

3 ERGEBNISSE

3.1 X-chromosomale kongenitale stationäre Nachtblindheit

Durch genetische Kartierung in Familien mit X-chromosomaler Nachtblindheit konnten zwei unterschiedliche Loci auf den kurzen Arm des X Chromosoms ermittelt werden, die als CSNB1 und CSNB2 bezeichnet wurden (Boykott *et al.*, 1998). Das Gen, das in Patienten mit CSNB2 mutiert ist, kodiert für die $\alpha 1$ -Untereinheit eines Retina-spezifischen Kalzium-Kanals (*CACNA1F*) (Bech-Hansen *et al.*, 1998; Strom *et al.*, 1998). Zu Beginn meiner Doktorarbeit war es nicht möglich, die uns zur Verfügung stehenden Patienten eindeutig einer der beiden X-chromosomalen CSNB-Loci mittels Elektoretinogram (ERG) zuzuordnen. Als Vorselektion für die Suche nach submikroskopischen Veränderungen im CSNB1-Intervall und zur Aufklärung des Mutationsspektrums im *CACNA1F*-Gen wurden die DNAs von 50 Patienten mit X-chromosomaler CSNB auf Mutationen in den 48 Exonen dieses Gens mittels SSCP-Analyse (engl.: Single Strand Conformation Polymorphismus) untersucht.

3.1.1 Mutationsanalyse von XLCSNB-Patienten-DNA in *CACNA1F*

Mutationen zeigten sich im veränderten Laufverhalten der PCR-Produkte im nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gel. Eine Mutation der Spleißakzeptorstelle von Exon 22, die bei Patient #3093 gefunden wurde, ist exemplarisch für die Detektion von DNA-Sequenzveränderungen mittels SSCP-Analyse in Abbildung 7 gezeigt (29. Spur). Die Sequenzierung der PCR-Produkte mit verändertem Laufverhalten ergaben bei insgesamt 11 Patienten unterschiedliche Mutationen (Tabelle 1), die nicht bei 100 Kontroll-Chromosomen identifiziert wurden. Diese Patienten-DNAs mit einem Defekt in *CACNA1F* wurden nicht in die Suche nach Mikrodeletionen, bzw. -insertionen im CSNB1-Intervall einbezogen.

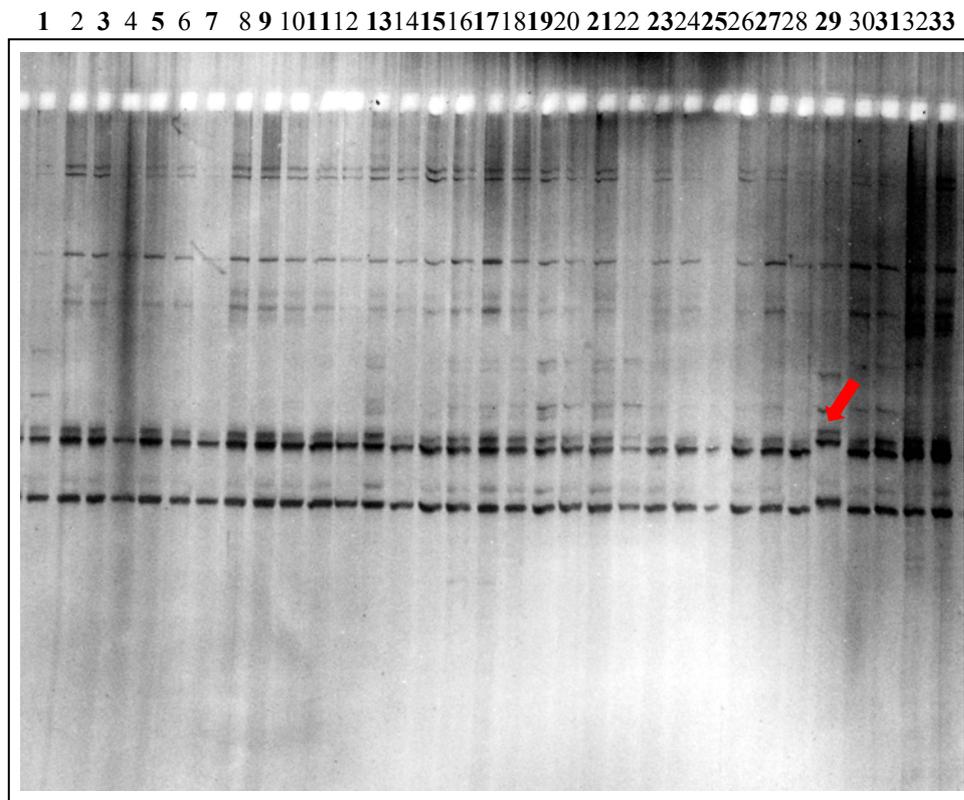


Abbildung 7: SSCP-Analyse von XLCSNB Patienten in *CACNA1F*

Exon 22 und flankierende Intronsequenzen des *CACNA1F*-Gens wurden auf 50 XLCSNB-Patienten-DNAs PCR- amplifiziert und mittels SSCP-Analyse auf Aberrationen untersucht. Dargestellt ist ein Ausschnitt von 33 untersuchten Proben. Das in Spur 29 aufgetragene PCR-Produkt zeigt eine eindeutige Veränderung im Laufverhalten (roter Pfeil). Die anschließende Sequenzierung ergab eine Mutation in der Spleißakzeptorstelle von Exon 22.

Tabelle 1: Mutationen im *CACNA1F*-Gen

Zelllinien-Nr.	Exon	Mutation	Protein
3097	10	1282C>T	Q428X
2679	14	1840C>T	R614X
2477	21	2650C>T	R884X
3093	22	2674-3delCA	Spleißakzeptor-Mutation
X	27	3133 3134insC	L1045fsX1055
2680	27	3203T>C	L1068P
2537	28	3277T>C	H1092H
2417	31	3761G>T	S1254I
2490	33	3853C>A	R1285S
2694	35	4042C>T	Q1348X
2496	48	5756G>A	R1919H

3.2 Klonierung des CSNB1-Gens

Der erste Schritt bei der Klonierung eines krankheitsassoziierten Genes stellt die möglichst exakte Kartierung mittels genetischer Kopplungsanalyse dar. Häufig führt dieser positionelle Klonierungsansatz zu einem mehreren cM großen Kopplungsintervall, das durch die Identifizierung chromosomaler Aberrationen eingengt werden kann. Mittels Kartierung und Haplotypenanalyse in deutschen, holländischen und schwedischen Familien konnte das kritische Intervall des CSNB1 Lokus in Xp11.4 auf einen Bereich von 1-2 cM zwischen den Marker DXS993 und DXS228 lokalisiert werden (Pusch *et al.*, 2003).

Submikroskopische Veränderungen wie kleine Deletionen oder Insertionen können relevante Chromosomenabschnitte von mehreren Mbp auf wenige kbp eingrenzen. Mit Hilfe der YRH (YAC Representation Hybridization; Roepman *et al.*, 1996; Schwahn *et al.*, 1998), Hybridisierung von BACs und PACs und genspezifischen Sonden können Veränderungen dieser Art detektiert werden.

3.2.1 Untersuchung auf submikroskopische Veränderungen im CSNB1 Lokus

Für den größten Teil des 1-2 cM großen CSNB1-Intervalls, das mittels genetischer Kartierung identifiziert worden war, konnte auf DNA-Sequenzdaten vom Sanger Zentrum zurückgegriffen werden (<http://webspacer.sanger.ac.uk/cgi-bin/ace/simple/Xace>). Mit Hilfe von Genvorhersageprogrammen wurden Sequenzen aus dem Kopplungsintervall in Xp11.4 analysiert und insgesamt 6 Kandidatengene ermittelt (Abbildung 8). Dabei handelte es sich um *IPPH2*, einem homologen Gen von *IPP2* (protein phosphatase inhibitor subunit 2), *GPR34* (G protein-coupled receptor 34), *CASK* (calcium/calmodulin serine-dependent protein kinase), um ein homologes Gen von *GARP* (glutamic acid/alanine-rich protein), *DDX 3* (Dead/H box 3) und *DFFRX* (*Drosophila* fat facets related on chromosome X). Mit vorhandenen YACs, PACs und BACs konnten die Sequenzdaten zu einem fast vollständigen Kontig assembliert werden.

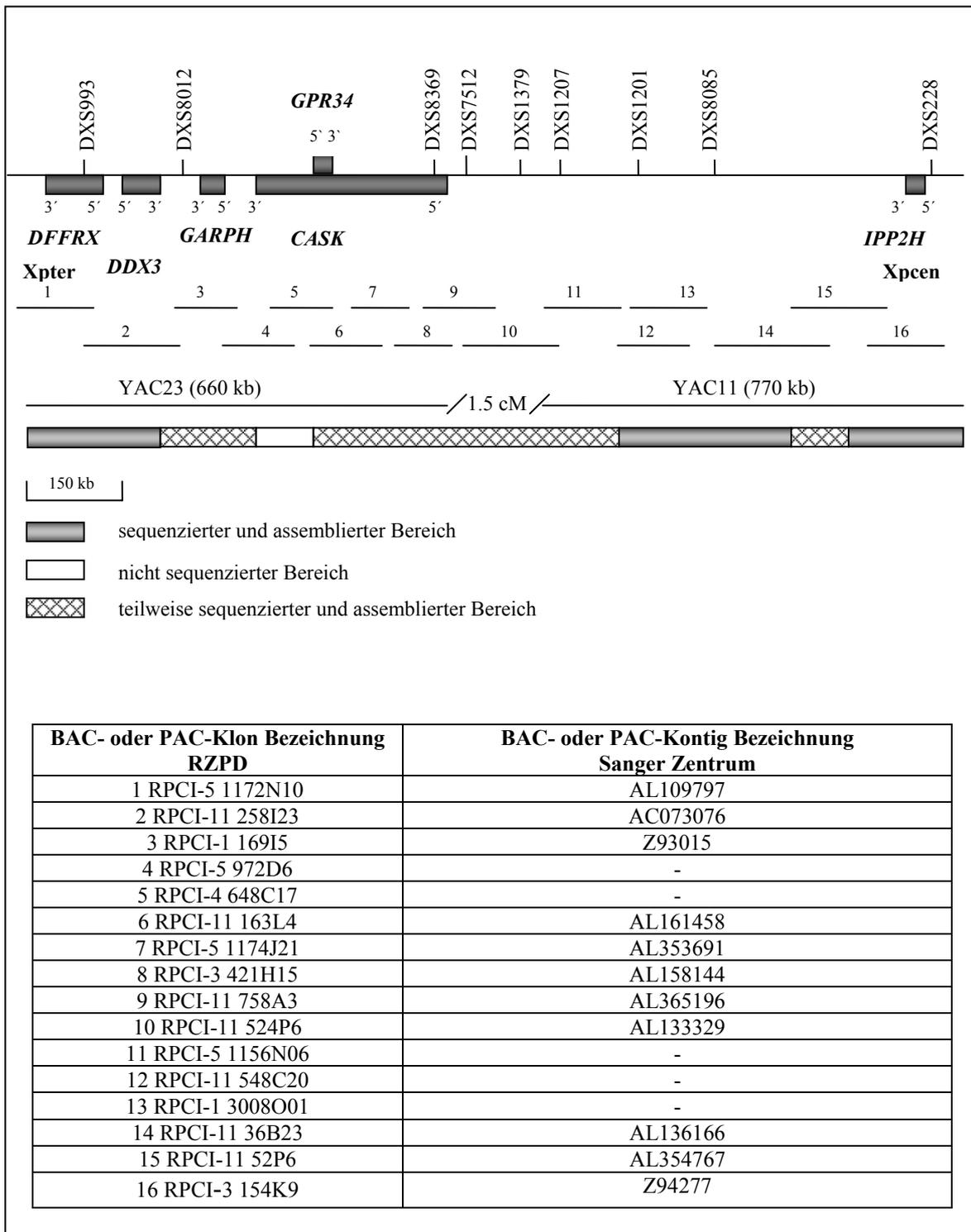


Abbildung 8: Physikalische Kartierung des ca. 1.5-Mb großen CSNB1-Intervalls

Ein YAC-, PAC- und BAC-Kontig zwischen den Markern DXS993 und DXS228 wurde assembliert und analysiert. Bekannte Gene, STS Marker als auch PAC- und BAC-Klone (RZPD, Berlin) sind in diesem Bereich eingezeichnet und wurden für die Detektion submikroskopischer Aberrationen eingesetzt. Die Sequenzdaten der Kandidatengene *IPPH2*, *CASK*, *GPR34*, des *GARP* Homologen, *DDX3* und *DFFRX* waren vom Sanger Zentrum öffentlich zugänglich.

Mittels YRH, Hybridisierung von PACs, BACs und genspezifischen Sonden auf Southern-Blots, wurden Deletionen in einem der Kandidatengene in zwei unterschiedlichen Familien

nachgewiesen (Abbildung 9). Es handelte es sich hierbei um DNA Proben der *GARP*-homologen Sequenz auf PAC RPCI-1 16915 (z93015). Vorhersageprogramme deuteten daraufhin, dass das Gen, welches *NYX* (Nyctalopin on chromosome X) benannt wurde, aus 3 Exonen besteht, wobei der offene Leserahmen (ORF aus dem englischen: Open Reading Frame) in den Exonen 2 und 3 liegt. Der ORF hat insgesamt eine Länge von 1443 nt und kodiert für 481 Aminosäuren.

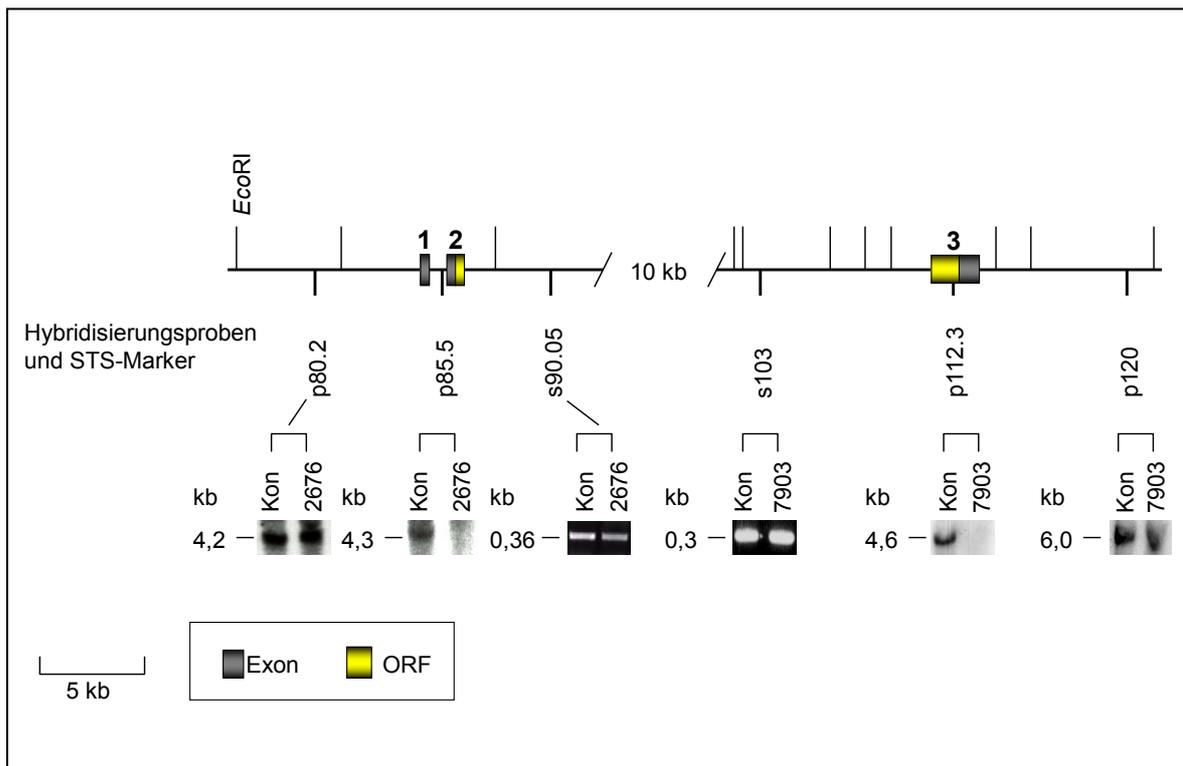


Abbildung 9: Hybridisierung und PCR-Analyse *GARP*-homologer Sequenzen und STS-Marker zur Identifizierung submikroskopischer Veränderungen

Durch Hybridisierung der Proben p85.5 und p112.3 auf Southern-Blots mit *EcoRI* geschnittener DNA von CSNB-Patienten konnten bei 2 Familien (2676 und 7903) Deletionen ermittelt werden. Bei Patient 2676 ist das erste und zweite Exon deletiert, während Patient 7903 in Exon 3 eine Deletion aufweist. Diese wurden durch Hybridisierung einzelner Proben oder PCR auf jeweils 3,8 kb eingegrenzt.

3.2.2 Mutationsanalyse von XLCSNB-Patienten-DNA in NYX

Patienten DNAs, die keine Mutationen im *CACNA1F*-Gen oder submikroskopische Veränderungen in *NYX* aufzeigten, wurden mittels SSCP-Analyse oder direkter Sequenzierung (Abbildung 10) analysiert. Hierbei konnten 16 weitere Mutationen identifiziert werden (Tabelle 2), die nicht bei 100 Kontroll-Chromosomen auftraten. Es handelte sich dabei um drei Deletionen und eine Insertion kompletter Kodons (I101del, ERLA114_118del, AELP243_246del und LRR207_208ins), um eine Deletion die in der Trunkierung des Proteins resultierte, um eine Nonsense-Mutation (C35X), und um zehn Mutationen, die zu einem Aminosäureaustausch führten (C31S, P57T, A64E, A143P, P175R, A187K, L307P, N312S, L347P und G370V). Außerdem wurden zwei Polymorphismen in Exon 1 identifiziert, die in mindestens 3 Patienten-DNAs, sowie in einer Kontroll-DNA vorhanden waren (Tabelle 3).

Tabelle 2: Mutationen in NYX

Patient	Exon	Mutation	Protein
2676	1-2	exon 1-exon2del	Nicht bekannt
7903	3	exon 3-3'UTRdel	trunkiert
CSNBX	3	1122_1457del336	S374_D481del
2438B 5886, 5884	3	92G>C	C31S
2698, 2683	3	105C>A	C35X
2436	3	169C>A	P57T
2454	3	191C>A	A64E
3200	3	301_303delTCA	I101del
5387	3	340_354del15	E114_A118del
2689	3	427G>C	A143P
2675, 2677 2996, 2999	3	524C>G	P175R
9069	3	559_560GC>AA	A187K
9373	3	621_622ins9	R207_L208insLRR
5889	3	727_738 del12	A243_P246del
8292	3	920T>C	L307P
2491, 3445	3	935A>G	N312S
2422, 2423	3	1040T>C	L347P
2618	3	1109G>T	G370V

Tabelle 3: Polymorphismen in NYX

Patient	Exon	Mutation	Protein
2446 2454 2516	1	5'UTR-314A>G; 5'UTR-279T>C	Keine Veränderung

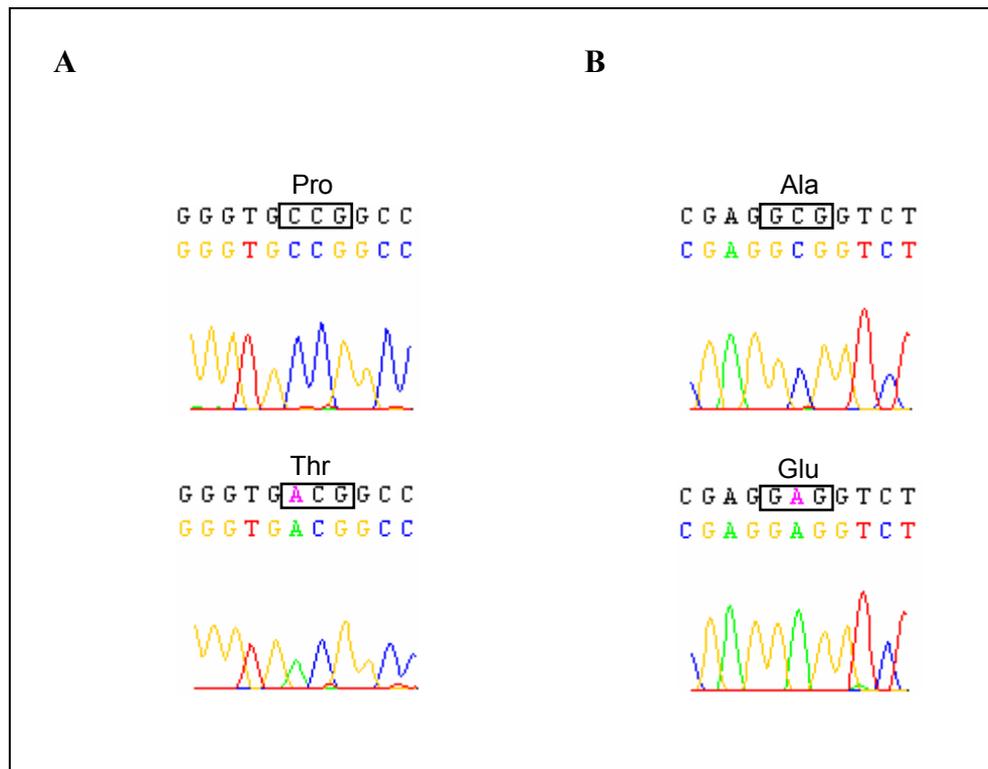


Abbildung 10: Direkte Sequenzierung der PCR-Produkte von Patienten-DNAs in NYX

Dargestellt sind exemplarisch die Sequenzen von zwei Mutationen in zwei unterschiedlichen Patienten. A) Der Nukleotidaustausch in Patient 2436 hat einen Prolin nach Threonin Austausch zur Folge. B) Der Nukleotidaustausch in Patient 2454 hat einen Alanin nach Glutamin Austausch zur Folge.

3.2.3 Expressionsanalyse von NYX

Um das Expressionsmuster von *NYX* zu untersuchen, wurden sowohl Northern-Blots mit poly(A)⁺ RNA, als auch Gesamt-RNA aus unterschiedlichen menschlichen Geweben mit einer 800 bp *NYX*-Sonde (Kodons 242-481 und 3'-UTR) hybridisiert. Da kein klares Hybridisierungssignal detektiert werden konnte, wurden RT-PCRs mit Primern in Exon 2 und Exon 3 von unseren Kooperationspartnern in Tübingen (Dr. Carsten Pusch) auf RNAs aus unterschiedlichen humanen Geweben durchgeführt. Da nach der ersten PCR kein Produkt sichtbar war, wurde eine zweite Amplifikation mit einem nach innen verschobenen Primer durchgeführt (engl.: nested PCR). Durch diese Methode konnte gezeigt werden, dass *NYX* nahezu ubiquitär, wenn auch schwach exprimiert ist. Neben einem Amplifikationsprodukt in der Retina konnte *NYX* auch in anderen Geweben nachgewiesen werden (Abbildung 11A).

RT-PCR-Experimente mit Primern in Exon 1 und Exon 2 zeigte in einigen Geweben eine Spleißvariante im nicht translatierten 5' Bereich (engl.: 5'UTR, 5' untranslated region) (Abbildung 11B). Beide Produkte wurden sequenziert und konnten mit der genomischen Sequenz verglichen werden. Die Spleißvariante I besteht aus Exon 1a, 2 und 3, während die zweite Spleißvariante (II) aus Exon 1b, Exon 2 und Exon 3 besteht und um 457 bp größer als die erste ist. In der Spleißvariante II wird das Intron 1 nicht gepleißt, d.h. es wird ein durchgehender 5'UTR generiert, der eine Länge von 457 bp hat. Zur Ermittlung des vollständigen *NYX*-Transkripts wurden 5'- und 3'RACE-PCR (engl.: rapid amplification of cDNA ends) Experimente durchgeführt. Die Amplifikate wurden sequenziert und ergaben eine 2713 bp große mRNA (GenBank Nr. AJ278865).

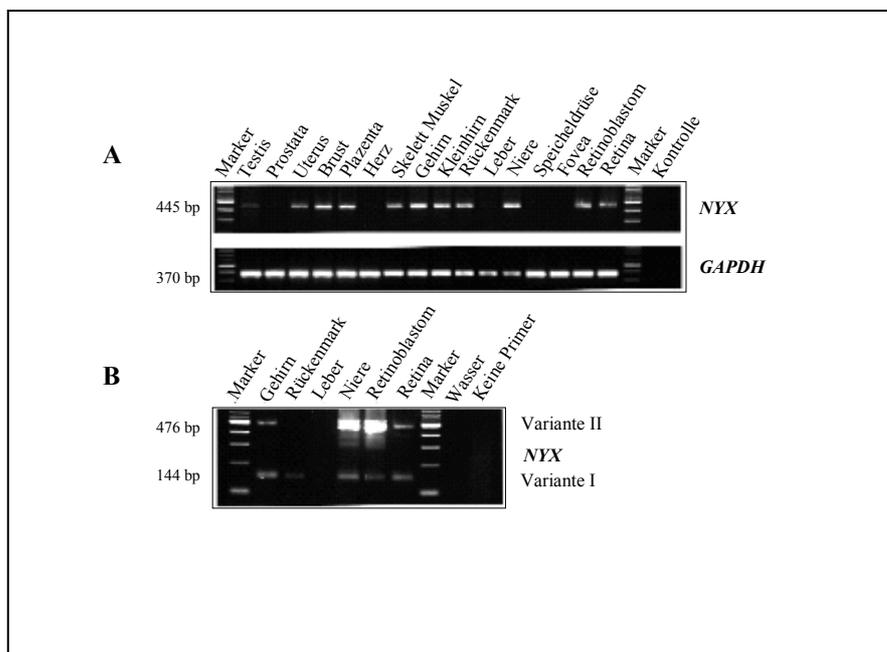


Abbildung 11: RT-PCR-Analyse der *NYX* Expression

a) Nested RT-PCR auf RNA aus verschiedenen humanen Geweben mit Primern in Exon 2 und Exon 3. Es liegt eine nahezu ubiquitäre Expression von *NYX* vor.
b) Nested RT-PCR mit Primern in Exon 1 und Exon 2 zeigt alternative Spleißvarianten (476 und 144 bp) im 5'UTR von *NYX*.

3.3 Klonierung und Charakterisierung des *Nyx*-Gens der Maus

3.3.1 Isolierung des *Nyx*-Gens der Maus

Durch die Hybridisierung einer humanen 800 bp *NYX*-Probe aus Exon 3 (Kodons 242-481 und 3'UTR) auf Koloniefilter einer genomischen Maus-PAC-Bibliothek (engl.: P1 artificial chromosome) wurden 3 Klone identifiziert (RCIP711E08307Q2, RCIP711P05307Q2 und RPCIP711A10324Q2). Die DNAs der ersten beiden PAC-Klone konnte nicht extrahiert werden, da hier eine *Pseudomonas* Kontamination vorlag. Mittels

Hybridisierung der oben genannten Sonde auf einen *EcoRI*-Southern-Blot des dritten Maus-PACs, konnte ein ca. 7 kb großes Fragment ermittelt werden (Abbildung 12A). Als positive Kontrolle diente die DNA des *EcoRI*-verdauten humanen PACs (RPCI-1 169I5). Das 7 kb *EcoRI*-Fragment wurde in den Plasmidvektor pBlueskript II SK+/- subkloniert und mit *PstI* verdaut. Dabei entstanden 4 unterschiedlich große Fragmente (ca. 8,0; 0,9; 0,8 und 0,6 kb) (Abbildung 12B), wobei der Vektor mit Insert (8 kb) religiert und die kleineren Banden kloniert und sequenziert wurden. Dadurch konnten 1410 bp Sequenz ermittelt werden, die eine 85%-ige Identität zu Exon 3 des humanen *NYX*-Gens zeigt. Das 0,9 kb große Fragment entsprach einem kleinen Teil Vektor- und Intron 2 Sequenz, während durch die 0,6 und 0,8 kb großen Fragmente das Mittelstück von Exon 3 ermittelt werden konnte. Der 8 kb große Klon lieferte nur mit dem Vektorprimer M13 REV genspezifische Sequenzinformation (Abbildung 12C).

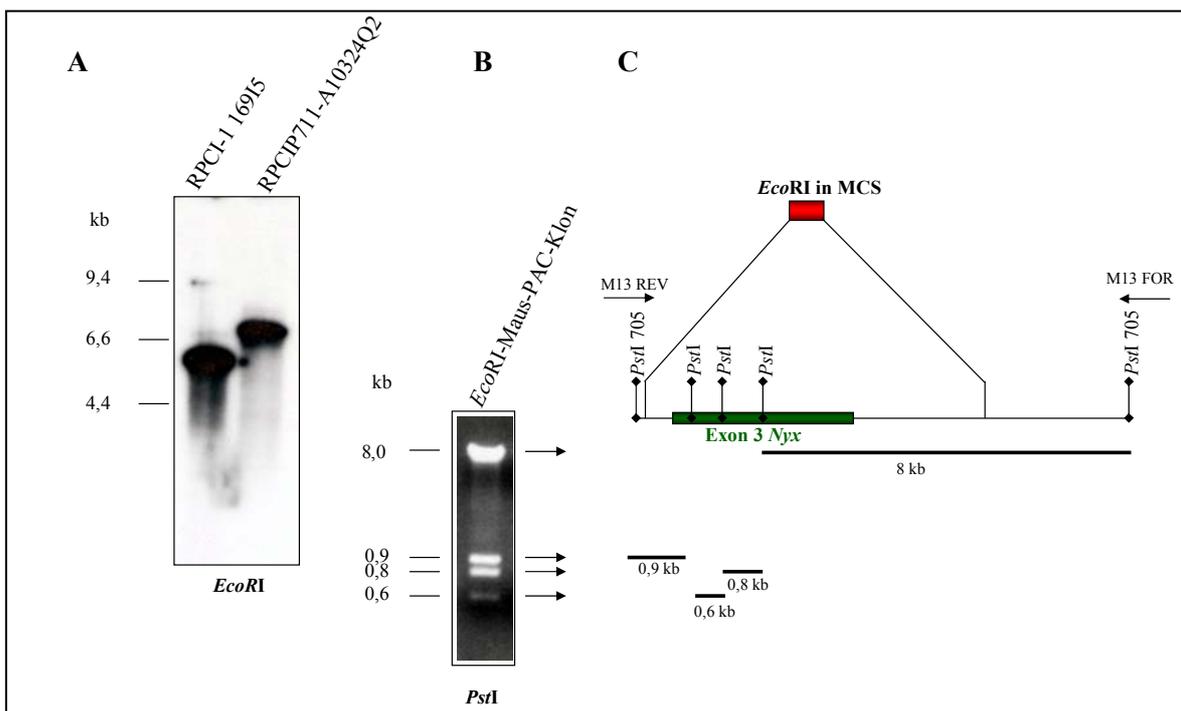


Abbildung 12: Southern-Blot-Hybridisierung zur Detektion von *Nyx* und Isolierung von *PstI* Fragmenten

A) Mittels Hybridisierung einer genspezifischen humanen Probe auf einen *EcoRI*-Southern-Blot des Maus PAC-Klons wurde ein 7 kb Fragment ermittelt (rechte Spur). Der humane PAC diente als Kontrolle (linke Spur). B) Das 7 kb *EcoRI* Fragment wurde in den etwa 3 kb großen pBluescript II KS Vektor +/- subkloniert und mit *PstI* verdaut. Dies resultierte in 4 unterschiedlichen Produkten. Die ca. 8 kb große Bande repräsentiert Vektor mit einem etwa 5 kb großen Insert. C) Religierter Vektor und die kleineren Fragmente wurden isoliert und sequenziert, wodurch die Sequenzinformation des kompletten Exon 3' und flankierende Intronsequenzen des Maus *Nyx*-Gens ermittelt wurden.

3.3.2 Generierung der vollständigen Sequenz des Maus *Nyx*-Gens

Mittels der nun partiell bekannten genomischen Sequenz wurden Primer synthetisiert, um die vollständige cDNA des Maus *Nyx*-Gens aus revers-transkribierter Gesamt-RNA aus Mausaugen mit 5'- und 3'- RACE (engl.: rapid amplification of cDNA ends) Experimenten zu ermitteln. Die ermittelte cDNA besteht aus 5428 bp (*Genbank*, AY114303) und kodiert für ein Protein mit 476 Aminosäuren (Position 1917-3347 der cDNA). Das Maus *Nyx*-Gen besteht aus 4 Exonen (Exon 1a, Exon 1, Exon 2 und Exon 3), wobei auch hier der ORF in den Exonen 2 und 3 liegt. Ein Vergleich der Maus Sequenz mit der humanen zeigte eine 85%-ige Identität im offenen Leserahmen (engl.: open reading frame). *In silico* Analysen mit dem assemblierten Maus Genom lokalisiert *Nyx* in die Nähe des Zentromers des Maus X-Chromosoms, in die Nähe von *Cask*. Die Nachbarschaft dieser beiden Gene wurde auch durch die Hybridisierung des humanen *CASK*-Gens auf den *Nyx* enthaltenden Maus-PAC Klon gezeigt. Folglich liegt *Nyx* in der Region des Maus X-Chromosoms, die syntenisch zu p11.4 des humanen X-Chromosoms ist.

3.3.3 Expressionsanalyse von *Nyx*

Ein Maus poly(A)+ Northern-Blot wurde mit dem 0,6 kb *Pst*I-Fragment aus Exon 3 des *Nyx*-Gens hybridisiert. Es konnten unterschiedlich große Transkripte in verschiedenen Mausgeweben identifiziert werden. Auch die Expressionsstärke variierte. Ein starkes Signal mit einer Größe von mehr als 9 kb konnte im Auge und zwei in der Leber detektiert werden, während der Filter noch jeweils zwei weitere schwache Signale im Auge und Testis aufzeigt (1,8 kb und 4 kb bzw., 1,0 kb und 3,5 kb) (Abbildung 13A). Als Kontrolle für die Beladung der Mengen an poly(A)+-RNA wurde eine *Gapdh*-Sonde auf den Filter hybridisiert. Ein „virtueller Augen Northern-Blot“ (freundlicher Weise von Dr. Steffen Lenzner zur Verfügung gestellt), ergab mit der gleichen Hybridisierungssonde ein ca. 1.8 kb großes Transkript (Abbildung 13B). Dabei handelte es sich um einen Filter, der cDNA von Maus Augen RNA enthält, die nach dem SMART™-Verfahren hergestellt worden ist, wobei die RNA von vier unterschiedlichen Mäusen stammt. RT-PCR Experimente mit Primern in Exon 2 und Exon 3 des *Nyx*-Gens auf cDNA von unterschiedlichen Mausgeweben zeigte, dass *Nyx* nahezu ubiquitär exprimiert ist. Im Gegensatz zu Studien über die *NYX* Expression in humanen Geweben musste hier die Strategie der nested PCR nicht angewendet werden. Neben einem Amplifikationsprodukt im Maus Auge konnte *Nyx* auch im Gehirn, Lunge, Milz und Testis, aber nicht in Niere, Herz und Leber

nachgewiesen werden (Abbildung 13C). Diese Expressionsergebnisse gleichen, abgesehen von der fehlenden Expression von *Nyx* in der Niere, denen im menschlichen Gewebe.

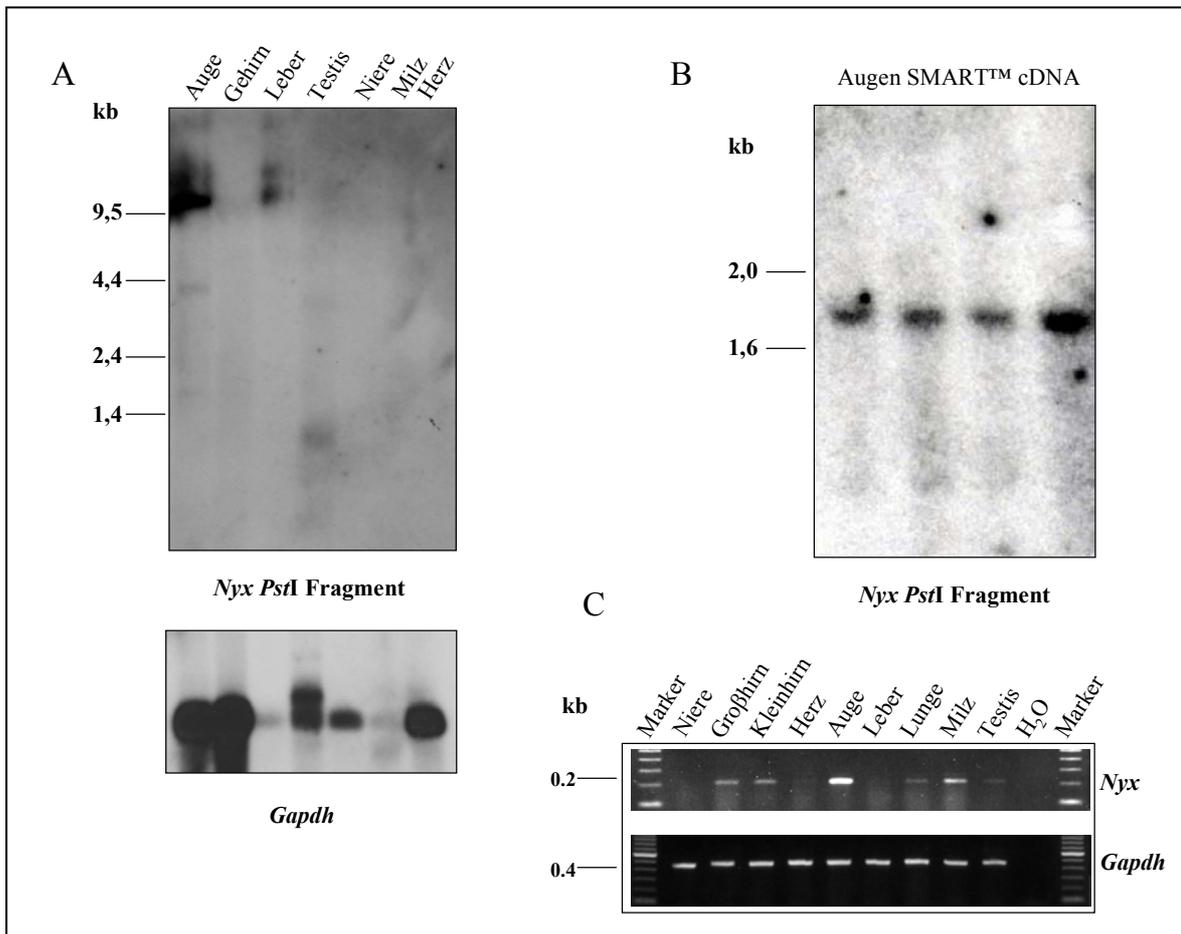


Abbildung 13: Analyse der *Nyx* Transkription

A) Maus poly(A)⁺-RNA aus verschiedenen Geweben wurde mit der 0,6 kb großen *PstI*-Sonde aus Exon 3 hybridisiert. Es wurden drei unterschiedliche Transkripte in Auge (> 9,5 kb, 4 kb und 1,8 kb), zwei in Leber (> 9,5 kb) und zwei schwache Signale in Testis (3,5 kb und 1,0 kb) detektiert. Die *Gapdh*-Sonden-Hybridisierung diente als Kontrolle. B) Ein Blot mit Maus Augen SMART™ cDNA von vier verschiedenen Tieren wurde mit der gleichen Sonde wie in A) hybridisiert und ein Signal bei 1,8 kb detektiert. C) RT-PCR mit Primern in Exon 2 und Exon 3 zeigte eine nahezu ubiquitäre Expression von *Nyx*. Neben einem Amplifikationsprodukt in Maus Auge konnte *Nyx* auch im Gehirn, Lunge, Milz und Testis, aber nicht in Niere, Herz und Leber nachgewiesen werden.

3.4 Antikörper gegen NYX

Für die funktionellen und Lokalisations-Untersuchungen des NYX-Proteins in komplexen Proteinpräparaten und histologischen Schnitten sollte ein spezifischer Antikörper gewonnen werden. Zur Herstellung polyklonaler Antikörper gibt es unterschiedliche methodische Ansätze. Ausgewählte Sequenzabschnitte des Proteins können in *E.coli* überexprimiert werden. Die in großen Mengen gewonnenen und danach aufgereinigten Proteine können dann für die Immunisierung eingesetzt werden. Eine andere Variante ist die Gewinnung von Antiseren gegen kurze synthetische Peptidsequenzen eines Proteins. Beide Methoden wurden in dieser Arbeit angewendet. Es wurden drei unterschiedliche *E. coli* Proteine für die Immunisierung eingesetzt (pQE-NC, pQE-N und pQE-C, Abbildung 14A), wobei nur das Antiserum aus der Immunisierung mit dem C-terminalen Teil von NYX eine Bande mit erwarteter Größe im Western-Blot mit *E. coli* Gesamt- Protein oder aufgereinigtem NYX zeigte (Abbildung 14B). Kein spezifisches Signal konnte jedoch im Western mit Gesamtprotein aus lymphoblastoiden Zelllinien von Patienten und gesunden Personen detektiert werden. Eine Aufreinigung der Antiseren gegen die Proteine, bzw. Peptide, die als Antigen für die Immunisierung verwendet wurden, führte nicht zur gewünschten Spezifität des Antiserums. Alle Antikörper zeigten Kreuzreaktionen gegen unterschiedliche Proteine. Auch die Immunisierung mit synthetischen Peptiden war nicht erfolgreich. Die affinitäts-aufgereinigten Antiseren konnten weder im Western-Blot mit Protein aus EBV-transformierten lymphoblastoiden Zelllinien von Patienten und gesunden Personen (Abbildung 14C), noch mit transient überexprimiertem Protein aus HeLa oder COS-7 Zellen ein spezifisches Signal mit der zu erwartenden Größe detektieren. Auch Immunfluoreszenz-Studien mit überexprimiertem NYX-Protein in HeLa oder COS-7 Zellen zeigte nur Kreuzreaktionen, aber kein spezifisches Signal (Abbildung 14D).

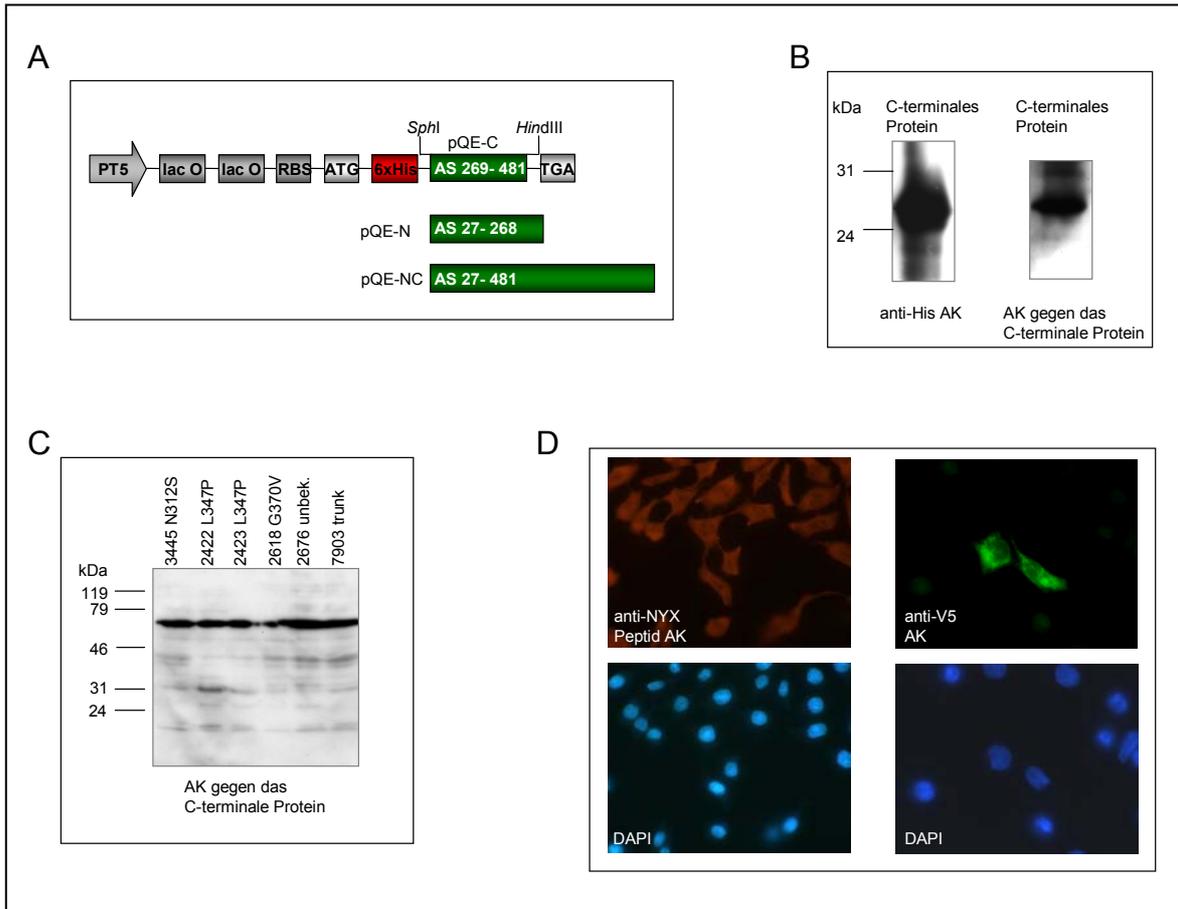


Abbildung 14: Spezifität der Antikörper gegen NYX

A) Dargestellt ist das C-terminale Konstrukt für die *E. coli* Expression der AS 269-481 (pQE-C) des humanen NYX-Proteins. Das Plasmid enthält einen T5 Promotor (PT5), zwei Lac O Operatoren (lac O), eine ribosomale Bindungsstelle (RBS), ein Startcodon (ATG), einen Sequenzabschnitt, der für sechs Histidine, zur Aufreinigung und Erkennung des Proteins kodiert, die *SphI-HindIII* klonierte C-terminale Sequenz von NYX und ein Stopp Kodon. Darunter sind die beiden anderen Sequenzabschnitte des NYX Proteins dargestellt, die anstelle des C-terminalen Bereichs in den Vektor kloniert worden sind. Sie resultieren in einem N-terminalen Konstrukt (AS 27-268, pQE-N) und in dem Volllängenkonstrukt ohne Signalsequenz (AS 27-481) (pQE-NC). B) In der linken Spalte wurde aufgereinigtes C-terminales Protein mit einem anti-His Antikörper im Western-Blot bei einer Größe von erwarteten 24 kDa nachgewiesen. Dieses Protein konnte auch mit dem gegen das C-terminale Protein gerichteten Antikörper bei einem Titer von 1:5000 detektiert werden. C) Der gegen das C-terminale Protein gerichtete Antikörper zeigte kein spezifisches Signal im Western-Blot mit Proteinen präpariert aus EBV-transformierten lymphoblastoiden Zellen von CSNB1-Patienten. Als Negativ-Kontrolle diente die Zelllinie 7903. Da in der DNA dieses Patientens eine Exon 3 Deletion vorliegt, sollte kein NYX-Protein mit dem pQE-C-AK bei etwa 53 kDa sichtbar sein. Es ist aber kein Unterschied zu den anderen Proteinpräparationen sichtbar. D) V5-NYX überexprimierende COS-7 Zellen wurden mit affinitäts-aufgereinigtem Peptid Antikörper gegen endogenes NYX-Protein getestet. Mit dem anti-NYX Peptid Antikörper wurde in allen Zellen ein diffuses Signal detektiert (rot). Als Positiv-Kontrolle diente der spezifische anti-V5 Antikörper (grün). Nur die V5-NYX exprimierenden Zellen zeigten ein spezifisches Signal. Unter diesen Färbungen sind jeweils die DAPI-Färbungen der Zellkerne dargestellt.

3.5 Molekulare Charakterisierung des NYX-Proteins in Mensch und Maus

3.5.1 Studien der Eigenschaften und funktionellen Domänen von Nyctalopin

Mittels öffentlich zugänglichen Computer-Programmen können Eigenschaften und Motive eines Proteins vorhergesagt werden, die zur Aufklärung der Funktion beitragen (<http://www.expasy.org>). Das humane *NYX*-Gen kodiert für ein Protein mit 481 Aminosäuren während die vorhergesagte Peptidsequenz des Maus Proteins 5 Aminosäuren kürzer ist (Abbildung 15). Die beiden Proteine weisen mit 52,0 und 52,3 kDa ein ähnliches relatives Molekulargewicht auf. Auch der isoelektrische Punkt ist mit 9,1 beim humanen NYX-Protein im Vergleich zu 8,88 beim Maus Protein vergleichbar. Sequenzvergleiche zeigen, dass es sich sowohl beim humanen als auch beim Maus Nyctalopin um ein Protein aus der LRR (engl.: leucine-rich repeat) Superfamilie handelt, die aus 11 typischen Leucinreichen Wiederholungen und 2 flankierenden Cysteinreichen Leucinreichen Wiederholungen bestehen. Typische LRR Motive bestehen aus 22-24 Aminosäureresten, die in alternierenden Segmenten als kurzes β -Faltblatt, Knäuelkonformation, α -Helix und einer zweiten Knäuelkonformation strukturiert sind. Proteine der LRR-Familie können eine sehr unterschiedliche Funktion und zelluläre Lokalisierung zeigen (Kobe und Deisenhofer, 1994). Außerdem wurden für das humane Polypeptid eine N-terminale Signalsequenz und ein C-terminaler Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Anker als funktionelle Domänen vorhergesagt. Ein N-terminales Signalpeptid, auch Leitsequenz genannt, kann aus 13-36 Aminosäuren bestehen und ist für die Synthese von sezernierten ER- und lysosomalen Proteinen und vieler Transmembranproteine verantwortlich (Blobel, Nobelpreisverleihung für die Signal-Hypothese, 1999). Proteine, die ein GPI-Motif haben, sind durch ihre Verankerung an der Außenseite der Plasmamembran charakterisiert (Ferguson, 1992). Die Position 455 des vorhergesagten Polypeptids stellt mit größter Wahrscheinlichkeit die Spaltungsstelle des Ankers dar, sodass NYX durch die Aminosäuren GAG an der Membran verankert wird. Obwohl die N-terminale Signal Sequenz auch für das Maus Polypeptid vorhergesagt wird, weisen Computer-Programme darauf hin, dass es sich bei der C-terminalen Sequenz nicht um einen GPI-Anker handelt. Diesen Programmen liegen zugrunde, dass ein GPI-Anker eine potentielle Spaltungsstelle und eine ausreichend hydrophobe und hydrophile C-terminale Sequenz besitzen muss. Zwar wird für Nyx eine solche Spaltungsstelle vorhergesagt, aber der C-terminale hydrophobe Bereich ist zu groß,

um diesen Kriterien zu entsprechen. Die Homologie der beiden Aminosäuresequenzen beträgt 86%. Besonders auffällig ist die hohe Konservierung zwischen der humanen und der Maus Aminosäuresequenz in der LRR-Region (>90%), in der auch bisher die meisten Mutationen gefunden worden sind, während der N-terminale und der C-terminale Bereich mit jeweils 62 und 52% nur schwach konserviert ist (Abbildung 16). Des Weiteren werden posttranslationale Modifikationen sowohl für das Maus als auch für das humane NYX-Protein, durch die Präsenz von Glycosylierungs-, Phosphorylierungs- und Myristoylierungsstellen, vorgeschlagen.

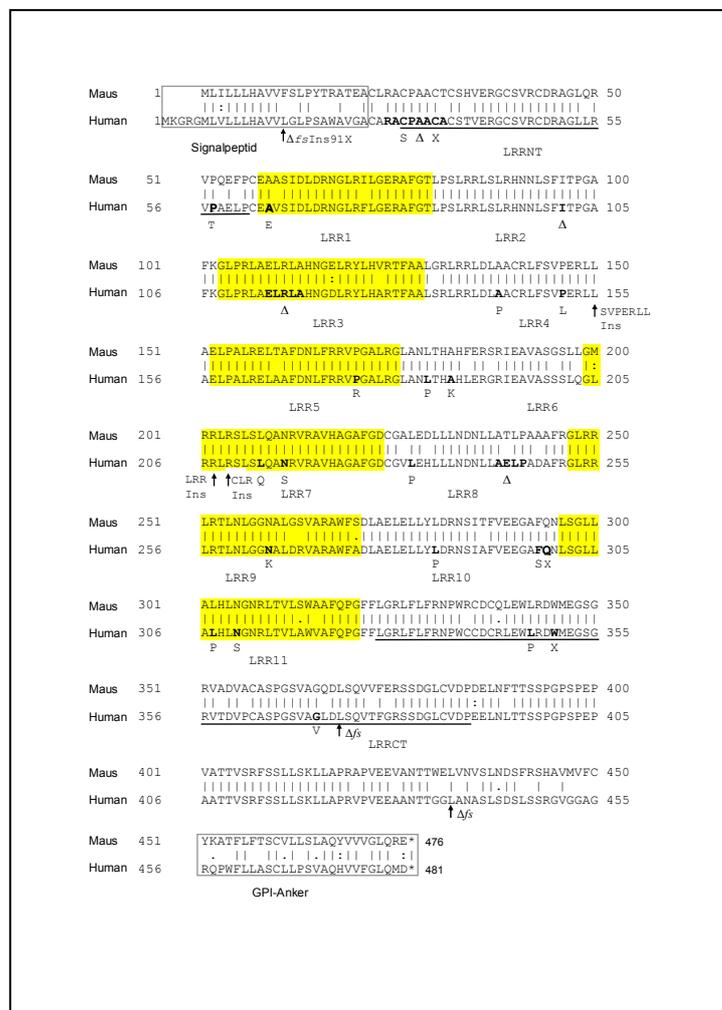


Abbildung 15: Vergleich der Aminosäuren bei Maus und Mensch

Die putative N-terminale Signalsequenz und der C-terminale GPI-Anker der humanen NYX Sequenz sind durch gelbe Boxen gekennzeichnet. 11 typische Leucin-reiche Wiederholungen, abwechselnd durch gelbe Boxen illustriert, werden durch Cystein-reiche LRRs flankiert. Identische Aminosäuren werden durch vertikale Balken, ähnliche Aminosäuren durch Punkte angezeigt. Die Homologie der gesamten Aminosäuresequenz beträgt 86%. Fett gedruckte Buchstaben weisen auf bisher in NYX gefundene Mutationen hin (Bech-Hansen *et al.*, 2000; Pusch *et al.*, 2000; Zito *et al.*, 2003 und Zeitz *et al.*, unveröffentlicht). Es wurden Aminosäureaustausche, Deletionen (Δ) und Insertionen (↑) gefunden.

3.5.1.1 Klassifizierung von NYX in die unterschiedlichen Gruppen der SLRP Protein

Aufgrund charakteristischer Aminosäuremotive kann NYX der Gruppe der SLRP (engl.: small leucine-rich repeat proteoglycan) Proteine zugeordnet werden. Vertreter der SLRP Familie besitzen eine N-terminale Signalsequenz, die typische Abfolge der Leucin-reichen Wiederholungen, (x x I/V/L x x x x F/P/L x x L/P x x L x x L/I x L x x N x I/L) wobei x jede beliebige Aminosäure darstellen kann (Hocking *et al.*, 1998), die durch Cystein-Leucin-reiche Wiederholungen flankiert sind. Darüber hinaus zählen sie zu den LRR Glycoproteinen der extrazellulären Matrix, die nicht nur für den Zusammenhalt der Matrix, sondern auch eine putative Rolle als Adhäsionsmoleküle bei der Regulierung des Zellwachstums und in der Signaltransduktion haben. Aufgrund von Homologien in der gesamten Aminosäuresequenz, der Abstände der Cystein-Reste, der N-terminalen Sequenz und der Gen Struktur, lassen sich die Proteine der SLRP Familie in drei unterschiedliche Gruppen unterteilen (Henry *et al.*, 2001). Decorin (Krusius und Ruoslathi, 1986) und Biglycan (Fisher *et al.*, 1989) aus der ersten Klasse sind mit 57% am stärksten konserviert und bestehen aus 10 LRRs. Die Cystein-reiche N-terminale Region dieser beiden SLRP Proteine zeigt eine typische Abfolge der Cysteine mit CX₃CXCX₆C, wobei X jede beliebige Aminosäure darstellen kann. Die entsprechenden Gene bestehen aus acht Exonen. Die Proteine Fibromodulin (Oldberg *et al.*, 1989), Lumican (Blochberger *et al.*, 1992), PRELP (Bengtsson *et al.*, 1995), Keratocan (Corpuz, *et al.*, 1996) und Osteoadherin (Sommarin *et al.*, 1998) der zweiten Klasse zeigen eine Aminosäureidentität zwischen 37 und 55%, bestehen aus 10 LRRs und haben eine einheitliche Genstruktur, zusammengesetzt aus drei Exonen. Die Reihenfolge der N-terminalen Cysteine lautet CX₃CXCX₉C. Epiphycan/PG-Lb (Shinomura und Kimata 1992; Johnson *et al.*, 1997) Osteoglycin/Mimecan (Madisen *et al.*, 1990; Funderburgh *et al.*, 1997) und Optican (Reardon *et al.*, 2000) werden der dritten Klasse der SLRP Proteine zugeordnet. Die Homologie innerhalb dieser SLRP Proteine variiert zwischen 35 und 42%. Die Gene dieser Klasse bestehen aus 7-8 Exonen, kodieren für Proteine mit nur 6 LRRs und das Cystein-Motif CX₂CXCX₆C innerhalb dieser Gruppe ist identisch. Nyctalopin zeigt eine 36%-ige Aminosäureidentität zu Chondroadherin (Neame *et al.*, 1994; Grover *et al.*, 1997). Beide Gene bestehen aus drei Exonen, kodieren für ein Protein mit 11 LRRs und weisen typische Cystein-Motive auf. Ein Dendrogram (clustalw.genome.jp) von Nyctalopin und allen zum heutigen Zeitpunkt bekannten homologen SLRP Proteinen (Chondroadherin mit eingeschlossen) zeigt jedoch, dass eine Zuordnung dieses Proteins zu einer der drei

bekannten Klassen aufgrund struktureller Unterschiede nicht möglich ist (Abbildung 16). Dies ist ein Hinweis darauf, dass Nyctalopin und Chondradherin schon sehr früh in der Evolution von den anderen drei SLRP Klassen getrennt worden sind.

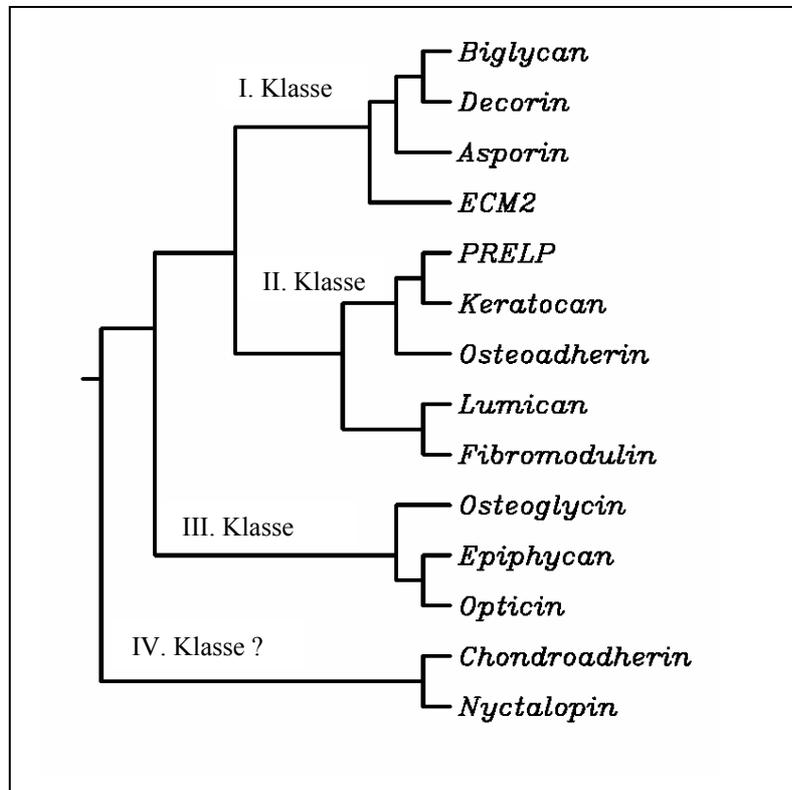


Abbildung 16: Dendrogramm der Clusteranalyse von NYX und homologen SLRP Proteinen

Die SLRP Familie wird in 3 Klassen eingeteilt. Der horizontale Abstand der Verzweigungen ist ein Maß für die evolutionäre Distanz der Proteine. Auch wenn es sich bei Nyctalopin und Chondroadherin um Proteine der SLRP Familie handelt, können sie aufgrund von strukturellen Unterschieden keiner der 3 Gruppen zugeordnet werden. Möglicherweise gehören sie einer weiteren Klasse von SLRPs an.

3.5.1.2 Identifizierung von homologen Proteinen durch Sequenzvergleiche

Die Suche nach homologen Proteinen mittels Sequenzanalysen kann auch Aufschluss über die putative Rolle eines funktionell noch nicht charakterisierten Proteins geben. Die Suche homologer Proteine in öffentlich zugänglichen Datenbanken ergibt aufgrund der LRRs viele bekannte, aber auch unbekannte Proteine mit Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz zu NYX. Neben den in Kapitel 3.5.1.1 besprochenen Proteinen der SLRP Familie weisen viele LRR Proteine eine hohe Homologie zu NYX auf. Einige Beispiele mit einer besonderen Ähnlichkeit sollen hier genannt werden: das humane Orthologe zu dem *Drosophila melanogaster* Protein SLIT, h-SLIT2 (Rothberg *et al.*, 1988), das Platelet Glycoprotein V (GPV; Hickey *et al.*, 1993), die zwei humanen Transmembranproteine FLRT1 und FLRT2 (Lacy *et al.*, 1999), das humane GARP Protein (Ollendorff *et al.*, 1994) und die säurelabile Untereinheit des insulinähnlichen

Wachstumsfaktors (ALS, engl.: acid-labile subunit of the insulin-like growth factor; Leong *et al.*, 1992). BLAST-Analysen (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>) von NYX gegen h-SLIT2 ergeben 7 Fragmente mit variablem Konservierungsgrad (26-33%). Vergleichende Sequenzanalyse von NYX und GPV liefert in 144 Aminosäuren 42 identische Aminosäuren (29% Identität). FLRT2 und FLRT1 weisen in Abschnitten von NYX eine 27, bzw. 30%-ige Identität auf. Das GARP Protein ist in einem relativ kurzen Bereich (75 AS) mit 36% stark konserviert, während ALS in einem relativ großen Bereich (332 AS) eine Identität von 19% aufweist. Basierend auf der Faltungsstruktur des verwandten ALS-Proteins wurde ein dreidimensionales Modell für Nyctalopin von unserem Kooperationspartner in München (Dr. Oliver Brandau) entwickelt (Swiss Modell-Servers; Guex und Peitsch, 1997; Peitsch *et al.*, 1995; Peitsch 1996). Hierfür wurden jedoch nur die Leucin-reichen, nicht aber die flankierenden Cystein-Leucin-reichen Wiederholungen von Nyctalopin verwendet, da letztere zu große Strukturunterschiede zu ALS aufweisen. Im Vergleich zu dem ALS-Model, das mit seinen 20 LRRs eine „Donut-artige“ Struktur bildet, weist Nyctalopin eine „Halbmond-förmige“ Struktur auf (Abbildung 17). Aminosäuresequenzähnlichkeiten wurden auch zu zwei *Drosophila melanogaster* spezifischen Proteinen, Connectin (Nose *et al.*, 1994) und Chaoptin (Krantz und Zipursky, 1990) gefunden. Auch wenn Connectin und Chaoptin mit jeweils 7 LRRs und 30 LRRs eine unterschiedliche Anzahl an Wiederholungen im Vergleich zu Nyctalopin mit 11 LRRs haben, so ist die Gesamtstruktur bestehend aus einer Signalsequenz, einem LRR-Kernstück und einem putativen Membrananker, sehr ähnlich. Bei Connectin handelt es sich um ein Protein, das bei der Synapsenbildung und –Aufrechterhaltung im Muskelgewebe beteiligt ist (Nose *et al.*, 1994), während Chaoptin für Adhäsionsprozesse der Photorezeptormembranen verantwortlich ist.

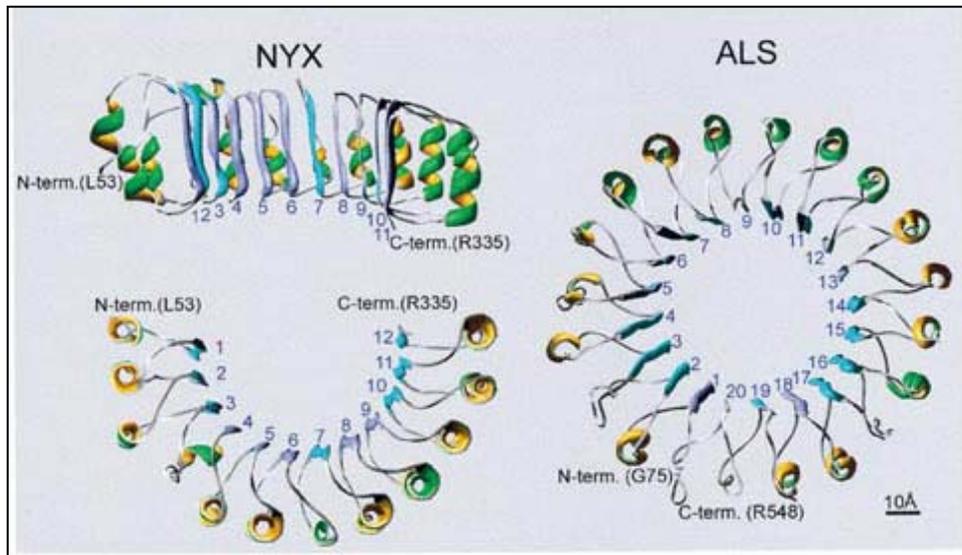


Abbildung 17: 3D-Modellierung von NYX anhand von ALS

Dargestellt sind die 3D-Strukturen von NYX (Nyctalopin) und ALS (acid-labile subunit of the insulin-like growth factor). Sie sind als Bänder dargestellt, die aus β -Faltblättern (hellblau) und α -Helices (gelb) bestehen. Die Nummerierung der LRR ist in hellblau hervorgehoben.

3.5.2 Protein-Lokalisationsstudien

Die mittels Computerprogrammen vorhergesagten Domänen von Nyctalopin wurden mittels transienter Expression auf ihre funktionelle Relevanz untersucht. Das humane NYX-Protein besitzt ein putatives Signalpeptid, 11 Leucin-reiche Wiederholungen, die durch Cystein-Leucin-reiche Wiederholungen flankiert sind und einen vermeintlichen GPI-Membrananker. Die Funktion von Proteinen der Leucin-reichen Superfamilie kann sehr unterschiedlich sein (Kobe und Deisenhofer, 1994) und die Identifizierung der Lokalisation kann zur Aufklärung der Rolle des Zielproteins beitragen. Aufgrund der flankierenden Cystein-Motive kann Nyctalopin der Untergruppe der kleinen Leucin-reichen Proteoglycane (SLRP = small leucine-rich proteoglycans) zugeordnet werden (Iozzo, 1997), die in den meisten Fällen extrazellulär lokalisieren.

3.5.2.1 Subzelluläre Lokalisierung von NYX in Maus und Mensch

Um die subzelluläre Lokalisierung des humanen und Maus NYX-Proteins zu analysieren, wurden Expressionskonstrukte hergestellt, die ein V5-Epitop (Southern *et al.*, 1991) beinhalten, das mit einem spezifischen Antikörper nachweisbar ist (Abbildung 18).

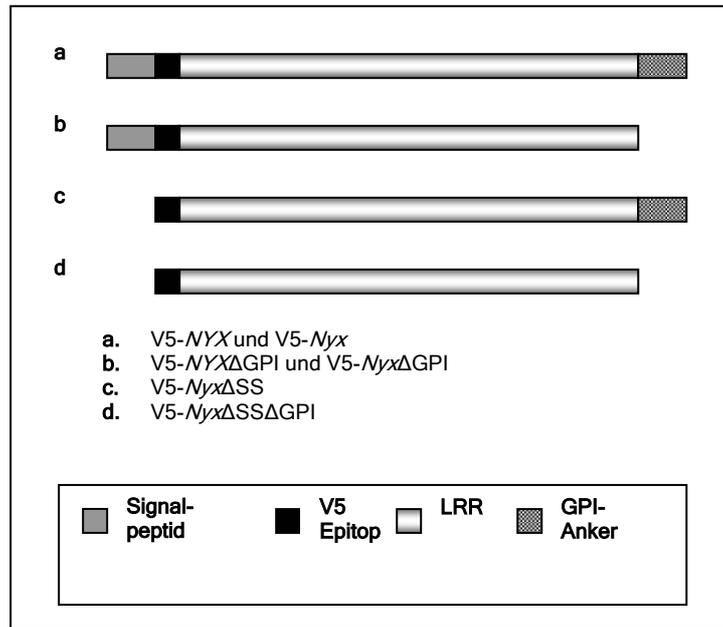


Abbildung 18: Graphische Darstellung der verschiedenen Expressionskonstrukte

a) Das humane V5-NYX cDNA Konstrukt mit einer Signalsequenz, den Leucin-reichen Wiederholungen (LRR) und dem Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Anker. Ein identisches Volllängenkonstrukt wurde für die Maus cDNA kloniert. b) Deletionskonstrukte ohne GPI-Anker für Maus und Mensch. c) Deletionskonstrukt ohne Signalpeptid und d) ohne Signalpeptid und ohne GPI-Anker. Ein V5-Peptid wurde stromabwärts des Signalpeptids zur Detektion der Proteine mittels Western-Blot-Analyse oder Fluoreszenzmethoden inseriert.

Die Expression der Fusionsproteine wurde mittels Western-Blot-Analyse der Pelletfraktionen mit einem anti-V5 Antikörper in HeLa Zellen getestet (Abbildung 19).

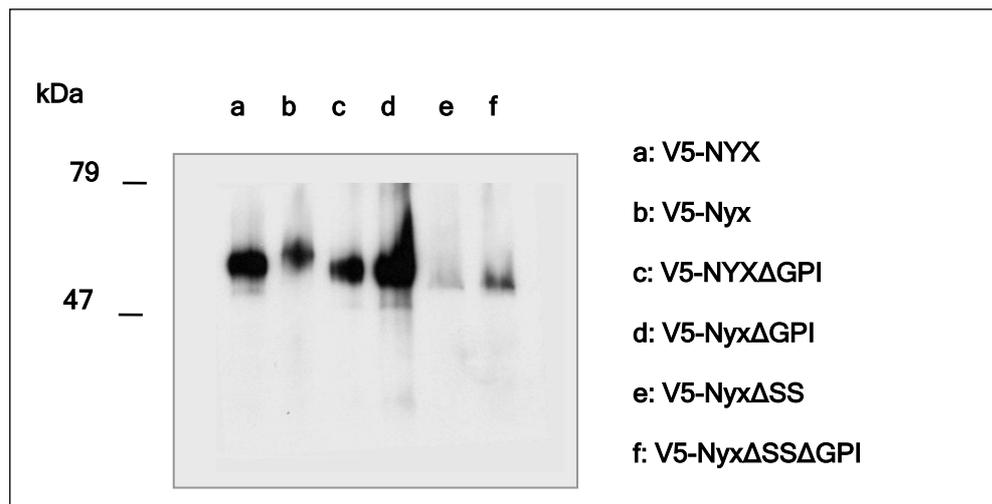


Abbildung 19: Western-Blot-Analyse des Nyctalopin-V5-Fusionsproteins

Die Pelletfraktionen aus HeLa Zellen wurden mit einem anti-V5 Antikörper getestet, der die unterschiedlichen Proteine mit ihren erwarteten relativen Molekulargewichten zeigt. Die berechneten Werte der Fusionsproteine sind 55 kDa für das humane und Maus NYX-Protein, 51 kDa für das humane und 50 kDa für das Maus Deletionskonstrukt ohne GPI-Anker, 52 kDa für das Maus Konstrukt ohne Signalpeptid und 49 kDa für das Maus Konstrukt ohne Signalpeptid und ohne GPI-Anker.

Standard-Immunfluoreszenz-Färbemethoden (IF) weisen Limitationen auf, intrazelluläre- und Oberflächenproteinen gleichzeitig zu visualisieren. Daher haben wir eine Färbemethode entwickelt, die zuerst die Proteine an der Zelloberfläche und nach Fixierung im Zellinnern lokalisieren. In lebend gefärbten V5-NYX exprimierenden COS-7 Zellen konnte das Fusionsprotein mittels Fluoreszenzmikroskopie punktförmig an der Zelloberfläche lokalisiert werden (Abbildung 21Ab). Nach Fixierung dieser Zellen und Extraktion mittels Detergens zeigte V5-NYX auch im gesamten Zellinnern ein starkes Fluoreszenzsignal (21Ac). Diese Studien wurden auch in HeLa Zellen durchgeführt und resultierten in der gleichen Lokalisation. Somit ist anzunehmen, dass die punktförmige Lokalisation an der Zelloberfläche und die starke Färbung im Zellinnern von V5-NYX zelltypunabhängig ist. Vergleicht man die Aminosäuresequenzen des NYX-Proteins in Maus und Mensch zeigt sich, dass der Grad der Konservierung unterschiedlich ist. Während die Homologie im LRR Teil mit über 90% sehr hoch ist, weisen N-terminaler und C-terminaler Teil nur eine 62- bzw. 52%ige Identität auf (Abbildung 20).

NYX Signalpeptid	
Human	1 MKGRGMIVLLLLHAVVVLGGLPSAWAVGA 26
Maus	1 MIILLHHAVVFSLEPYTRATEA 21
NYX GPI-Anker	
Human	456 RQFWELLASCLLPSVAQHVVVFGLOMD* 481
Maus	451 YKATFLFTSCVLLSLAQYVVVGLQRE* 476

Abbildung 20: Homologie der NYX Signalsequenz und des GPI-Ankers

Die grauen Kästchen heben die identischen Aminosäuren zwischen der N-terminalen Signal- und der C-terminalen GPI-Anker Sequenz in Mensch und Maus hervor.

Außerdem wird für das Maus Nyx-Protein kein GPI-Anker Motiv vorhergesagt (www.expasy.org/tools/). Um zu prüfen, ob diese Unterschiede eine Auswirkung auf die subzelluläre Verteilung und somit einen Einfluss auf die Funktion des Nyx-Proteins haben, wurde das Maus Konstrukt in gleicher Weise wie das humane in COS-7 bzw. HeLa Zellen transfiziert und die Lokalisation analysiert. Lebend gefärbte Maus V5-Nyx exprimierende Zellen zeigten ein punktförmiges Signal an der Oberfläche, während permeabilisierte Zellen ein starkes Signal im Zellinnern aufwiesen (Abbildung 21B). Diese typische

Lokalisation konnte auch hier in beiden Zelltypen, COS-7 und HeLa, gezeigt werden. Dies beweist, dass trotz der schwächeren Konservierung der N- und C-terminalen Sequenz in der Maus und des nicht vorhergesagten Membranankers auch das Maus Nyx-Protein an der Plasmamembran lokalisiert ist.

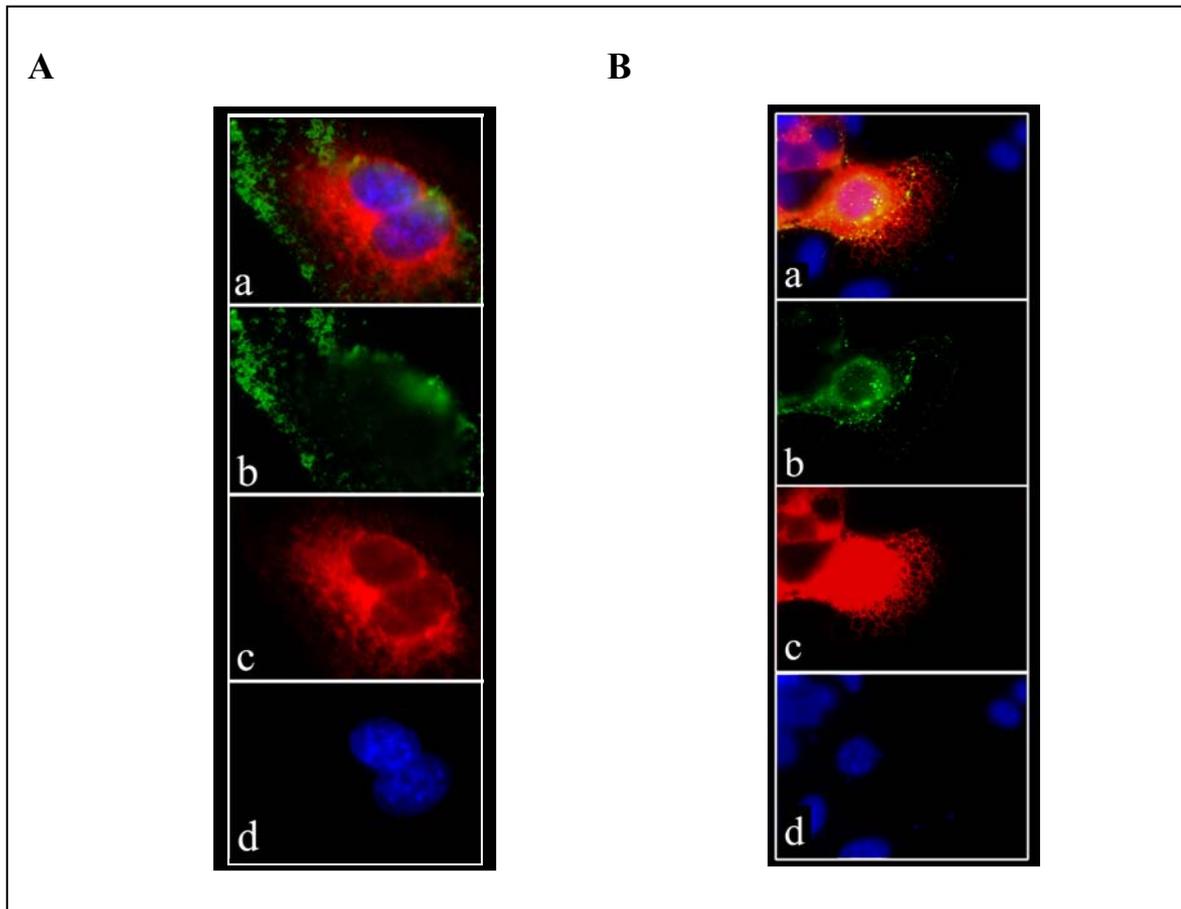


Abbildung 21: Lokalisationsstudien von humanem (A) und Maus (B) NYX in COS-7 Zellen

A) Zusammengesetzte Bilder der aufeinander folgenden Immunfluoreszenzfarbungen zeigt NYX an der extrazellulären Plasmamembran in grün (FITC; a, b) und das intrazellulären Protein in rot (Cy3; a, c). d) Der Zellkern wurde mit DAPI gefärbt. B) Gleiche Methode wie unter A); hier wurde jedoch das Maus Nyx Protein detektiert. Nyx an der extrazellulären Plasmamembran in grün (FITC; a, b) und das intrazellulären Protein in rot (Cy3; a, c). d) Der Zellkern wurde mit DAPI gefärbt.

3.5.2.2 Kolokalisationsstudien von NYX

Die intrazelluläre Verteilung des humanen und Maus V5-NYX-Proteins um den Kern und wabenförmig im Zellinnern suggeriert eine Lokalisation der Proteine im endoplasmatischen Reticulum (ER) und Golgi-Apparat. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden Kolokalisationsstudien mit kommerziellen Markern für diese Zellkompartimente durchgeführt. Da es sich bei dem ER-Marker um einen Lebendfarbstoff handelt, wurden V5-NYX exprimierende Zellen lebend für das ER und gleichzeitig für das an der Oberfläche gebundene V5-NYX-Protein gefärbt (Abbildung 22Ad und 22Ab).

Danach wurden die gleichen Zellen permeabilisiert und V5-NYX im Innern der Zelle mit einem anderen Farbstoff detektiert (Abbildung 22Ac). Beim Überlagern der Bilder der unterschiedlich gefärbten inneren Kompartimente zeigt sich die gleiche subzelluläre Lokalisation von V5-NYX und dem ER-Marker. Somit kolokalisiert V5-NYX mit dem perinuklearen und dem wabenförmigen ER (Abbildung 22Aa). Diese Beobachtung stimmt mit der Vorhersage eines Signalpeptids überein, dass für die Synthese des Proteins am rauen ER verantwortlich ist. Außerdem wurde die Kolokalisation von V5-NYX mit einem Golgi-spezifischen Antikörper gezeigt (Abbildung 22B), was darauf hinweist, dass das Protein nach der Synthese zum Golgi-Apparat transportiert wird. Diese Beobachtungen wurden sowohl für beide untersuchten Zellsysteme, COS-7 und HeLa, als auch für das Maus Protein gemacht.

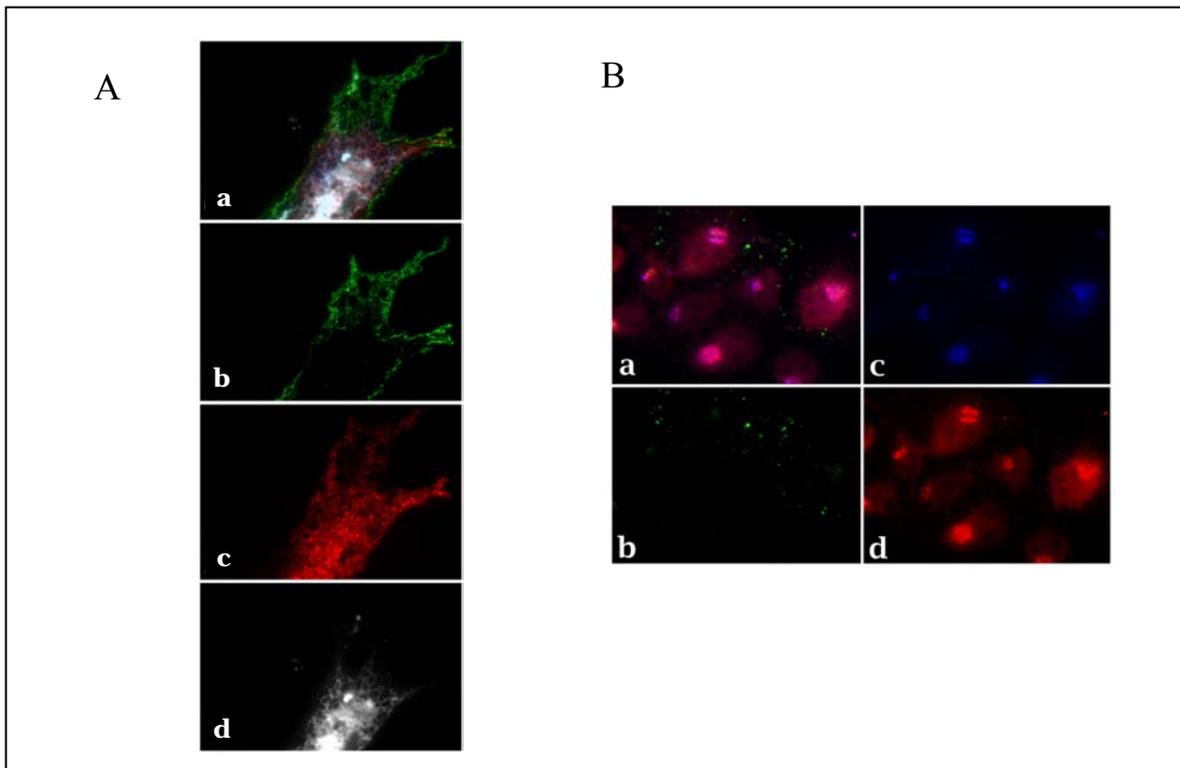


Abbildung 22: Kolokalisierungsstudien von intrazellulärem NYX mit dem ER und dem Golgi-Apparat
 A) Zusammengesetzte Bilder aufeinander folgender Immunfluoreszenzfärbungen zeigt V5-NYX an der extrazellulären Membran in grün (b; FITC) und das intrazelluläre Nyctalopin in rot (c; Cy3). Die gleiche Zelle wurde mit einem ER-Marker gefärbt (d), der mit dem intrazellulären V5-NYX-Protein kolokalisiert (a).
 B) Zusammengesetzte Bilder aufeinander folgender Immunfluoreszenzfärbungen zeigt V5-NYX punktförmig an der extrazellulären Membran in grün (b; FITC) und das intrazelluläre Nyctalopin in rot (d; Cy3). Die gleiche Zelle wurde mit einem Golgimarker gefärbt (c) der auch mit dem intrazellulären V5-NYX-Protein kolokalisiert (a).

3.5.2.3 Funktionelle Charakterisierung des C-Terminus von NYX bei Mensch und Maus

Um die funktionelle Relevanz des GPI-Ankers zu analysieren, wurden humane und Maus NYX Expressionskonstrukte mit, und im Vergleich dazu, ohne C-terminaler Sequenz in COS-7 und HeLa Zellen transfiziert. Lebende Zellen wurden direkt nach der Färbung ($t=0$) oder nach einer sich anschließenden 30-minütigen Inkubation in antikörperfreiem Medium ($t=30$) fixiert. Besitzen beide Proteine einen funktionellen Membrananker, so wird das jeweilige Protein zu jedem Zeitpunkt an der Oberfläche erwartet. Bei einem nicht-funktionellen oder fehlenden GPI-Anker sollte das Protein zum Zeitpunkt $t=30$ nur noch stark reduziert an der Oberfläche der Zelle vorhanden sein. Diese Annahme ließ sich bestätigen: 75,5 % der mit der Wildtyp-Form transfizierten Zellen zeigten V5-NYX an der Oberfläche, sowie im ER und Golgi-Apparat. Nur 24,5 % der Zellen waren ausschließlich im ER und Golgi gefärbt. Dagegen zeigten nur 50% der mit der trunkierten Form transfizierten Zellen eine V5-NYX Oberflächenfärbung (Abbildung 23). Ein drastischer Effekt konnte nach 30-minütiger Nachinkubation in antikörperfreiem Medium beobachtet werden. Während die meisten Wildtyp V5-NYX exprimierenden Zellen weiterhin eine Oberflächenfärbung aufwiesen, zeigte die C-terminal trunkierte Variante nur noch etwa bei 20% der transfizierten Zellen eine Färbung an der Oberfläche (Abbildung 23). Dieses typische Färbemuster konnte sowohl in HeLa als auch in COS-7 Zellen beobachtet werden.

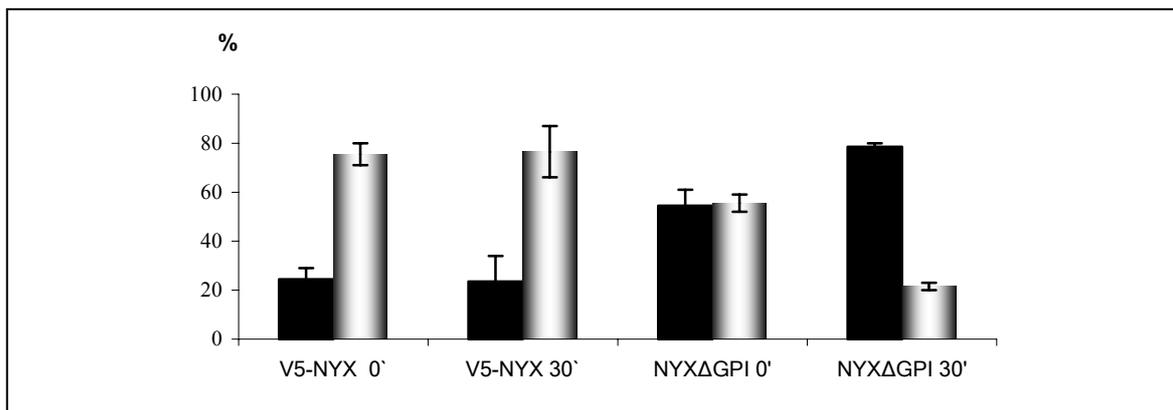


Abbildung 23: Messungen von intrazellulärem versus Oberflächenprotein

Lebende Zellen wurden 24 h nach der Transfektion mit anti-V5 und anti-FITC Antikörpern im Medium inkubiert. Intrazelluläre und Oberflächenfärbung sind durch einen grauen Balken, ausschließlich intrazelluläre Färbung durch einen schwarzen Balken dargestellt. Es handelte sich dabei um doppelt ausgeführte Experimente, bei denen mindestens 200 Zellen gezählt wurden. Zum Zeitpunkt $t=0$ zeigten 75,5% der mit dem Wildtyp-V5-NYX Konstrukt transfizierten Zellen das Protein sowohl an der Oberfläche, als auch im ER und Golgi-Apparat, während 24,5% der transfizierten Zellen ausschließlich intrazelluläre Färbung aufwiesen. Nur 54,4% der transfizierten Zellen, die das trunkierte Protein ohne GPI-Anker exprimierten (V5-NYXΔGPI), zeigten intrazelluläre- und Oberflächenfärbung. In 54,4% konnte das Protein ausschließlich im Zellinnern nachgewiesen werden. Nach 30-minütiger Nachinkubation in antikörperfreiem Medium zeigten 76,5% der Zellen, die das Wildtyp Protein exprimierten, neben der intrazellulären auch Oberflächenfärbung, während 23,5% ausschließlich intrazelluläres Protein aufwiesen. Nur 21,5% V5-NYXΔGPI transfizierte Zellen zeigten Oberflächenfärbung und intrazelluläre Färbung bei $t=30$ min, während die meisten Zellen (78,5%) im Zellinnern gefärbt waren.

In gleicher Weise wurde auch die Lokalisation des Mausproteins analysiert. Es konnte die gleichen Ergebnisse beobachtet werden. Bei $t=0$ und $t=30$ lokalisierte das Wildtyp Mausprotein hauptsächlich an der Plasmamembran und im Zellinnern, während die C-terminal trunkierte Variante bei $t=30$ fast ausschließlich im Zellinnern zu detektieren war (Abbildung 24).

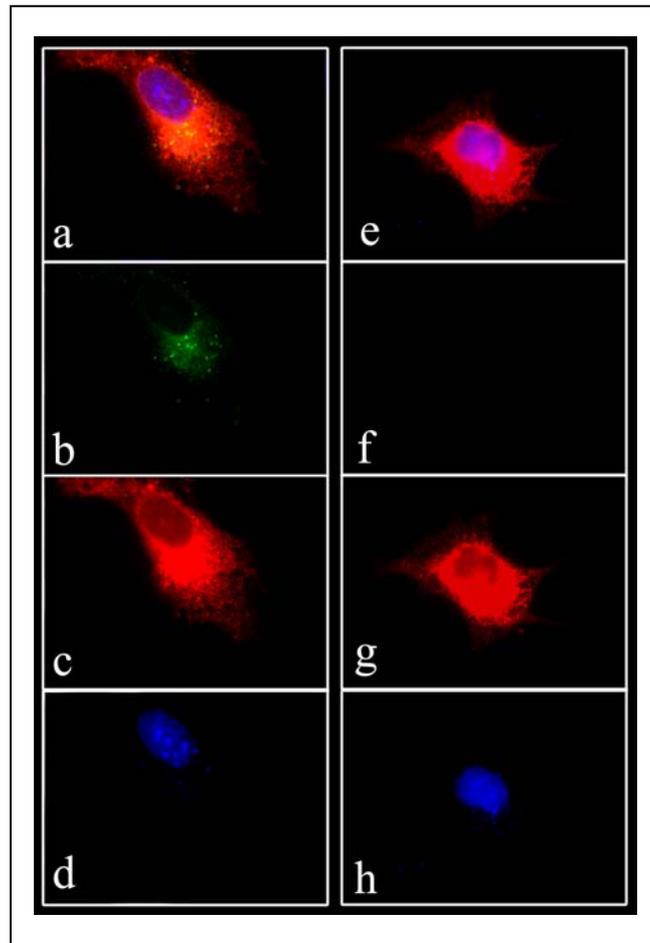


Abbildung 24: Immunfluoreszenzfärbung von V5-Nyx Δ GPI exprimierenden HeLa Zellen

a-c) Eine Zelle, die Nyx ohne GPI-Anker exprimiert, zeigte eine intrazelluläre Lokalisation (rot, c) und eine reduzierte Plasmamembranfärbung (grün, b) (Vergleich zu Abbildung 21A). e-hg) Eine Nyx Δ GPI exprimierende Zelle, die nach 30 minütiger Nachinkubation in antikörperfreiem Medium keine Oberflächenfärbung mehr zeigt (f). c) und g) Intrazelluläres Nyx Δ GPI wurde netzartig gefärbt (am besten an der Peripherie zu sehen), was auf eine Anreicherung des Proteins ohne C-terminale Sequenz im ER hindeutet. d) und h) Die DNA der Zellkerne wurde mit DAPI gefärbt.

3.5.2.4 Funktionelle Charakterisierung der vorhergesagten Signalsequenz am N-Terminus von Nyx

Um die Relevanz des vorhergesagten Signalpeptids für den intrazellulären Transport der Nyx mRNA zum ER zu untersuchen, wurden Konstrukte ohne Signalsequenz sowohl mit als auch ohne GPI-Anker in HeLa Zellen transfiziert. Immunfluoreszenzstudien zeigten, dass die zuvor beobachtete Plasmamembranfärbung von HeLa Zellen, die das komplette V5-NYX-Protein exprimierten, vollständig fehlte (Abbildung 25b und 25f). Sowohl HeLa Zellen die Nyx ohne Signalpeptid expimierten als auch ohne Signalpeptid und GPI-Anker,

wiesen eine diffuse granuläre Färbung im Zellinnern auf (Abbildung 25a, 25c und Abbildung 25e, 25g entsprechend).

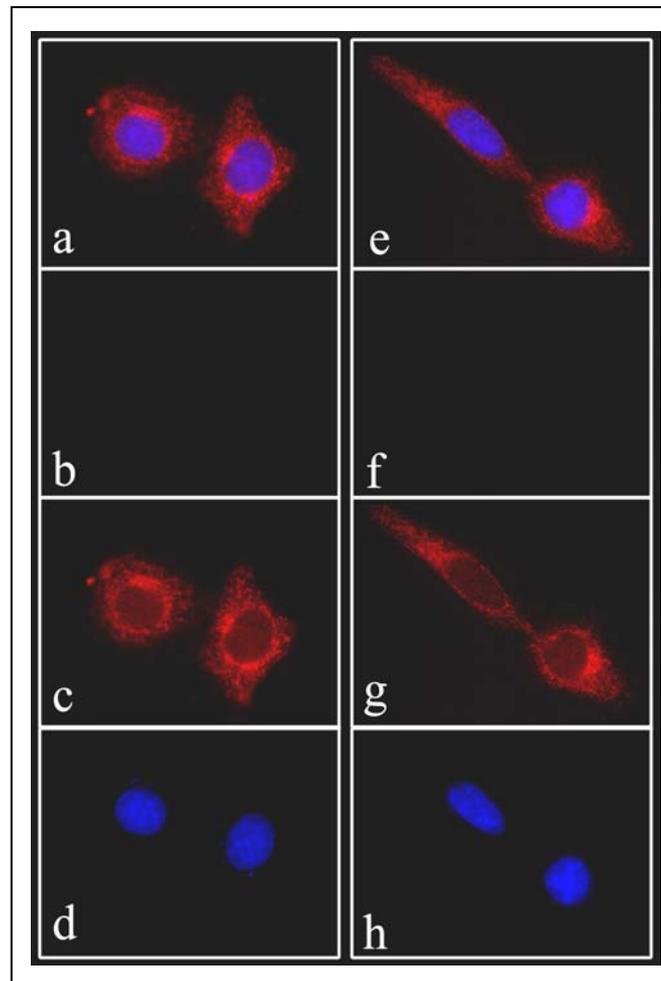


Abbildung 25: Funktionelle Analyse des Signalpeptids und des GPI-Ankers

a,e) Zusammengesetzte Bilder aufeinander folgender Immunfluoreszenzfärbungen. Diffuse Verteilung von V5-Nyx Δ SS (a-d) und Nyx Δ SS Δ GPI (e-h) im Zellinnern. b) und f) Die Deletion der Signalsequenz verursacht den Verlust des Nyx-Proteins an der Plasmamembran. c) und g) Intrazelluläres Protein zeigt eine granuläre Färbung. Die typische wabenförmige ER und perinukleare Golgi-Färbung fehlt (Vergleich zu Abbildung 22).

3.5.2.5 Subzelluläre Lokalisierung mutierter V5-NYX

Um die Auswirkungen der in CSNB1 Patienten identifizierten Mutationen auf die Protein Lokalisation zu analysieren, wurden V5-markierte Mutationskonstrukte in HeLa und COS-7 Zellen transfiziert. Die Mutationen wurden durch direkte Amplifikation des ORFs auf Patienten-DNA eingeführt. Auf diese Weise wurden drei Mutationen analysiert: 1. Deletion der Aminosäuren AELP an Position 243-246, 2. Mutation an Position 347, L347P in der LRR Region und 3. eine Mutation an Position 370, G370V. Keines der untersuchten Mutationskonstrukte veränderte die Lokalisation des Proteins.

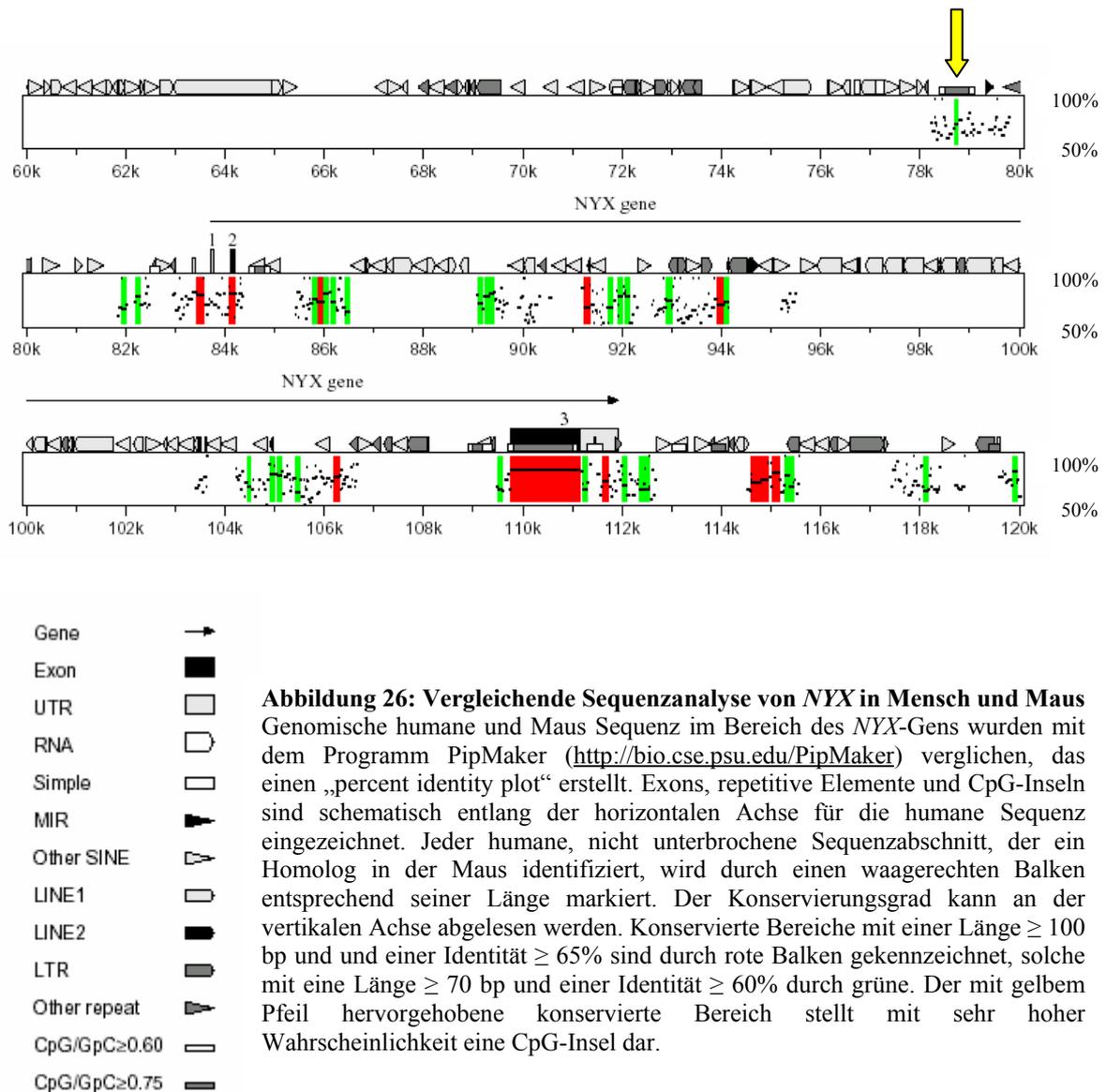
3.6 Identifizierung Transkriptions-regulierender Elemente in *NYX*

Wie unter 3.2.3 und 3.3.3 beschrieben, wird *NYX* bei Maus und Mensch in unterschiedlichen Geweben exprimiert. Um die Regulation der Expression von *NYX* aufzuklären, bieten sich unterschiedliche Methoden an. Durch einen Vergleich der genomischen DNA-Sequenzen von Mensch und Maus, der neben der kompletten Gensequenzen auch flankierende Bereiche beinhaltet, sollten evolutionär konservierte Abschnitte identifiziert werden. Diese Regionen können putative regulatorische Elemente, wie zum Beispiel DNA-Sequenzen die das Ablesen eines Gens verstärken (engl.: enhancer) oder abschwächen (engl.: silencer) und Promotor Sequenzen darstellen. Darüber hinaus können Computer-Programme ein weiteres Hilfsmittel zur Vorhersage von Promotoren sein.

Die folgenden Studien zur Aufklärung der Regulation von *NYX* wurden von Frau Roberta Minotti unter meiner Betreuung als Diplomprojekt bearbeitet.

3.6.1 Vergleichende genomische Sequenzanalyse

Um putative regulatorische Elemente zu identifizieren, wurde die genomische humane Sequenz mit der genomischen Maus Sequenz verglichen. Zum Zeitpunkt dieser Studie waren bereits beide genomischen Bereiche, die auch die vollständige *NYX* Sequenz enthalten, bekannt (*GenBank*-Einträge: z93015 (Mensch), AL671988, 17. August 2002 (Maus)). Zur vergleichenden Sequenzanalyse wurde das Programm PipMaker (Schwartz *et al.*, 2000, <http://bio.cse.psu.edu/PipMaker>) verwendet. Das Programm stellt das Ergebnis als „percent identity plot“ (engl.: Plot der Identität in Prozent) graphisch dar (Abbildung 26). Ein hoher Grad an Konservierung des *NYX*-Gens zwischen Maus und Mensch tritt in den kodierenden Bereichen der Exonen 2 und 3 auf. Auffällig sind aber auch Sequenzabschnitte in Intron 2, sowie im 5' und 3' untranslatierten Bereich, die unterschiedlich stark konserviert sind. Etwa 5 kb stromaufwärts von Exon 1 liegt ein ca. 1 kb langer konservierter Bereich, der mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit eine CpG-Insel enthält (grüner Bereich, gelber Pfeil).



3.6.2 Motivuntersuchungen der genomischen Sequenz von *NYX* in Maus und Mensch

Neben der Identifizierung evolutionär konservierter Sequenzabschnitte mittels vergleichender Sequenzanalyse stellt das Programm NIX (<http://menu.hgmp.mrc.ac.uk>) eine Alternative zur Vorhersage regulatorischer Elemente dar. Hierbei wird der genomische Bereich jeweils einzeln (Maus oder Mensch) auf unterschiedliche Eigenschaften wie das Vorhandensein von Exonen, CpG-Inseln, Sequenzwiederholungen, Promotor Regionen und Transkriptionsstartstellen analysiert. Dieses Programm wurde auf die genomische Sequenz beider Spezies, in der auch *NYX* zu finden ist, angewandt. Sowohl für die humane als auch für die Maus Sequenz wurde eine CpG-Insel ca. 5 kb stromaufwärts des ersten Exons vorhergesagt. Dieser DNA-Bereich ist zwischen Mensch

und Maus konserviert, wie die vergleichende Sequenzanalyse mittels PipMaker ergab (siehe Abbildung 26). Außerdem wird in diesem Bereich für die humane Sequenz mit hoher Wahrscheinlichkeit und für die Maus-Sequenz mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit eine Promotor Region vorhergesagt, d.h., dass das Programm neben einem Transkriptionsstart benachbart dazu beispielsweise eine TATA-, CAAT- oder eine GC-Box identifiziert, die Transkriptionsfaktoren binden können. Ein weiterer Transkriptionsstart wird durch ein anderes Programm für die humane Sequenz vorhergesagt (Abbildung 27).

A

```

1 GCTGCAATGGGAGAGAAACCTACTTTGGATGCAATGTAAAGAACGATGATTTCAGAAGAGGCCCCAGGAA
71 GGTGTATTTGTGGGCAGTGGGCAGAGCCTGTTGGTGAGCTAACCCCTTCATTTACAGGTGACAAACAGGCC
141 ATGCGCACTACCGGCCCTGGTCAGGAGGACACGGCACTGGGAGATCTTCCCCAGGGTGTGACCTTTGGCA
211 GGTTAGGTCCCCACCCTGGCATCCCTTCCAGCCCGGGCATTCTGCGACTCCAGGTGCGTGAGGAACGTTT
281 CTGGCACCAGGCACGCCCTGGGACTTTCCCCAGCCCTGGCCCCGGCCCCACCAGAGTAGGTGCGGGTGCC
351 GCGGCGGGGAGCAGACAGAGGTCCCGGGGCCGCCACCCTGACTGCGAACCTCGGTGCCCTCTGGCGG
421 CCACGCTGGGCAGGACCGGGCTCATCGGGGGCGTGGCTCGCCCCGGAGGCTCCGCCCTTCTCCCCAGGG
491 TGGGGCCGGGGTGGTGGTTACCGGCAGAGGCTGCAGAGGTTTCGCAAGGACGTGACCTTTATGGGAAAAA
561 AAAACCACTGTGTACGCACGGTTGCCAGCCGGGGCCAGCGAGCTGAACTAGTTTTCTGAAGCCCGCGGA
631 GGGAGGAGCCAGAGCGGAAACGTCCAGCCAGTGACTCGCTGCCTACTGCCCTCCAGGACCGCGGCGGC
701 GCGCCCTGAGCCCCGGGGCACCAGATGGGGCGGAGCCCCGCACCTAACTGTGTCCGGGCCTGCCGTTGGG
771 GCGACGTCACCTGTCACCTACTGGGAGTCAGCGGAATGAGGGCACTCTCGCCTCTCTTCTCTCTCTCTCC
841 AATTCCAGAAATGAGGCCCGGGAGCCAGGCTGATCCAATCCAACCCCACTGAGCTGGGGTTTGGATTGG
911 AAGGGCGGATGTGAAACGACAGAAGTAGGATAGTTTGCGAATAAAGAACAAGGGAGTTGGGTGCTTTAGC
981 CACAGAATAGGTTTACGCCAAGGTCATTTAGAGGTGCCAGCAAGAGGGGAGTGGCTACCCCTCCCCATC
1051 CTGATCTGAGGCATGCAGTGGGGACGTCGGGGTGGCCACAGGGGCTGTGTGTCTCTTATTAGGACCC

```

B

```

1 GCAGTTCCTGCTGCATTGAGTTTGGGTCTTTTCTTGGGCAAGGCAGATGGGCCTACAGCTCTATTTTTT
71 GGAGGCCACAGAGAGTGGCATTTCACATGCAGCTCCTGGAACGTGCATTTTGGAGTATTAGGCAGCGA
141 GTCTGTTGAGAAGCACAGCAGAAGAAATCCTGGGCCAACCCCTTATGTGCTGTGTGACTGGCTTATTA
211 TCCACCCTCTGACTCCAGGGTCAGTCAGGTGAGTAGGTCACTGAAGGACCCTCTCCAGAGGGACTTTTG
281 GCAGGCTGTCTTTGACCAGGGCAGCTAGCCTTCCAGCGACTTCAGGTGCGTGACTAAGATTTCCGGCTC
351 AGGCGTGCCCCGGGCCTTTCCGGGCCAGGCAGCCGCCCGCGCCATGCTGGAGCCTGCTTCTCTGGC
421 GGGGACGATAAGATAGGTTGCGGTGGCACTGGTCCAGCGCTGGAGCTTACGCGCCCTCTGATGGGAAGC
491 CTGGGAGGGCGGGGCCCATGCTCGGATGCCCGCCCCACCAGACCTTGGGAGCGGGCGGGGCTGCAGCAC
561 GCGTTACCCGAGTGGCTGTCCAGGTTTCGCAAGGACGTGACCTTGAGAGGGAAAAAGTCCCTGTTGCG
631 TCACGAGTGGTTGCTAACCCGGGCTAGCGAGCTGAACTAGTTTTCGAAATCCAGAGAGGTGGGAAGGAAT
701 AGGGACTTAAACGTTTCACTAGGGACTCGTGGCCAGCTGCCCTCTACGACCGACCGCCAAGGCACGCT
771 TTGTGCGCAGGACCCGGAATCCGGTACGAGCCTGCATCCCGACTTTGTCTGGGCCTGTCTTGGGGTGAC
841 GTCATTCTGAGAGTCAGCAGAATAAGTAGCGTCCCCTGCTGCAGTCCAGAGCTAAGGCTGTGAATTCAGG
911 TCGATTCCTCCAGCCCTACAAGGAGCCAGGGATTCCAACAAAAGGATGGTTTTCAGCTAAGGCAGTTTAGG
981 GGTGCCTCATCCTGATCTCACATAGGCAGTG

```

Abbildung 27: Motivuntersuchung in der humanen (A) und Maus (B) Sequenz

Die mittels NIX vorhergesagten Motive wurden für die humane und Maus genomische Sequenz eingezeichnet. Die unterstrichenen Bereiche stellen die putativen CpG-Inseln dar. Der grün markierte Kasten repräsentiert einen vorhergesagten Transkriptionsstart, der orangene und rote Kasten ein Transkriptionsstart mit benachbarten Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren mit hoher und sehr hohen Wahrscheinlichkeit.

3.6.3 Funktionelle Charakterisierung der potentiellen Promotoren bei Mensch und Maus mittels Luziferase-Reporter-Konstrukten

Die mittels vergleichender Sequenzanalyse und Computer-basierter Motivanalyse vorhergesagten putativen Promotorsequenzen sollten auf ihre funktionelle Relevanz untersucht werden. Hierfür wurden die etwa 1 kb großen Fragmente beider Spezies (Abbildung 26) in einen Vektor mit einem Luziferase Gen ohne eigene Promotoraktivität kloniert (pGL3-Basic, Promega). Außerdem wurden Deletionskonstrukte für beide Regionen mit unterschiedlicher Insertgröße hergestellt (Abbildung 28). Die Insertgrößen der humanen Deletionskonstrukte betrug 869 bp, 759 bp, 489 bp und 409 bp, die der Maus 556 bp, 501 bp und 375 bp. Sowohl die Volllängenkonstrukte (HInsert 1119 bp und MInsert 1011 bp), als auch die Deletionskonstrukte (HInsert 869 bp, HInsert 759 bp, HInsert 489 bp, HInsert 409 bp, MInsert 556 bp, MInsert 501 bp und MInsert 375 bp) wurden in HeLa- und NIH 3T3-Zellen transfiziert und auf ihre Luziferasaktivität getestet. Als Positivkontrolle diente ein Konstrukt mit einem SV40 Promotor.

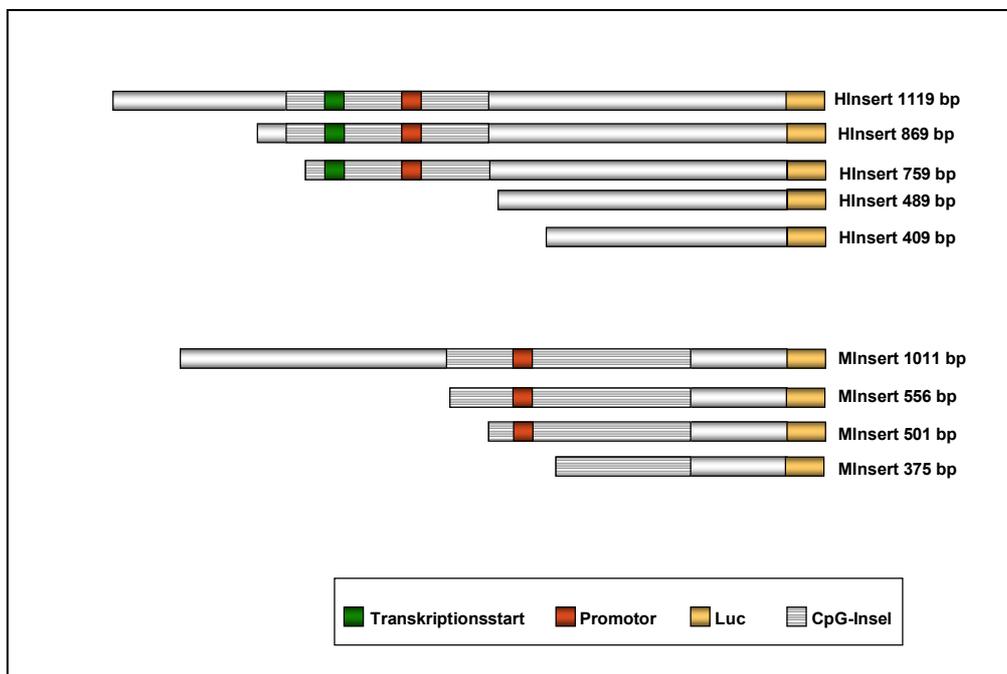
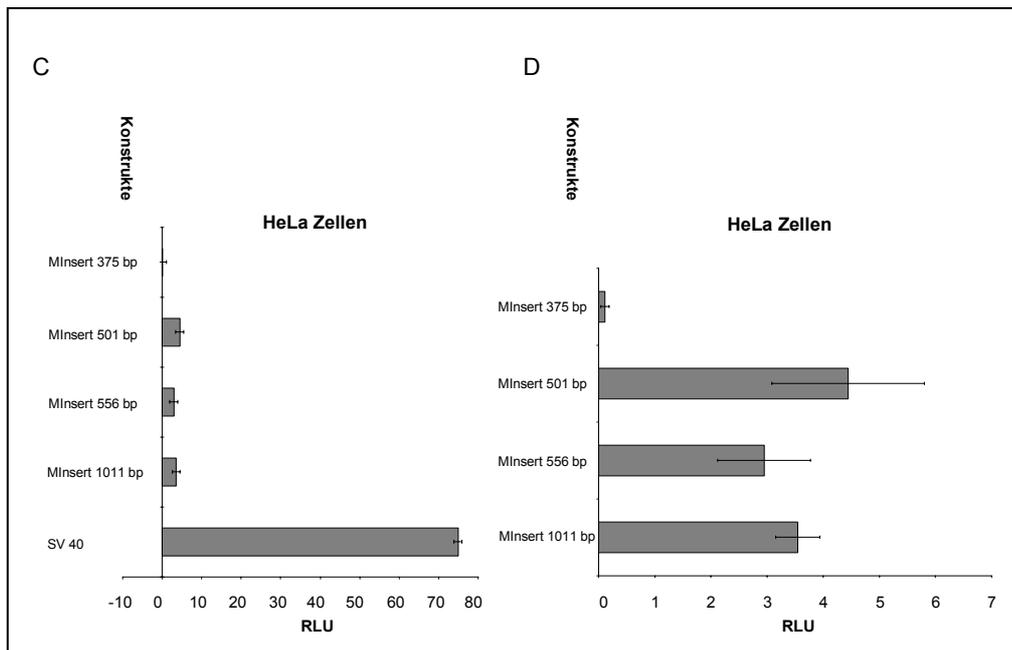
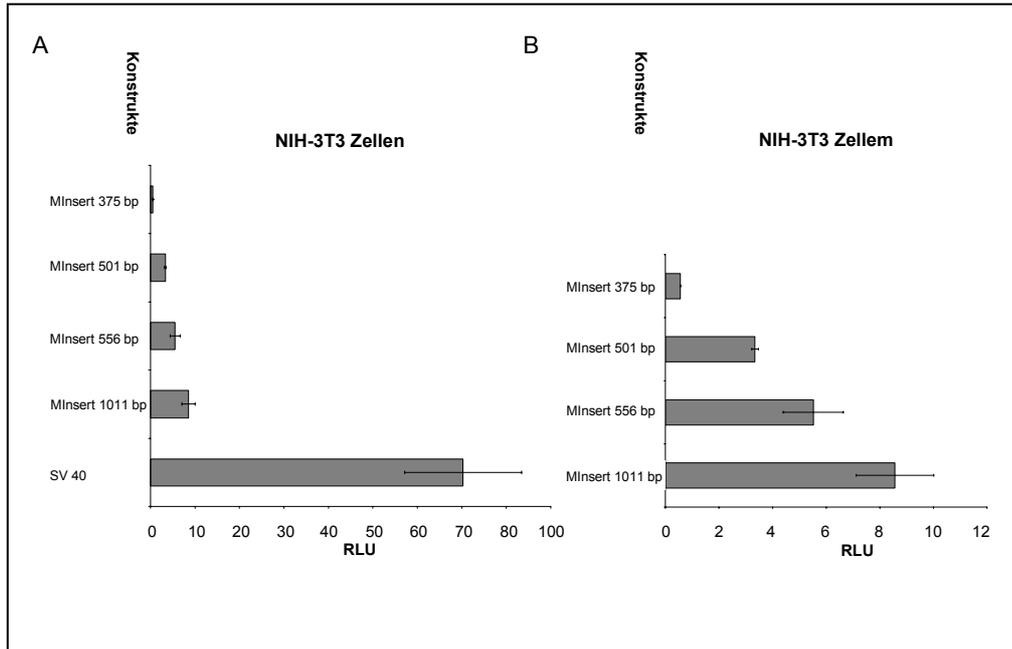


Abbildung 28: Graphische Darstellung der verschiedenen Luziferase Reporter Konstrukte

Dargestellt sind die Volllängenkonstrukte der humanen und Maus genomischen Sequenz (HInsert 1119 bp und MInsert 1011 bp), etwa 5 kb stromaufwärts von *NYX*, die vorhergesagte CpG-Inseln, Transkriptionsstartstellen und Promotorsequenzen beinhaltet. Diese Sequenzen und deletierte Varianten wurden 5' von einem Luziferase Reporter Gen (Luc) in einen kommerziellen Reportervektor kloniert.

Die Transfektionseffizienz wurde in jedem Experiment durch Kotransfektion mit einem Renilla-Luziferase-Konstrukt normalisiert und die Luziferaseaktivitäten als Mittelwert von jeweils drei Transfektionen pro Konstrukt in relativen Lichteinheiten angegeben (RLU) (Abbildung 29). Die stärkste Promotoraktivität mit einer RLU von 8,6 wurde beim Maus Volllängenkonstrukt in Maus Fibroblasten Zellen (NIH 3T3) gemessen (Abbildung 29A und 29B). Die Deletionskonstrukte mit einer Insertgröße von 556 bp und 501 bp resultierten in einer schwächeren aber immer noch messbaren Luziferaseaktivität von 5,5 und 3,3 RLU. Ein großer Unterschied der Aktivität wurde zwischen den Konstrukten mit einem Insert von 501 bp und 375 bp gemessen. Das kleinste Konstrukt lieferte nur noch eine Promotoraktivität von 0,5 RLU, die dem Hintergrundsignal entsprach. Die gleichen Konstrukte, transfiziert in HeLa Zellen, ergaben bei dem Volllängenkonstrukt und bei den beiden Deletionskonstrukten mit einem Insert von 556 bp und 501 bp eine ähnliche Promotoraktivität von 3,3, 2,9 und 4,4 RLU (Abbildung 29C und D). Aber auch hier nahm diese Aktivität bei dem Deletionskonstrukt mit einer Insertgröße von 375 bp drastisch ab. Es wurde eine RLU von nur 0,1 gemessen. Die Positivkontrolle resultierte in einer RLU > 60 in beiden Zelllinien. Die kontinuierliche Abnahme der Aktivität bei den Deletionskonstrukten lässt vermuten, dass sich Transkriptions-verstärkende, Maus-spezifische, regulatorische Elemente zwischen den Nukleotiden 1 und 501 des Inserts befinden. Die vollständige Abnahme der Luziferaseaktivität bei dem Deletionskonstrukt mit einer Insertgröße von 375 bp in humanen und Maus Zellen ist wahrscheinlich durch das Fehlen des vorhergesagten Transkriptionsstarts an der Nukleotidposition 562-563 begründet.

Die humanen Volllängen- und Deletionskonstrukte zeigten sowohl in HeLa Zellen (Abbildung 29E und F) als auch in Maus Zellen (29G und H) sehr niedrige Werte. Die höchste Aktivität wurde mit dem Volllängenkonstrukt in Mauszellen gemessen (0.99 RLU). Zukünftige Studien werden zeigen, ob es sich bei dieser Sequenz tatsächlich um einen Promotor handelt.



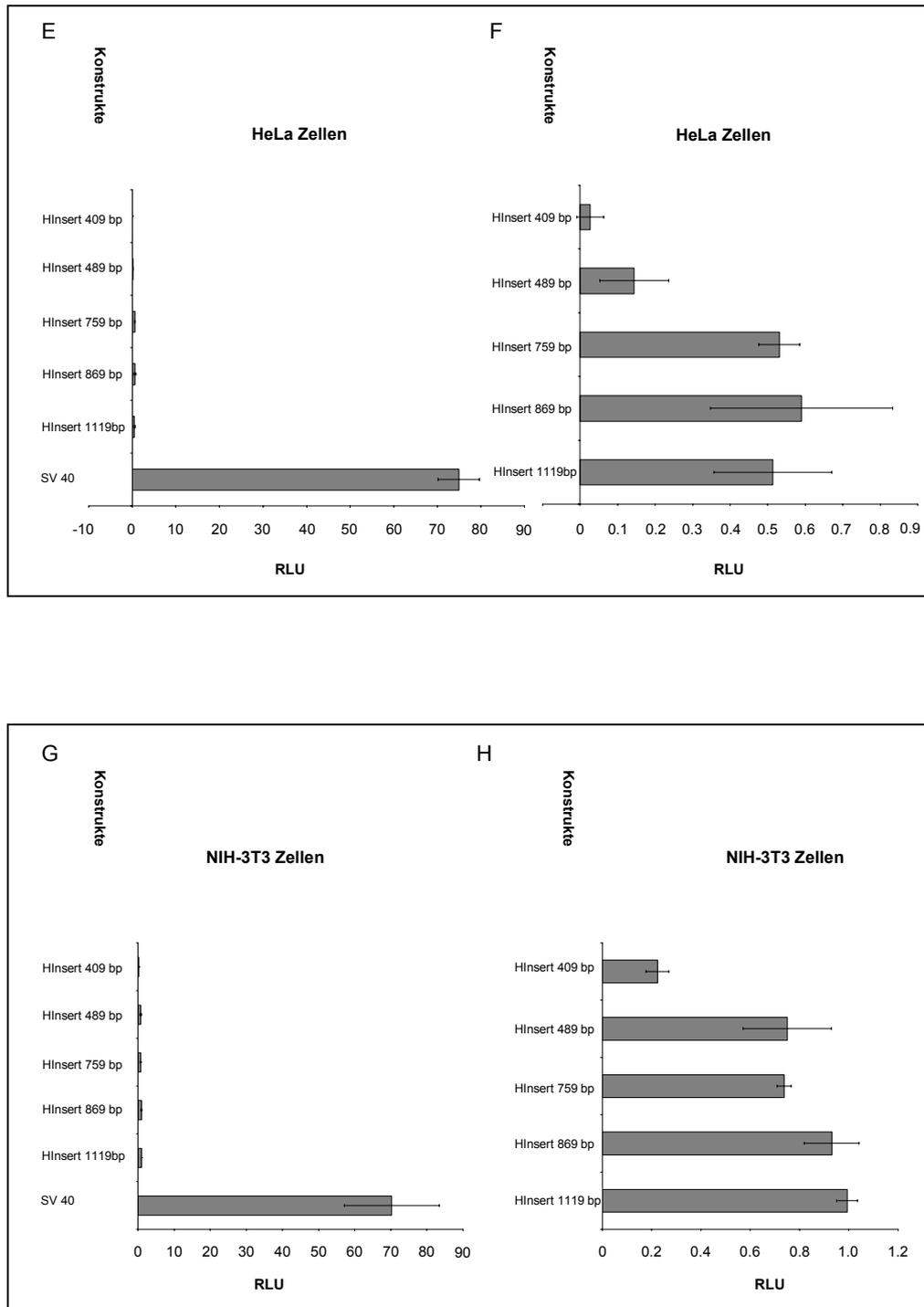


Abbildung 29: Luciferaseaktivitäten der verschiedenen Reporter-Konstrukte

Die Vollängenkonstrukte und eine Serie von Deletionskonstrukten der Maus und humanen putativen Promotorsequenzen wurden auf ihre Luciferaseaktivität in Maus Fibroblasten (NIH 3T3) und HeLa-Zellen analysiert. Auf der Y-Achse sind die jeweiligen Konstrukte mit ihrer Insertgröße aufgetragen, die X-Achse gibt die relative Luciferaseaktivität (RLU) an. In 29A, 29C, 29E und 29G werden die gemessenen RLU mit der Aktivität eines SV 40 Kontrollpromotor verglichen, in den entsprechenden Abbildungen 29B, 29D, 29F und 29H wurde zur besseren Auflösung die gemessenen RLU der untersuchten Konstrukte ohne Kontrolle aufgetragen.