homologie aber genau auf den Pathogenesemechanismus von *RP2* auswirkt, ist nicht bekannt. Eine weitere Klasse der Netzhauterkrankungen stellt eine Vielzahl von Syndromen dar, die mit degenerativen Veränderungen der Netzhaut assoziiert sind. Hier soll das Usher Syndrom genannt werden, das eine genetisch und klinisch heterogene Gruppe von Erkrankungen beschreibt. Neben RP treten bei Usher-Patienten Hörstörungen (Lindenov 1945) auf. Das Usher-Syndrom ist mit Mutationen in unterschiedlichen Genen assoziiert, die autosomal rezessiv sind. Neben der RP werden auch die unterschiedlichen Arten der Makuladystrophien zu den degenerativen Netzhauterkrankungen gezählt, wobei hier vorwiegend das Netzhautzentrum, d.h. die Makula mit ihren Zapfen betroffen sind. Ihnen gemeinsam ist der progressive Verlauf der Krankheit, der zu starken Sehbeeinträchtigungen führt, meist aber nicht zur vollständigen Erblindung. Häufige Makuladystrophien sind zum Beispiel M. Stargardt (Stargardt 1909; Ford 1961; Walsh *et al.*, 1957) mit einem autosomalen rezessiven Erbgang, verursacht durch Mutationen im *ABCA4*-Gen (Allkimets *et al.*, 1997) und die X-chromosomale Retinoschisis. Interessanterweise wurden im *ABCA4*-Gen auch Mutationen in Patienten mit autosomal rezessiver RP gefunden (Cremers *et al.*, 1998; Martinez-Mir *et al.*, 1998). Es wird vermutet, dass das Proteinprodukt für den Transport des *all*-trans-Retinal zuständig ist. Des Weiteren wurden Mutationen im Peripherin-Gen nicht nur bei RP-Patienten gefunden, sondern auch bei Patienten mit Makuladystrophie (Wells *et al.*, 1993). X-chromosomale Retinoschisis ist durch eine Spaltbildung in der Nervenfaserschicht

charakterisiert (Gieser und Falls 1961). Obwohl sich bei der X-chromosomalen kongenitalen Retinoschisis in 50% der Patienten auch periphere Netzhautveränderungen finden, sind für die funktionelle Beeinträchtigung die Makulaveränderungen von entscheidender Bedeutung. Mutationen im *RS1*-Gen rufen diese Krankheit hervor (Sauer *et al.*, 1997). Bei der Netzhautdystrophie der Leberschen kongenitalen Amaurose sind sowohl die Zapfen als auch die Stäbchen betroffen. Sie stellt die größte Gruppe der autosomal rezessiven Netzhautdystrophien mit moderaten bis starken kongenitalen Sehbehinderungen bei Kindern dar. Unterschiedliche Mutationen in verschiedenen Genen sind für diesen Phänotyp verantwortlich. Auch hier spielen Gene mit bekannter Funktion in der Phototransduktionskaskade wie zum Beispiel das Gen der retinalen Guanylatzyklase (*GUCY2D*) und das 65 kDa Retina-Pigmentepithel-Protein (RPE65) eine essentielle Rolle. RPE65 ist an der Regeneration des 11-cis-Retinals beteiligt und Mutationen in *RPE65* können neben LCA auch zu RP führen (Marlhens *et al.*, 1997; Morimura *et al.*, 1998). Des Weiteren wurden Mutationen in dem Photorezeptor-spezifischen Homeobox-Gen *CRX* (Zapfen-Stäbchen-spezifisches Homeobox-Gen; Freund *et al.*, 1998), in *AIPL1* (Arylhydrokarbon-interagierendes Rezeptor-ähnliches Protein; Socko *et al.*, 2000) und in dem RPGR-Bindungsprotein *RPGRIP* (RP-GTPase Regulator-interagierendes Protein; Dryja *et al.*, 2001) identifiziert. Außerdem wurden noch viele weitere Loci für LCA mit noch nicht identifizierten Genen ermittelt. Eine weitere Klasse von Erkrankungen mit nicht degenerativen Verlauf, sind die Netzhautfunktionsstörungen. Hier seien die stationäre Nachtblindheit, die stationäre Zapfenfunktionsstörung, die kongenitale Farbblindheit und der Albinismus genannt. Nachtsehstörungen können unterschiedliche Ursprünge haben und werden in den nächsten Kapiteln genauer beschrieben. Stationäre Zapfenfunktionsstörungen können generalisiert (Monochromasien, kongenitale Farbsinnstörungen) oder seltener regional auftreten (kongenitale stationäre Zapfenfunktionsstörung). Bei Monochromasien können jeweils alle drei Zapfensysteme (Stäbchenmonochromasie) oder die Rot-Grün Zapfensysteme (Blauzapfenmonochromasie) in der Funktion gestört sein. Die Vererbung bei der Zapfenmonochromasie ist autosomal rezessiv und resultiert aus Mutationen in verschiedenen Untereinheiten der zyklischen Nukleotidkanäle *CNGA3* (20-30%) und *CNGB3* (40–50%). Die Blauzapfenmonochromasie ist eine extrem seltene, X-chromosomal vererbte Netzhauterkrankung, die durch Mutationen in den Rot- und Grün-Opisin Genen verursacht wird. Kongenitale stationäre Zapfenfunktionsstörungen treten in Einzelfällen auf, die chromosomale Genlokalisierung ist aber noch nicht bekannt. Der Begriff Albinismus fasst

eine genetisch heterogene Gruppe von Erkrankungen mit klinisch ähnlichem Erscheinungsbild, aber unterschiedlichem Vererbungsmodus, zusammen. Bei allen Formen treten Symptome wie Hypopigmentierung von Iris und Fundus, Foveahypoplasie und vermehrte Kreuzung der Nervenfasern im Chiasma opticum auf.

1.2.1 Diagnostik und Therapie vererbter Netzhauterkrankungen

Die Diagnostik hereditärer Netzhauterkrankungen hat in den letzten Jahren eine erhebliche Erweiterung erfahren. Neben den unter 1.1.3 beschriebenen klinischen Untersuchungsmöglichkeiten wurde durch die Sequenzierung des humanen Genoms die Entwicklung der Molekulargenetik vorangetrieben und somit neue Gene identifiziert. Derzeit sind 139 Genorte und 90 klonierte Gene bekannt, die mit erblichen Netzhauterkrankungen assoziiert sind (<http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/sum-dis.htm>, Stand 24.06.2003). Insbesondere bei klinisch nicht unterscheidbaren Erkrankungen wie bei der RP spielt die genetische Diagnostik eine große Rolle. Je nach Vererbungsmodus der Erkrankung kann die Wahrscheinlichkeit berechnet werden, mit der die Nachkommen einen gleichen Gendefekt tragen, bzw. kann die pränatale Diagnostik Aufschluss über einen vorhandenen Gendefekt geben. Bei Erkrankungen wie der RP ist, durch die starke genetische Heterogenität, die Zuordnung des betroffenen Patienten zu einem bestimmten Gendefekt problematisch. Bei Mutationsanalysen der Gene durch direkte Sequenzierung ist dieser Schritt, insbesondere bei Genen mit vielen Exonen, nach wie vor sehr aufwendig und kostspielig. Kostengünstigere Methoden zur Detektion von Aberrationen im Gen, wie die SSCP (engl.: Single Strand Conformation Polymorphismus)- und DHPLC (engl.: Denaturing High-Performance-Liquid-Chromatography)-Analyse erlauben aber eine relativ schnelle Voranalyse der zu untersuchenden Patienten-DNA im großen Maßstab. Eine Hilfe der Interpretation von gefundenen Veränderungen stellt die "Human Gene Mutation Database" dar (<http://www.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/hgmd0.html>). Bekannte Mutationen in unterschiedlichen Genen werden hier eingetragen und stehen so zum Vergleich zur Verfügung. Eine neuere Methode zur Detektion von SNPs (engl.: Single Nucleotide Polymorphisms) stellt die Microarray-Technologie dar. Diese Technik erlaubt einen hohen Durchsatz und gewinnt so in der Diagnostik (Huang *et al.*, 2001; Linn *et al.*, 2003) an Bedeutung. Die Diagnostik beruht auf der DNA-Hybridisierungsanalyse unter Verwendung von DNA-Oligonukleotid-Mikroarrays. Zur Herstellung dieser Chips werden bekannte SNP-spezifische Sequenzen auf einem Träger (Slide) immobilisiert. Die

Hybridisierungsparameter werden optimiert, sodass eine Diskriminierung von Wildtyps- und Mutations-DNA sowohl im homozygoten als auch heterozygoten Zustand möglich ist. Die Expressionsanalyse basierend auf der Chip-Technologie oder mittels der Real-Time-PCR erlauben Studien über die Korrelation der Genexpression und des Krankheitsverlauf einzelner Patienten. Die Problematik, dass bei der direkten Sequenzierung meist nur der ORF eines Genes sequenziert wird, und eventuell vorhandene Mutationen in regulatorischen Bereichen übersehen werden, könnte durch diese moderneren Methoden der Mutationsanalyse vermieden werden. Eine Kombination der Genexpressionsanalyse, der SNP-Chip-Technik und der direkten Sequenzierung bekannter Mutationen könnte die optimale Methode zur effizienten Detektion von Mutationen, auch bei hereditären Netzhauterkrankungen darstellen. Die Internetseite mit folgender Web-Adresse: <http://www.bvmedgen.de> gibt Aufschluss darüber, welche diagnostischen Labore Mutationsanalysen in bestimmten Genen durchführen.

Zur Zeit werden unterschiedliche therapeutische Strategien zur Verbesserung oder gar Heilung vererbter Netzhauterkrankungen verfolgt (Abegg *et al.*; 2000). Am häufigsten werden diese Ansätze für die RP erprobt, da die Phänotypen gut in Tiermodellen beschrieben und viel Gene bereits kloniert sind. Aber auch Netzhauterkrankungen wie die LCA und die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) stellen Forschungsschwerpunkte bei der Suche nach therapeutischen Möglichkeiten dar. Bei der RP werden bereits verkleinerte Linsen implantiert um das Gesichtsfeld zu erweitern, was jedoch dazu führt, dass die behandelten Person keine realen Wahrnehmungen der Größenverhältnisse haben. Auch der progressive Verlauf der RP stellt ein Problem dar, woraus sich ein zeitabhängiger Austausch der Linse ergibt. Eine andere Strategie ist die Transplantation der Netzhaut. Hierbei gibt es zwei Ansätze. Zum einen sollen noch vorhandene Photorezeptoren erhalten werden indem Zellen transplantiert werden, auf deren Vorhandensein die Photorezeptoren angewiesen sind. Zum anderen versucht man Möglichkeiten zu finden, bereits zerstörtes Gewebe zu ersetzen. Durch das vermehrte Wissen der molekularen Pathogenesemechanismen der RP wurden des Weiteren therapeutische Startegien in der somatischen Gentherapie und Apoptosehemmung entwickelt (Chaum und Hatton, 2002). Auch wenn durch diesen Ansatz bis heute keine Erfolge bei der Heilung von Augenerkrankungen des Menschen zu vermelden sind, so wurde das Prinzip der Methode jedoch im Tiermodell etabliert (Bennett *et al.*, 2000). In dem *rd*-Mausmodell mit der autosomal rezessiven Mutation in der beta-Untereinheit der cGMP-Phosphodiesterase wurde durch einen Adenovirus das intakte Gen eingeschleust,

was zur Behebung der Netzhautdegeneration führte (Jomary *et al.*, 1997). Dieser somatische Gentherapie Ansatz war unter anderem auch in einem grösserem Tiermodell bei einem an LCA erkrankten Hund, mit Mutationen im *RPE65* Gen erfolgreich (Acland *et al.*, 2001). Die Methode der somatischen Gentherapie ist jedoch auch noch mit Nachteilen für die zukünftige Anwendung am Menschen behaftet. Zunächst muss die ursächliche Mutation beim Patienten identifiziert werden und die Therapie anschließend auf diese abgestimmt werden. Des Weiteren kann bei einer solchen Therapie auch immer eine erhöhte Immunantwort gegen den viralen Vektor ausgelöst werden, die beispielsweise in einem Versuch an einem Patienten mit der Stoffwechselerkrankung Ornithin-Transcarbamylase-Defekt (OTC) zum Tode führte (Raper *et al.*, 2002; Joos und Chirmule, 2003). An Tiermodellen wurde gezeigt, dass der Photorezeptorverlust bei allen Formen der RP über den programmierten Zelltodmechanismus (Apoptose) vonstatten geht. Dies liefert einen weiteren Ansatzpunkt für therapeutische Strategien mit antiapoptotischen Mitteln. Die Einschleusung des antiapoptotischen Genes *bcl-2* in die Netzhaut führte zum Beispiel zu einer Verzögerung der Degeneration der Photorezeptorzellen in der *rd/rd* Maus (Bennett *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1996; Joseph und Li, 1998). Des Weiteren verspricht man sich auch durch die Behandlung mit Wachstumshormonen die Lebensfähigkeit gefährdeter Photorezeptoren zu erhalten. Die Verabreichung von CNTF (ciliary neurotrophic factor) wurde bereits in verschiedenen Tiermodellen erfolgreich eingesetzt (Clarke *et al.*, 2000). Den aktuellen Stand klinischer Versuche ist auf folgender Internetseite zugänglich: <http://clinicaltrials.gov/ct/gui>. Daraus ist zu entnehmen, dass zur Zeit eine vielversprechende Pilotstudie an RP-Patienten mit einem Implantat (NT-501, Neurotech, USA) läuft, das CNTFR gezielt in die Retina freisetzt um die Degeneration der Photorezeptorzellen aufzuhalten.

Am Beispiel der RP ist zu sehen, wie wichtig die Identifizierung krankheits-assoziiertes Gene, die Aufklärung molekularer Pathogenesemechanismen und die klinischen Vorstudien bei der Entwicklung therapeutischer Strategien sind.

1.2.2 Kongenitale stationäre Nachtblindheit

Kongenitale stationäre Nachtblindheit (CSNB) bezeichnet eine klinisch unterscheidbare Gruppe von nicht progressiven retinalen Erkrankungen, deren Vererbung autosomal dominant (adCSNB), autosomal rezessiv (arCSNB) oder X-chromosomal (XLCSNB) sein kann. Bei der autosomal dominanten Form wurden Mutationen in den Genen *GNAT1*

(Nougaret-Typ, Cunier 1838; Dryja *et al.* 1996), *PDE6B* (CSNB3; Gal *et al.*, 1994) und *Rhodopsin* (RHO; al Jandal *et al.*, 1999) gefunden. Dem autosomal rezessiven Vererbungsmodus folgen Mutationen in den Genen *RDH5* (Retinoldehydrogenase 5; Gonzalez-Fernandez *et al.*, 1999) und *RHOK* (Rhodopsin Kinase; Yamamoto *et al.*, 1997). Durch genetische Kartierung von Familien mit XLCSNB konnten zwei Loci auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms ermittelt werden (Xp11.23 und Xp11.4) (Boycott *et al.*, 1998). Diese beiden Unterarten werden nach dem für Stäbchen-Photorezeptorzellen spezifischen Elektroretinogramm (ERG) in die komplette (CSNB1; MIM 310500) und inkomplette (CSNB2; MIM 300071) Form unterteilt (Miyake *et al.*, 1986). Während bei der inkompletten Form die Stäbchen-Adaption verlangsamt ist, fehlt sie bei CSNB1 vollständig. Die zapfenabhängigen Reizantworten sind nur bei der inkompletten Form reduziert (Abbildung 5). Des Weiteren wird CSNB1 mit Kurzsichtigkeit (Myopie) assoziiert, während bei CSNB2-Patienten sowohl Kurz- als auch Weitsichtigkeit (Hyperopie) auftreten können (Miyake *et al.*, 1986; Musarella *et al.*, 1989). Mittels Positionsklonierung wurde das Gen, das in CSNB2 Patienten mutiert ist, 1998 von Strom *et al.* und Bech-Hansen *et al.* identifiziert. Es handelt sich hierbei um ein Gen, das die α_1 -Untereinheit eines retina-spezifischen Kalzium-Kanals kodiert (*CACNA1F*). Das Gen, das bei CSNB1 Patienten mutiert ist, war zum Beginn dieser Dissertation noch nicht bekannt.

1.2.2.1 Klinische Befunde der CSNB1

Die CSNB1 gehört zu einer Gruppe von hereditären Netzhauterkrankungen, deren Hauptsymptom die Nachtblindheit darstellt. Es handelt sich dabei um eine „angeborene“ Funktionsstörung, jedoch mit einem relativ milden Phänotyp und wird dadurch in den ersten Lebensjahren oft nicht erkannt. Einen frühen Hinweis auf diese Netzhautfehlfunktion liefert der meist mit CSNB1 assoziierte Nystagmus (Augenzittern; Dry *et al.*, 1993; Heon *et al.*, 1994). Häufig werden bei CSNB1-Patienten neben der geringen bis hochgradigen Myopie auch okuläre Symptome wie Strabismus (Schielen) und die Verminderung der zentralen Sehschärfe bei normalem Farbsehen diagnostiziert (Heon *et al.*, 1994). Im Gegensatz zu anderen Netzhauterkrankungen, wie zum Beispiel der Retinitis pigmentosa, bei der der Augenhintergrund (Fundus) durch Pigmentunregelmäßigkeiten gekennzeichnet ist, sind bei CSNB1-Patienten meist keine Fundus-Auffälligkeiten zu erkennen (Morton 1893). Durch ERG Messungen können Patienten mit CSNB1 diagnostiziert werden. Dabei ist ein gestörtes Dämmerungssehen in der Dunkeladaptionsprüfung und im dunkeladaptierten Blitz-ERG zu beobachten. Die

Dunkeladaptionskurve zeigt einen monophasischen Verlauf mit erhöhter Endschwelle, typisch für eine normale Zapfenanpassung bei fehlender Stäbchenanpassung. Im dunkeladaptierten Blitz-ERG ist eine reine Stäbchenantwort grundsätzlich nicht ableitbar, während die Stäbchen- Zapfenantwort bei maximaler Blitzintensität das typische elektronegative Schubert-Bornschein-ERG zeigt, d.h. eine normale a-Amplitude bei verminderter b-Welle (Miyake *et al.*, 1986; Heon *et al.*, 1994) (Abbildung 5). Aufgrund dieser Daten wurde angenommen, dass CSNB1 durch einen Defekt bei der Weiterleitung von biochemischen Signalen von den Stäbchen zu den Bipolarzellen verursacht wird. Ein weiteres Anzeichen einer Reizleitstörung innerer Netzhautschichten als funktioneller Defekt der CSNB1 sind die nicht messbaren oszillatorischen Potenziale. Sie stellen kleine und schnelle Auslenkungen der aufsteigenden Flanke der b-Welle dar, die der Aktivität der inneren Netzhautschichten entspricht (Heckenlively *et al.*, 1983). Normale bis sehr gering reduzierte Antworten im helladaptierten Blitz-ERG und 30 Hz Flimmer-ERG lassen auf ein vorwiegend normales Zapfensystem schließen (Miyake *et al.*, 1987). Bei langer Anregung (0,6 sec) unter photopischen Bedingungen zeigen CSNB1-Patienten typischerweise jedoch eine Reduktion der ON-Antwort bei normaler OFF-Antwort, was neben dem Defekt des Stäbchensystems auch auf eine Reizleitungsstörung im Zapfensystem hindeutet (Kim *et al.*, 1997).

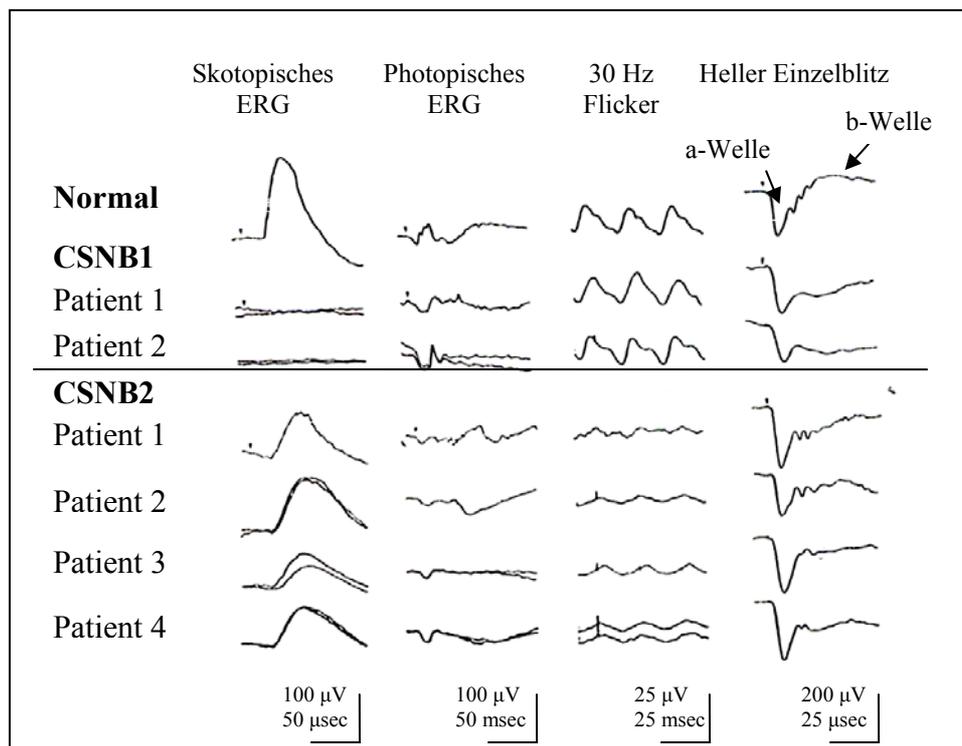


Abbildung 5: ERGs von Patienten mit CSNB1 und CSNB2

Abgebildet sind Standarddelektroretinogramme von CSNB1- CSNB2-Patienten und einer gesunden Person. Bei Patienten mit der kompletten Form (CSNB1) ist keine Stäbchenantwort (skotopisches ERG bei einer relativ guten Zapfenantwort (photopisches ERG und 30 Hz Flicker) detektierbar. Patienten mit der inkompletten Form weisen eine reduzierte b-Welle bei einer extrem verschlechterten Zapfenantwort auf. Ein heller Einzelblitz, der die Antworten der Zapfen und Stäbchen aktiviert, zeigt bei beiden Krankheiten ein negatives ERG. Die oszillatorischen Signale konnten nur bei CSNB2-Patienten gemessen werden. Entnommen und modifiziert aus einer Arbeit von Miyake *et al.*, 1994.

1.2.2.2 Genetische Kartierung des CSNB1-Lokus

Obwohl es bereits möglich war, mittels elektrophysiologischer Untersuchungen CSNB1 von CSNB2 zu unterscheiden (Miyake *et al.*, 1986), wurden aufgrund von mangelnden klinischen Daten viele Patienten nicht differenziert und als „CSNB-Patienten“ für Kopplungsanalysen verwendet. Nachdem eine Kopplung mit dem Locus für Farbblindheit schon 1940 von White ausgeschlossen wurde, konnte die Region für CSNB in ersten Kopplungsstudien auf Xp11 eingegrenzt werden (Gal *et al.*, 1989; Musarella *et al.*, 1989; Bech-Hansen *et al.*, 1990). Pearce *et al.* (1990) beschrieben bei XLCSNB-Familien eine klinische Überlappung zwischen der kompletten und inkompletten Form der CSNB. Dieser Befund wurde jedoch bisher in keiner weiteren Familie beschrieben. Im Jahre 1992 lokalisierten Mitarbeiter von Aldred und Bech-Hansen einen CSNB-Locus proximal zu MAOA und distal zu DXS426 in XLCSNB-Patienten, eine chromosomale Region, die

auch andere Studien bestätigten (Berger *et al.*, 1995). Nach Untersuchung an einer großen mennonitischen Familie mit drei Schwestern deren jeweilige Söhne betroffen waren, wurde erstmals von einem heterogenen CSNB-Lokus gesprochen (Bech-Hansen und Pearce 1993). Der Genort wurde proximal zu *TIMP-1* lokakisiert, zusätzlich zu einem schon früher beschriebenen Genort, der distal zu *TIMP-1* lag, (Musarella *et al.*, 1989, Aldred und Wright, 1991; Li *et al.*, 1991). Weitere Hinweise für genetische Heterogenität lieferten neu identifizierte Genorte auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms. So wurde eine Lokalisation von CSNB zwischen DMD44 und DXS7 in Xp21.1, in der Nähe des Genortes für RP3 beschrieben (Bergen *et al.*, 1995), was durch die Analyse einer weiteren Familie bestätigt wurde (Bergen *et al.*, 1996). Als CSNB4 wurde bei einer Familie, die den CSNB2 Phänotyp aufwies, ein neuer Genort eingeführt, der durch Kopplungsuntersuchungen zwischen den Markern DXS556 und DXS8080 in Xp11.4 – Xp11.3 kartiert wurde (Hardcastle *et al.*, 1997), ein Intervall, das mit dem Genort für eine Zapfendystrophie (COD1) überlappt. Erst mit der Untersuchung von elf Familien mit CSNB1 und 21 Familien mit CSNB2 konnte der endgültige Beweis dafür erbracht werden, dass tatsächlich zwei Genorte für XLCSNB auf dem kurzen Arm des menschlichen X-Chromosoms existieren (Bech-Hansen *et al.*, 1997; Boycott *et al.*, 1998; Rozzo *et al.*, 1999). Mit einer genetischen Haplotyp-Analyse in Familien mennonitischen Ursprungs wurde der Genort für CSNB2 schließlich auf eine Region von 1,2 Mb zwischen den Markern DXS277 und DXS255 eingegrenzt (Boycott *et al.*, 1998). Durch genetische Kartierung mit RFLP- und Mikrosatelliten-Markern konnte der Genort für CSNB1 auf Xp11.4 – p11.3 zwischen DXS556 und DXS228 kartiert werden. Eine umfassende Kopplungsanalyse in einer großen süddeutschen Familie führte zu einer weiteren Einengung des 5 cM Intervalls mit den begrenzenden Markern DXS8042 und DXS228. Durch Kopplungsstudien und Haplotypanalyse in schwedischen, holländischen und deutschen CSNB1-Familien konnte das Intervall schließlich zwischen den Markern DXS228 und DXS993 auf eine 1-2 cM große Region reduziert werden (Pusch *et al.*, 2001) (Abbildung 6).

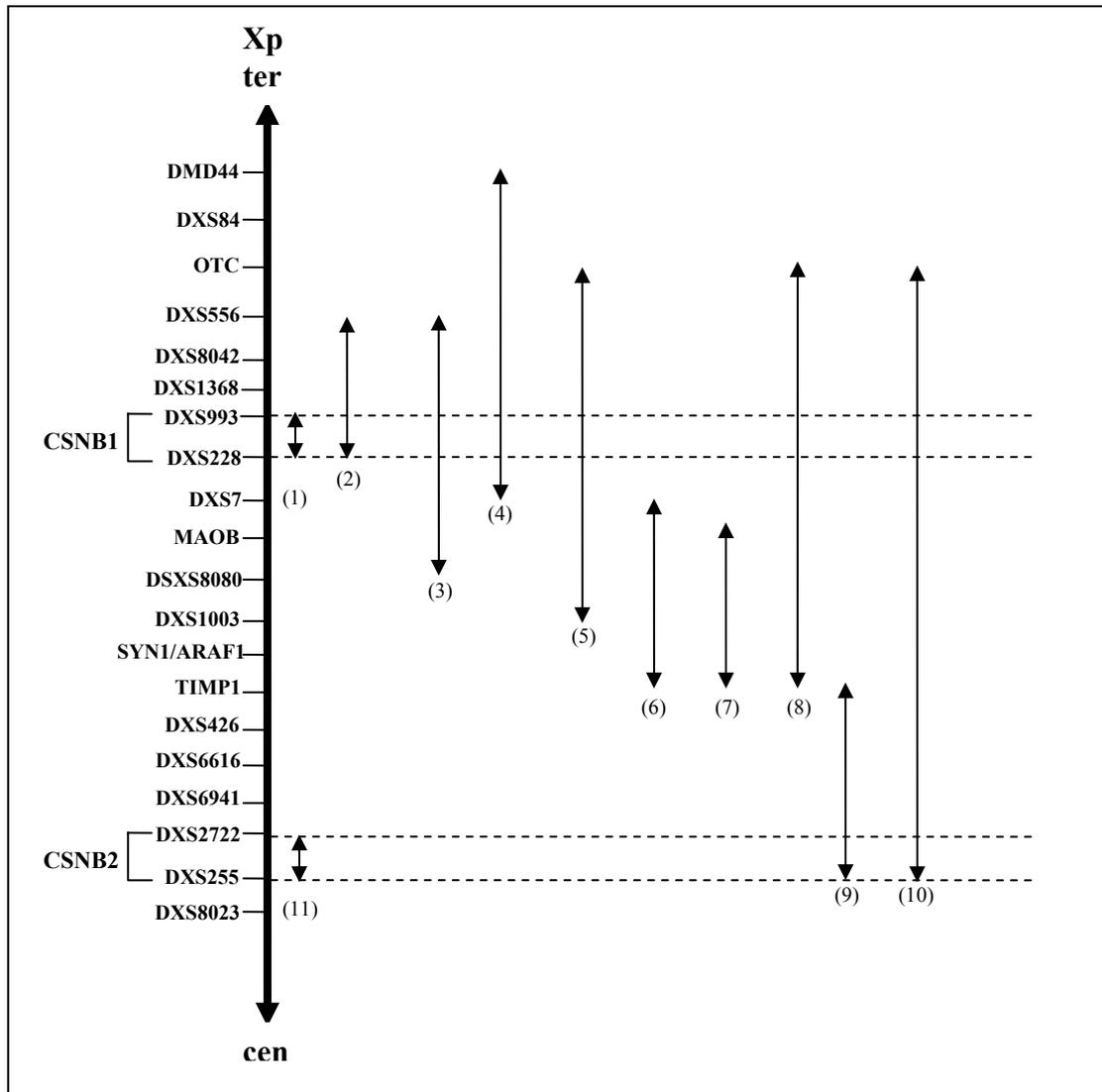


Abbildung 6: CSNB1 und CSNB2 Lokalisierung in Xp11 basierend auf Rekombinationsereignissen

Auf der linken Seite der Abbildung ist ein Teil des X-Chromosoms mit ausgewählten Markern dargestellt. Die Pfeile auf der rechten Seite des Chromosomenabschnitts geben, basierend auf informativen Rekombinationsereignissen aus unterschiedlichen Familien, Regionen für den CSNB1 bzw. CSNB2 Lokus an. Die Nummerierungen in Klammern unterhalb der Pfeile beziehen sich auf folgende Studien: (1): Pusch *et al.*, 2001; (2): Bech-Hansen *et al.*, 1997; Boycott *et al.*, 1998; Rosso *et al.*, 1998; (3): Hardcastle *et al.*, 1997; (4): Bergen *et al.*, 1995; (5): Berger *et al.*, 1995; (6): Bech-Hansen *et al.*, 1992; (7): Aldred und Wright 1991; (8): Li *et al.*, 1991; (9): Bech-Hansen *et al.*, 1993; (10): Gal *et al.*, 1989 und (11): Boycott *et al.*, 1998. Modifiziert nach Boycott *et al.*, 1998.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Durch genetische Kartierung in Familien mit X-chromosomaler kongenitaler stationärer Nachtblindheit konnten zwei unterschiedliche Loci auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms ermittelt werden (Boycott *et al.*, 1998). Diese beiden Unterarten können auch nach dem Stäbchen-Photorezeptorzellen spezifischen Elektretinogramm (ERG) in die komplette (CSNB1) und inkomplette (CSNB2) Form unterteilt werden. Während bei der inkompletten Form die Stäbchen-Adaption verlangsamt ist, fehlt sie bei CSNB1 vollständig (Miyake *et al.*, 1998; Ruether *et al.*, 1993). Mittels Positionsklonierung wurde das Gen, das in Patienten mit CSNB2 verändert ist, 1998 von Bech-Hansen *et al.* und Strom *et al.* identifiziert. Es kodiert für die $\alpha 1$ -Untereinheit eines Kalzium-Kanals (*CACNA1F*).

In dieser Arbeit sollten folgende Ziele verfolgt werden:

- Die Mutationsanalyse im *CACNA1F*-Gen
- Die Suche nach strukturellen Chromosomenaberrationen (Mikrodeletionen) in *CACNA1F*-negativen CSNB-Patienten zur Einengung des CSNB1-Lokus
- Die Identifizierung des *CSNB1*-Gens
- Die Klonierung des orthologen Gens der Maus
- Die Expressionsanalyse der identifizierten Gene
- Das Auffinden von Motiven der vorhergesagten Proteine mittels Datenbank-Analysen
- Die Untersuchung vorhergesagter Motive durch zelluläre Lokalisation der Proteine mittels transienter Expression in unterschiedlichen Zelltypen
- Die Regulation der Transkription der identifizierten Gene